



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Determinación de la longitud de telómeros,
mediante qRT-PCR, en muestras de esófago de
pacientes con enfermedad por reflujo
gastroesofágico.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

RAÚL MANCERA HERNÁNDEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA DE LEÓN MÉNDEZ**

2012



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Mancera
Hernández
Raúl
5531988373
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
400074111

2. Datos del tutor

Dra.
María del Carmen
García de León
Méndez

3. Datos del sinodal 1

Dr.
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Bertha
Molina
Álvarez

5. Datos del sinodal 3

Quím.
Viviana
Escobar
Sánchez

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Jorge Antonio
García
Álvarez

7. Datos del trabajo escrito.

Determinación de la longitud de telómeros, mediante qRT-PCR, en muestras de esófago de pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico.

61 pp
2012

DEL RIGOR EN LA CIENCIA

EN AQUEL IMPERIO, el Arte de la Cartografía logró tal Perfección que el mapa de una sola Provincia ocupaba toda una Ciudad, y el mapa del imperio, toda una Provincia. Con el tiempo, esos Mapas Desmesurados no satisficieron y los Colegios de Cartógrafos levantaron un Mapa del Imperio, que tenía el tamaño del Imperio y coincidía puntualmente con él. Menos Adictas al Estudio de la Cartografía, las Generaciones Sigüientes entendieron que ese dilatado Mapa era Inútil y no sin Impiedad lo entregaron a las Inclemencias del Sol y de los Inviernos. En los desiertos del Oeste perduran despedazadas Ruinas del Mapa, habitadas por Animales y Por Mendigos; en todo el País no hay otra reliquia de las Disciplinas Geográficas.

Suárez Miranda: VIAJES DE VARONES PRUDENTES, LIBRO CUARTO, CAP. XLV, LÉRIDA, 1658.

(0)

AGRADECIMIENTOS

a la Dra. María del Carmen Díaz de León, por su paciencia y apoyo;

a mis examinadores, los profesores René Cárdenas, Bertha Molina, Viviana Escobar y Jorge Antonio García, por su amable disposición y valiosas correcciones;

a Antonio R. Ortiz por compartir amablemente su tiempo, experiencia y resultados experimentales;

a todo el personal del Laboratorio de Patología Experimental de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, lugar donde se realizó este trabajo;

a los contribuyentes que, mediante la UNAM y el CONACyT, apoyaron el curso y culminación de este proyecto;

a la UNAM, por ser ese maravilloso y estimulante espacio creador.

MIL GRACIAS

a mis **padres** y **hermanos** por todo su amor y apoyo continuo;

a mis cinco **sobrinos**, por la ternura y la esperanza que representan;

a mis queridísimas colegas **ZEN, JAZZ, ESTHER** y **ARIGUIS**
(en estricto orden alfabético al revés);

a mis muy queridas y distantes **CHIQUIS, EREN, MISS SUSAN** y familias y prole
que las acompañan;

al **Jefe ISMA** y familia, cuya nobleza es ejemplar;

a mis más recientes y audaces amigas **ADRI, FERNANDITA** y **MIRY**;

a la fugaz pero persistente **LIBERTAD**;

a los amigos añejos (algo ausentes) **PACHECO, MICHIKO, MARIEL, NADIA** y
PEDRO... ok, y también a los **MOROCOS**;

a todos ustedes agradezco su compañía, complicidad, ejemplo, cariño, bondad,
existencia y/o la inspiración que me dan. Siempre estoy en deuda con ustedes.

Gracias también a mis maestros (y doctores) **MARÍA ELENA, ERNESTO,**
VÍCTOR, ROSA MARÍA y **RAMIRO**, quienes me enseñaron muy diversas formas de
sentir pasión.

Con todo mi cariño dedico este pequeño gran esfuerzo a mis padres,
MARÍA ELENA y **SALVADOR**.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Abreviaturas	2
I. Introducción	3
I.1. Enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE)	4
I.2. Telómeros	7
I.3. Telomerasa y otras vías de reparación telomérica	10
I.4. Telómeros y senescencia	12
II. Antecedentes	14
II.1. Técnicas de medición de la longitud telomérica	14
II.1.1. TRFL	14
II.1.2. qFISH	15
II.1.3. STELA	16
II.1.4. qRT-PCR	17
II.2. Patologías del esófago y longitud de telómeros	17
III. Justificación	19
IV. Objetivos general y específicos	20
V. Materiales y métodos	21
V.1. Selección de pacientes	21
V.2. Obtención de muestras mediante biopsia	21
V.3. Extracción de DNA genómico	22
V.4. Cuantificación de DNA	22
V.5. Medición de longitud relativa de telómeros mediante qRT-PCR	23
V.6. Análisis estadístico	27
VI. Resultados	28
VI.1. Población estudiada	28
VI.2. Extracción y cuantificación de DNA	30
VI.3. Cuantificación relativa de la longitud telomérica mediante qRT-PCR	32
VII. Discusión	39
VIII. Conclusiones	43
IX. Perspectivas	44
X. Anexos	45
XI. Referencias	50

RESUMEN

La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) es el resultado de la exposición continua de la mucosa esofágica al reflujo de los contenidos gástricos, la cual produce daño crónico en la mucosa esofágica, desencadenando proliferación celular, inflamación y producción de radicales libres. Estos procesos generan daño al DNA, conduciendo a la célula a estadios como la senescencia o la metaplasia, predisponente esta última para el desarrollo de cáncer. La senescencia, un proceso importante inducido por estímulos potencialmente cancerígenos, no ha sido estudiada en la transformación metaplásica de la mucosa esofágica, por lo que es necesario conocer los mecanismos que llevan a la mucosa normal a sufrir cambios preneoplásicos.

El presente trabajo se centra en el análisis de la longitud telomérica mediante PCR en tiempo real en muestras de pacientes con síntomas de ERGE y de pacientes control. La longitud telomérica se emplea aquí como un parámetro citológico asociado a procesos de alteración celular, y se investiga la relación que tiene con la presencia o no de síntomas de ERGE, con la edad de los pacientes y con la detección de marcadores específicos de senescencia celular (p16, p21 y p53).

El tejido esofágico empleado se colectó en el Servicio de Endoscopia del Departamento de Gastroenterología del Hospital General de México (HGM). Los resultados de este trabajo forman parte de un proyecto más amplio desarrollado por investigadores del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, campus HGM. De un total de 120 individuos, 70 con ERGE y 50 controles, se encontró que la longitud telomérica es significativamente menor en los individuos control, sin ERGE, con respecto a los pacientes con ERGE. Sin embargo no se encontró correlación alguna entre la longitud telomérica y la edad de los pacientes, ni con la presencia de los marcadores de senescencia celular p16, p21 o p53.

ABREVIATURAS

ALT	alargamiento alternativo de telómeros (<i>alternative lengthening of telomeres</i>)
C _T	ciclo umbral (<i>threshold cycle</i>)
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
EB	esófago de Barrett
ERGE	enfermedad por reflujo gastroesofágico
ERNE	enfermedad por reflujo gastroesofágico no erosiva
FISH	hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (<i>fluorescence in situ hybridization</i>)
IBP	inhibidor de la bomba de protones
LT	longitud telomérica
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
qFISH	FISH cuantitativa (<i>quantitative FISH</i>)
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real (<i>quantitative real time PCR</i>)
RDD	respuesta al daño en el DNA
RGE	reflujo gastroesofágico
ROS	especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
STELA	análisis de longitud de alargamiento de telómeros individuales (<i>single telomere elongation length analysis</i>)
T/S	cociente de la concentración de amplicón telomérico (T) entre la concentración de amplicón del gen de copia única (S)
TRFL	longitud de fragmentos de restricción terminales (<i>terminal restriction fragments length</i>)
T _m	temperatura de disociación (<i>melting temperature</i>)

I. INTRODUCCIÓN

El esófago es el tubo que conduce el alimento desde la cavidad oral hasta el estómago en el tracto digestivo de la mayoría de los animales vertebrados y de algunos invertebrados. El esófago humano (Figura 1) está cubierto en su interior por una capa de epitelio escamoso estratificado no queratinizado. Este epitelio es resistente a la abrasión causada por el paso de los alimentos, pero es sensible a la acción de sustancias ácidas. Debajo de él se encuentran glándulas submucosas, abundantes en las partes distal y proximal del esófago, que contribuyen a la protección de la mucosa secretando mucina y bicarbonato. Además, el tono constante del esfínter del esófago distal impide el paso del contenido gástrico, que se encuentra bajo presión positiva y que de otro modo entraría al esófago.

Al retorno del contenido gástrico a través del esfínter esofágico inferior hacia el esófago se le denomina reflujo gastroesofágico (RGE, Figura 1a). El RGE es un fenómeno fisiológico normal en el ser humano, pero en ciertas condiciones puede considerarse una patología: la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE).

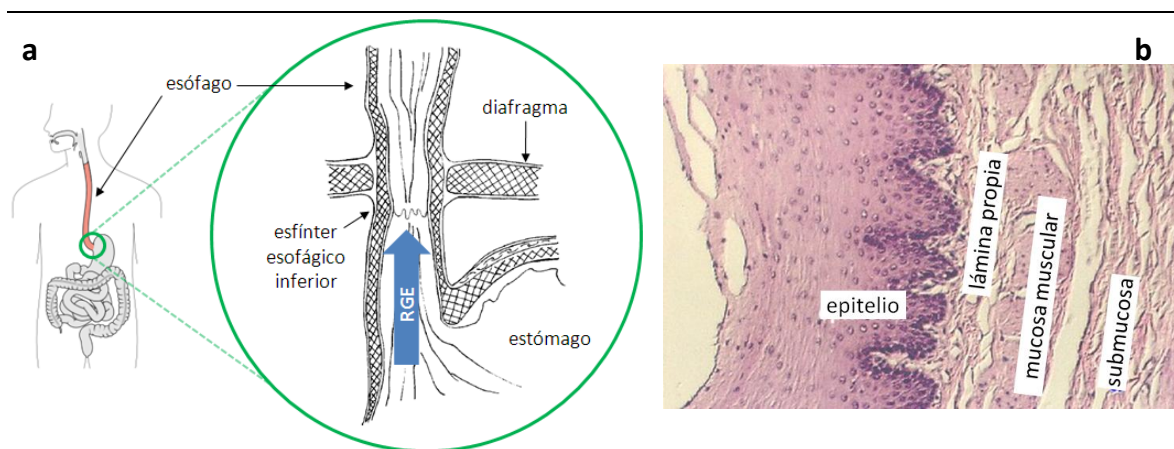


Figura 1

a) Localización del esófago humano (en rojo) y reflujo gastroesofágico (RGE); b) histología del esófago en corte transversal (modificado de Wu *et al.* 2003; Childs, 1998).

I.1. Enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE)

En el año 2005, durante el Congreso Mundial de Gastroenterología realizado en la ciudad de Montreal, se presentó el *Consenso global basado en evidencia sobre la definición de la ERGE* (Vakil *et al.* 2006), documento ratificado por la Organización Mundial de Gastroenterología (Chiocca 2007) y por otros organismos internacionales, incluida la Asociación Mexicana de Gastroenterología (Pérez *et al.* 2007). De acuerdo al Consenso de Montreal, la ERGE se define como la condición que aparece cuando el reflujo del contenido del estómago produce síntomas molestos y/o complicaciones, es decir, cuando “el reflujo ácido es cuantitativamente anormal, cuando son observadas lesiones esofágicas en la endoscopia, o simplemente porque los síntomas típicos (pirosis y regurgitación ácida) están presentes frecuentemente” provocando molestias en el paciente y disminuyendo su calidad de vida (Chávez 2008). Del Consenso también se reconoce que la ERGE presenta síntomas esofágicos y extraesofágicos, algunos subjetivos y otros objetivos.

La ERGE es un padecimiento crónico muy común en la sociedad occidental moderna, cuya prevalencia en algunos países se estima en un 20 a 40% de la población (Spechler 1992). En México no hay datos epidemiológicos precisos sobre la ERGE, pero es muy probable que sea un padecimiento frecuentemente sujeto al subdiagnóstico y a la automedicación, pues los médicos de primer contacto por lo general no están al tanto de los lineamientos para su detección y tratamiento, y los pacientes con síntomas de reflujo suelen recurrir a antiácidos de venta libre empleados como paliativos que sólo enmascaran la enfermedad (Peralta *et al.* 2007).

Los principales síntomas asociados a la ERGE son pirosis y regurgitación. Estas molestias se presentan principalmente después de tomar alimentos, especialmente comidas abundantes o grasosas, y se agravan al reclinar o doblar el cuerpo. En algunos casos, la ERGE puede producir episodios de dolor torácico que simulan dolor cardiaco isquémico sin acompañarse de pirosis o regurgitación (Chiocca y Salis 2007; IMSS 2009). En casos avanzados puede presentarse dificultad o dolor al deglutir, sangrado, pérdida de peso o anemia (Heidelbaugh *et al.* 2003). La ERGE también está asociada a otras

afecciones, como el asma bronquial (Kumar *et al* 2009) y la erosión dental (Barron *et al.* 2003).

El cuadro clínico no es suficiente para determinar la presencia de ERGE, pero debe ser el paso inicial para diagnosticarla. Mediante cuestionarios estructurados se puede evidenciar la afectación del paciente respecto a la ocurrencia o no de molestias relacionadas al reflujo. Uno de los cuestionarios más utilizados es el de Carlsson-Dent, validado en poblaciones europeas y cuya utilidad diagnóstica ha sido comprobada en pacientes mexicanos (Gómez *et al.* 2004). Como siguiente paso del diagnóstico se recomienda la prueba terapéutica con supresores de acidez, principalmente inhibidores de la bomba de protones (IBP) y antagonistas del receptor de histamina 2 (ARH2). Ambas familias de fármacos alivian los síntomas y promueven la recuperación de la mucosa esofágica cuando el reflujo se presenta, pero no lo detienen. También se recomienda hacer cambios en la dieta (evitar el consumo de cafeína, chocolate y alimentos condimentados) y modificar el estilo de vida del paciente (controlar la obesidad y evitar la exposición al humo de tabaco y el consumo de alcohol) (DeVault y Castell 2005).

En casos severos donde hay presunción de complicaciones debidas al reflujo, se requiere de una endoscopía con toma de biopsia, siendo este el mejor método para evaluar daño en la mucosa. Sin embargo se estima que entre 50 y 75% de los pacientes con síntomas típicos de ERGE tienen una mucosa esofágica normal en el estudio endoscópico (Bresadola *et al.* 2011). Como confirmación de reflujo se recomienda emplear la pHmetría de 24 horas, para medir directamente la frecuencia de exposición ácida a la que se somete el esófago (Uscanga *et al.* 2002). Esta técnica confirmatoria permite detectar los casos de ERGE no erosiva, también llamada ERNE (Álvaro *et al.* 2010).

La ERGE, por consiguiente, puede manifestarse tanto en forma no erosiva como en forma erosiva, la cual incluye complicaciones como ulceración o estenosis. Generalmente se considera que estas diferentes manifestaciones de ERGE comprenden estadios distintos de la enfermedad en un “modelo espectral”, asumiendo que la enfermedad progresa en etapas hacia una forma cada vez más grave y que ocasionalmente puede revertirse a

formas menos severas (Fullard *et al.* 2006). Sin embargo algunos autores sugieren que las diferencias existentes entre estos tipos de ERGE representan una variación en la susceptibilidad de los pacientes al daño por reflujo, aunque este punto de vista es el menos predominante (Fass y Ofman 2002; Remes *et al.* 2011).

El reflujo de los jugos gástricos es central en el desarrollo del daño a la mucosa en la ERGE erosiva. En casos severos, el reflujo de líquido biliar del duodeno puede exacerbar el daño. Las condiciones que disminuyen el tono del esfínter esofágico inferior o incrementan la presión abdominal contribuyen a la ERGE, e incluyen el uso de alcohol y tabaco, la obesidad, el uso de depresores del sistema nervioso central, embarazo, hernia hiatal, vacío retardado del estómago y el aumento del volumen gástrico. En muchos casos no es posible identificar una causa definitiva (Ramos y Huerta 2006).

Desde hace tiempo se ha demostrado que la ERGE incrementa la proliferación de las células escamosas esofágicas como consecuencia de la exposición del esófago al ácido gástrico estomacal (Livstone, *et al.* 1977). La ERGE severa también está asociada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan daño oxidativo en las células (Wetscher *et al.* 1995).

En casos crónicos de ERGE ocurren cambios aún mayores en el epitelio esofágico, observándose el reemplazo de la cubierta escamosa normal por epitelio columnar metaplásico e hiperproliferativo, condición conocida como esófago de Barrett (EB). La presencia de EB suele considerarse precedente al desarrollo de adenocarcinoma (DiPalma 2001), por lo que resulta importante realizar estudios sobre su prevención, diagnóstico temprano y tratamiento. De esta forma, ante la presencia de síntomas de ERGE, su correcto manejo puede evitar el desarrollo de patologías más graves que deterioren la calidad de vida del paciente.

Tanto el aumento en la proliferación celular como la presencia de ROS puede producir el acortamiento de los telómeros, que parecen ser sitios preferenciales de lesiones oxidativas al DNA (Von Zglinicki 2000). El acortamiento telomérico podría ser uno de los principales mecanismos que limitan finalmente la capacidad proliferativa de las

estrechamente asociadas a proteínas de unión, integrando una estructura en forma de lazo (*loop*) conocida como *loop t* (de Lange 2009).

En la formación del *loop t* destaca la participación del complejo de seis subunidades proteicas conocido como shelterina. Dos de sus subunidades, TRF1 y TRF2, se unen a secuencias TTAGGG en el DNA de doble cadena, y una subunidad, la POT1, se une a estas en el extremo 3' saliente de cadena sencilla (*overhang 3'*) (Griffith *et al.* 1999; de Lange 2005). Estas tres proteínas están interconectadas por las subunidades proteicas TIN2 y TPP1, reguladas por Rap1. Cuando el *overhang 3'* invade al dúplex de DNA se forma el *loop D* (lazo de desplazamiento), constituyendo una estructura muy estable. La manera como este *overhang 3'* invade la doble cadena es similar a la invasión de hebras durante el proceso de recombinación homóloga, y la delección experimental del gen *Pot1* en ratones induce la recombinación homóloga aberrante de los telómeros (Wu *et al.* 2006).

La afinidad de la shelterina por el DNA telomérico es muy alta y por lo tanto se acumula en todos los extremos cromosómicos naturales. La formación del *loop t* proporciona a los telómeros una estructura única que los distingue claramente de los extremos expuestos que resultan de una ruptura de la molécula de DNA, previniendo así la activación de las respuestas celulares al daño en el DNA (de Lange 2009).

En el proceso de replicación del DNA (Figura 3), durante la fase S del ciclo celular, cada una de las dos hebras de la molécula original sirve como molde para que el complejo enzimático de la DNA polimerasa sintetice una hebra completamente nueva. Este complejo se mueve progresivamente a lo largo de la cadena original formando la estructura conocida como horquilla de replicación. Cada nueva cadena crece de forma unidireccional en sentido 5' a 3' porque la DNA polimerasa sólo puede añadir nucleótidos al extremo 3'-OH libre de un nucleótido previo. Puesto que la doble cadena de DNA es antiparalela, la horquilla de replicación resulta ser una estructura asimétrica en donde una hebra crece de forma continua (cadena líder) y la otra es sintetizada de forma discontinua (cadena retrasada). En la cadena retrasada la enzima DNA primasa sintetiza segmentos cortos de RNA que la DNA polimerasa utiliza como iniciadores (*primers*) para la síntesis de

segmentos de DNA de unos 100 a 200 nucleótidos de longitud, conocidos como fragmentos de Okazaki. Posteriormente los iniciadores de RNA son removidos y la DNA ligasa une los fragmentos de Okazaki para completar la nueva hebra (Waga y Stillman 1998; Alberts *et al.* 2008).

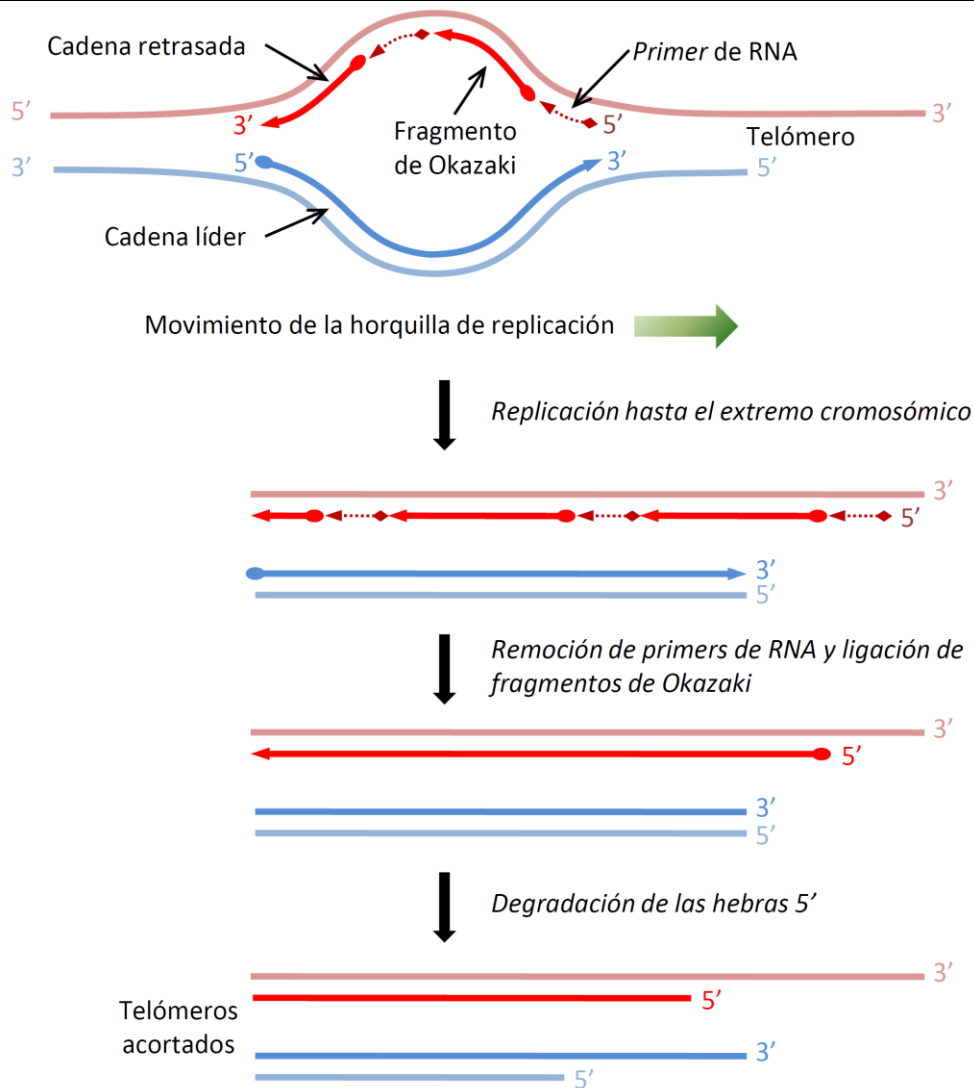


Figura 3

Acortamiento telomérico en la replicación del DNA eucarionte (adaptada de Levy *et al.* 1992 y Makarov *et al.* 1997).

Sin embargo, cuando la horquilla de replicación alcanza el telómero, la DNA primasa no tiene lugar en el borde de la molécula de DNA para sintetizar el iniciador de RNA necesario para sintetizar el último fragmento de Okazaki. Por lo tanto, la molécula hija

proveniente de la cadena retrasada es acortada en el extremo 5' tras la replicación, perdiéndose de 50 a 100 pares de bases en cada división celular (Shammas *et al.* 2004). Además se ha observado que en ambas moléculas hijas se produce un extremo saliente 3' rico en guanidinas (Makarov *et al.* 1997) que participa en la formación del *loop t*, presuntamente por la resección del extremo 5' mediante un mecanismo aún no identificado (Gilson y Géli 2007).

El acortamiento telomérico puede ser detenido si las células expresan suficientes niveles de telomerasa o mediante mecanismos de alargamiento alternativo de telómeros.

I.3. Telomerasa y vías alternas de alargamiento telomérico

Dado que la longitud del DNA telomérico inexorablemente se acorta durante la replicación, se requieren mecanismos que preserven la integridad del genoma y las funciones del telómero.

En muchos organismos, incluyendo mamíferos, una transcriptasa inversa especializada llamada telomerasa cataliza la adición de secuencias cortas de nucleótidos repetidos en un proceso muy regulado que está estrechamente acoplado a la replicación y a la diferenciación tisular (Holt *et al.* 1997; Forsyth *et al.* 2002). Aunque inicialmente se pensaba que la expresión y actividad de la telomerasa estaba limitada a células embrionarias y germinales, en los últimos años y con técnicas más sensibles se han revelado niveles modestos de actividad de telomerasa en ciertas regiones de tejidos proliferativos somáticos adultos con alto potencial de renovación, tal como médula ósea, piel, tracto gastrointestinal, testículos y linfocitos activados (Artandi y De Pinho 2010).

La telomerasa reconoce la secuencia repetida en el DNA telomérico y la alarga en dirección 5' a 3' usando un molde de RNA intrínseco a la misma enzima para sintetizar nuevas copias de la repetición. Tras la extensión que hace la telomerasa de la hebra de DNA parental, puede completarse la replicación de la hebra retardada en el extremo del cromosoma mediante otras DNA polimerasas, usando estas extensiones como molde para sintetizar la hebra complementaria. Este proceso, completado con la resección del

extremo 5', asegura que el extremo 3' de cada telómero sea siempre más largo que el extremo 5' de su cadena complementaria. En líneas celulares tumorales se ha demostrado que el bloqueo experimental de la actividad telomerasa produce un acortamiento telomérico crítico que finalmente resulta en senescencia (Riou *et al.* 2002).

En experimentos con células de levadura que no expresaban telomerasa se observó que la pérdida de DNA telomérico podía ser compensada por una vía de alargamiento alternativo de telómeros (ALT) independiente de telomerasa (Lundblad 2002). En años recientes se ha identificado un fenotipo homólogo en aquellos tipos de cáncer en los que no se detecta actividad telomerasa, pero que presentan telómeros más largos que las células normales (Durant 2012). El fenotipo ALT en células cancerosas humanas tiene varias características peculiares. En primer lugar, la distribución de la longitud de los telómeros es muy heterogénea y varía de ~3 kb a más de 50 kb. En contraste, en células cancerosas con actividad de telomerasa los telómeros tienen típicamente una longitud homogénea de alrededor de 10 kb.

Otra característica de las células que utilizan la vía ALT es que contienen varias clases de repeticiones teloméricas extracromosómicas en el núcleo que incluyen moléculas circulares de cadena doble y de cadena sencilla, DNA telomérico lineal y moléculas con DNA de alto peso molecular y estructuras altamente ramificadas probablemente derivadas del *loop t*. Además, en estas células la ocurrencia de intercambio de segmentos teloméricos entre cromátidas hermanas es generalmente mayor que en las células con actividad de telomerasa (Chung *et al.* 2012).

Aunque se ha sugerido que la vía ALT depende de la recombinación entre segmentos de DNA telomérico repetitivo, los detalles moleculares de este intercambio aún no se conocen. Sin embargo, en estudios recientes sobre este fenotipo se ha logrado identificar genes esenciales y ciertas estructuras en el DNA que podrían ser importantes en su regulación epigenética (Nabetani e Ishikawa 2011).

I.4. Telómeros y senescencia celular

El aumento en la proliferación celular en un tejido, por circunstancias fisiológicas normales o patológicas, trae como consecuencia el acortamiento progresivo de los telómeros. Los telómeros acortados críticamente son altamente recombinogénicos, situación que puede disparar una serie de eventos celulares conocidos en conjunto como respuesta al daño en el DNA (RDD). Los eventos de inestabilidad genética desencadenados a partir de la presencia de telómeros disfuncionales están asociados con la transición de lesiones benignas a cáncer maligno, por lo que se ha postulado que las patologías que inducen una rápida proliferación celular pueden promover la formación de carcinomas (Meeker *et al.* 2004).

Las células responden a la percepción de daño al DNA deteniendo el progreso del ciclo celular y activando las RDD. En mamíferos, la proliferación sólo se restablece si el daño al DNA se ha reparado. Si el daño es irreparable, la célula continúa sin progresión del ciclo celular y puede ser dirigida a muerte por apoptosis o al estado conocido como senescencia celular. La senescencia celular es una condición en la cual las células, como respuesta al estrés, son incapaces de seguir proliferando aunque continúan vivas, y es diferente de la quiescencia o diferenciación terminal. La senescencia puede ser disparada por una variedad de factores que implican daño al DNA (incluido el acortamiento de los telómeros), la activación de oncogenes y el estrés oxidativo (d'Adda di Fagagna 2008).

Los mecanismos moleculares de senescencia comprenden la participación de proteínas inhibidoras y/o supresoras de tumores, entre ellas p16 y p53.

La regulación de la expresión de p16 es compleja e involucra control epigenético y múltiples factores de transcripción. Particularmente, diversas desacetilasas de histonas juegan un papel importante en la hipermetilación del promotor del gen *p16* para inhibir su expresión. Cuando estos y otros mecanismos supresores son inactivados, la expresión de p16 conduce a la célula a senescencia. La senescencia mediada por p16 actúa a través de la vía del retinoblastoma (Rb), inhibiendo la acción de cinasas dependientes de ciclinas y conduciendo a la detención del ciclo celular en la fase G1. (Rayess *et al.* 2012).

La proteína p53 juega un papel muy importante en la supresión del desarrollo de tumores, y está funcionalmente abatida en más del 60% de todos los cánceres humanos. En respuesta al estrés genotóxico, y como medida para evitar la tumorigénesis, p53 detiene el ciclo celular y puede desencadenar la senescencia celular induciendo la síntesis del supresor tumoral p21, o bien la apoptosis (Lowe *et al.* 2004). En experimentos con modelos animales se ha demostrado que el abatimiento de la actividad de telomerasa resulta en telómeros más cortos y una apoptosis elevada dependiente de p53 en tejidos altamente proliferativos. Estudios *in vitro* dan evidencia de que el acortamiento telomérico también inicia cambios morfológicos característicos de la senescencia replicativa. Los telómeros disfuncionales activan los puntos de control de la RDD que afectan la vía p53–p21, iniciando la senescencia celular (Rudolph *et al.* 1999).

Dados sus efectos antiproliferativos, se postula que la senescencia celular es un mecanismo de supresión tumoral muy potente *in vivo*, en situaciones que implican el acortamiento telomérico y comprometen la estabilidad genética de las células (Cosme *et al.* 2007). De esta forma p16, p21 y p53 pueden utilizarse como marcadores de detención del ciclo celular y/o senescencia al estudiar tejidos en condiciones de proliferación alta.

II. ANTECEDENTES

La pérdida de DNA telomérico está bien estudiada a nivel celular, habiéndose demostrado que está relacionada con la historia replicativa y con la longevidad de las células somáticas. Sin embargo, a nivel de tejidos se ha observado que existe heterogeneidad en la longitud telomérica promedio de diferentes tipos celulares en un mismo individuo, sin mencionar la heterogeneidad entre la longitud de los telómeros de los cromosomas de una misma célula. La medición experimental de los telómeros en diferentes tejidos se ha centrado en el estudio de su correlación con el envejecimiento y con procesos de daño celular.

Ahora bien, la investigación que involucra la medición de telómeros en tejido esofágico es escasa. La mayor parte de los reportes abordan la relación entre el cáncer esofágico con la longitud telomérica (LT) y la actividad de telomerasa. Otros pocos estudios comprenden mediciones de LT en pacientes con esófago de Barrett y ERGE avanzada. Actualmente existen varias técnicas experimentales empleadas para medir la LT. Las principales se detallan a continuación, y enseguida se hace un breve recuento de las investigaciones sobre patologías esofágicas que involucran mediciones de LT.

II.1. Técnicas de medición de la longitud telomérica

Todos los métodos existentes para medir telómeros se basan en la unión de sondas o de iniciadores (*primers*) de ácido nucleico a las secuencias repetidas del DNA telomérico, pero difieren principalmente en la forma de acceder al telómero y en su sensibilidad.

II.1.1. Medición de la longitud de fragmentos de restricción terminales (TRFL).

La medición de la longitud media de fragmentos de restricción terminales (TRFL) mediante Southern blot fue la primera técnica desarrollada para la medición de LT y ha sido la más ampliamente utilizada (Canela *et al.* 2007). Esta técnica está basada en la digestión de las secuencias de DNA en regiones cercanas a los telómeros. El DNA

genómico se incubaba con enzimas de restricción que cortan la cadena polinucleotídica en puntos específicos de las regiones subteloméricas. Mediante electroforesis en gel se separan los fragmentos resultantes, que luego son transferidos a una membrana y analizados por Southern blot usando sondas apropiadas, generalmente DNA complementario a 3 o 4 repeticiones TTAGGG. Finalmente se compara el tamaño y densidad de los fragmentos obtenidos con marcadores de peso molecular, empleando software de análisis densitométrico (Allshire *et al.* 1989).

Esta técnica permite estimar la LT promedio de una población de células, pero requiere una gran cantidad de DNA (~10 µg de DNA/muestra) y tiene baja resolución (~1 kb), montarla consume bastante tiempo (de 3 a 5 días) y por lo tanto su uso se ha limitado al estudio de muestras poblacionales pequeñas o de material obtenido mediante cultivo de líneas celulares. Además, la presencia de polimorfismos subteloméricos altera los sitios de restricción, lo cual puede afectar la comparación interindividual de las mediciones (Cawthon 2002).

II.1.2. Hibridación in situ con fluorescencia (FISH)

Otra técnica que suele ser empleada en la medición de la LT es la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), tanto en su modalidad cuantitativa (qFISH) que emplea el análisis densitométrico de imágenes de células metafásicas, como en su modalidad acoplada a citometría de flujo (*flow* FISH) que permite hacer determinaciones empleando células en suspensión. Con ambas modalidades se utilizan sondas nucleopeptídicas etiquetadas directamente con un fluoróforo, las cuales se hibridan específicamente con el DNA telomérico para después detectar la señal fluorescente y compararla con un estándar de LT conocida (Hultdin *et al.* 1998).

La qFISH se aplica en secciones de tejido fijado con formalina e incluido en parafina mediante métodos estándar. La detección por fluorescencia permite estimar la longitud de los telómeros individuales en una sola célula mediante el análisis cuantitativo de la densidad óptica de las sondas de hibridación en las microfotografías obtenidas. Esta

técnica permite detectar extremos muy cortos con una resolución de ~0.3 kb y también eventos de fusión cromosómica (Meeker *et al.* 2002).

La *flow* FISH se utiliza para determinar la LT promedio en células individuales en suspensión, lo cual la hace muy útil al analizar tipos celulares específicos del sistema inmune en sangre periférica, e incluso se puede semiautomatizar para el procesamiento de una gran cantidad de muestras (Rufer *et al.* 1998).

La FISH, en cualquiera de sus modalidades, requiere cantidades pequeñas de tejido y permite hacer determinaciones de la LT a nivel celular, además de que puede acoplarse con técnicas de inmunodetección para la identificación simultánea de tipos celulares específicos en la misma muestra. Sin embargo es una técnica relativamente costosa.

II.1.3. Análisis de longitud de alargamiento de telómeros individuales (STELA).

El análisis de longitud de alargamiento de telómeros individuales se basa en la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las repeticiones teloméricas, seguida por la separación de los productos de amplificación (amplicones) por electroforesis en gel y su posterior caracterización mediante Southern blot. Al diseñar oligonucleótidos iniciadores complementarios a secuencias subteloméricas específicas, mediante STELA se puede medir la LT promedio de un solo cromosoma en una población celular (Baird *et al.* 2003).

Aunque el STELA es una técnica atractiva por la pequeña cantidad de muestra requerida (desde una sola célula) y su alta resolución (0.1 kb), es una técnica muy laboriosa que además está limitada a la detección de extremos teloméricos para los cuales en la práctica puedan diseñarse los iniciadores adecuados para todas las muestras por analizar, tomando en cuenta la presencia de polimorfismos subteloméricos (Aubert y Lansdorp 2008).

II.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

La PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se ha adaptado para obtener mediciones tanto absolutas (O'Callaghan *et al.* 2008) como relativas (Cawthon 2009) de la LT promedio en una muestra de tejido. Esta técnica es muy sensible (en teoría detecta desde 76 pb), además de ser rápida, reproducible, automatizable y relativamente económica, pues está basada en el sistema de detección con SybrGreen, un reactivo muy versátil empleado en la cuantificación de DNA de doble cadena, en este caso de las repeticiones hexaméricas (TTAGGG)_n amplificadas. El DNA genómico extraído a partir de muestras de tejido se utiliza como plantilla de replicación en la qRT-PCR, empleando un par de oligonucleótidos capaces de hibridar con las secuencias teloméricas repetitivas y generar productos de amplificación en número proporcional a la longitud del telómero.

El diseño de la qRT-PCR para la medición relativa de la LT incluye la amplificación paralela de un fragmento de un gen de copia única, del cual se sabe que sólo existe un número fijo en cada célula diploide. La longitud telomérica se reporta como la proporción T/S, que representa el cociente de la concentración de amplicón telomérico (T) entre la concentración de amplicón del gen de copia única (S).

Puesto que los oligonucleótidos utilizados en la qRT-PCR están diseñados para reconocer la secuencia repetitiva hexamérica a todo lo largo de cualquier telómero, la determinación de LT mediante esta técnica no es afectada por los polimorfismos subteloméricos, aunque tampoco puede aplicarse al análisis de telómeros individuales, a diferencia del STELA.

II.2. Patologías del esófago y longitud de telómeros

Las formas más comunes de cáncer esofágico, clasificadas por el tipo de células que inicialmente desarrollan malignidad, son el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma (Blot y McLaughlin, 1999).

El carcinoma de células escamosas inicia en las células epiteliales escamosas del tejido esofágico. Se establece por lo general en las porciones superior y media del esófago

y está asociado principalmente a pacientes de edad avanzada con antecedentes de alcoholismo y tabaquismo. En este tipo de cáncer varios grupos de investigación, empleando qFISH y medición de TRFL, han encontrado una LT menor en células malignas con respecto a células normales (Takubo *et al.* 2010; Kammori *et al.* 2007; Hsu *et al.* 2005).

La otra forma de cáncer esofágico, el adenocarcinoma, inicia en las células glandulares productoras de mucina y se desarrolla principalmente en la parte inferior del esófago, cerca del estómago. Precisamente la ERGE y el EB son factores de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer. Respecto a su relación con la LT existen informes contradictorios. Por ejemplo, Shamma *et al.* (2008), mediante qRT-PCR, y Shiraishi *et al.* (2009), mediante qFISH, encontraron una LT menor en células con adenocarcinoma respecto a tejido normal. Sin embargo, Gertler *et al.* (2008) hallaron correlación entre el progreso del carcinoma con una mayor LT y una mayor actividad de telomerasa en tejido esofágico. Asimismo este grupo comparó, con resultados similares, la LT en muestras de esófago de pacientes cuya muerte se debió a cáncer esofágico recurrente contra tejido de pacientes cuya muerte no estuvo relacionada al cáncer, proponiendo incluso el uso de esta medición como indicador para el diagnóstico y pronóstico de cáncer esofágico.

Con respecto a la investigación en alteraciones no cancerosas del esófago, Finley *et al.* (2006) observaron mediante qFISH telómeros más cortos en muestras de pacientes con ERGE (con y sin EB), con respecto a muestras independientes de tejido gástrico de pacientes con ERGE (con y sin EB). Sin embargo no utilizaron tejido esofágico sano como control. Más recientemente Souza *et al.* (2007) compararon la actividad de telomerasa y la LT, medida mediante TRFL, en el esófago distal y proximal de pacientes con ERGE crónica, principalmente casos avanzados con EB ya establecido, encontrando telómeros más cortos en 38 pacientes con ERGE (con y sin EB) con respecto a 16 pacientes control, sin diferencias en la actividad de telomerasa. Hasta el momento no se ha reportado el uso de la qRT-PCR para la medición de telómeros en tejido esofágico de pacientes con ERGE sin EB.

III. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) es una de las alteraciones gastrointestinales con mayor prevalencia en la sociedad occidental, afectando drásticamente la calidad de vida de quienes la padecen. Además, la ERGE crónica es una condición previa al desarrollo de la metaplasia intestinal conocida como esófago de Barrett (EB), considerada como un factor asociado al establecimiento de adenocarcinoma esofágico.

Las investigaciones sobre los cambios moleculares y citológicos que se presentan durante la ERGE en el tejido esofágico resultan de gran importancia para poder entender los mecanismos de desarrollo de la enfermedad, así como para proponer eventualmente diagnósticos y tratamientos que ayuden a prevenir, mitigar o revertir los efectos perjudiciales de esta enfermedad y poder así elevar la calidad de vida de los pacientes afectados por ella.

Aunque la medición de la longitud telomérica en el tejido esofágico ya ha sido estudiada con anterioridad, principalmente en pacientes con esófago de Barrett o con adenocarcinoma esofágico, no hay evidencia sobre trabajos que hayan abordado este problema en un grupo de pacientes con ERGE sin EB mediante la técnica de PCR en tiempo real, lo cual es el principal objetivo del presente trabajo. La PCR en tiempo real es una técnica sensible y potencialmente automatizable que puede emplearse en el análisis de rutina de una gran cantidad de muestras.

Puesto que el desarrollo de esófago de Barrett tiene como antecedente condiciones de ERGE crónica, la medición de longitud telomérica en tejido esofágico podría ser empleada como método diagnóstico de utilidad para la detección temprana y prevención oportuna de estos padecimientos.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Determinar, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), la longitud relativa de los telómeros para su comparación en muestras de pacientes con ERGE y de pacientes control.

IV.2. Objetivos particulares

- Cuantificar, mediante qRT-PCR, la longitud relativa de los telómeros de las muestras de tejido esofágico de individuos control y pacientes con ERGE.
- Determinar si existe relación entre la longitud telomérica y la presencia de síntomas de ERGE.
- Determinar si existe relación entre la longitud telomérica y la edad de los pacientes.
- Determinar si existe relación entre la longitud telomérica y la presencia de los marcadores de senescencia celular p16, p21 y p53, de acuerdo con los resultados preliminares obtenidos en el proyecto de investigación *“Estudio sobre senescencia celular y perfiles de expresión de micro RNA en la mucosa esofágica de pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico”*, desarrollado paralelamente por investigadores del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Selección de pacientes

Los pacientes reclutados para este estudio son los mismos que participan en el proyecto *“Estudio sobre senescencia celular y perfiles de expresión de micro RNA en la mucosa esofágica de pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico”*, a cargo de la Dra. María del Carmen García de León M. del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, campus Hospital General de México (HGM). El criterio para el diagnóstico clínico implicó la obtención de una calificación mínima de 4 en el cuestionario de Carlsson-Dent (Anexo X.1) para incluirlo como paciente con síntomas de ERGE y 0 para incluirlo como control. A estos pacientes se les pidió su participación voluntaria, informándoles las implicaciones de ingresar en el estudio mediante una carta de consentimiento informado (Anexo X.2). Los pacientes con ERGE presentaron de forma recurrente los dos principales síntomas de la enfermedad (pirosis y regurgitación) durante al menos el último mes, con evidencia endoscópica de reflujo. Los pacientes control se caracterizaron por la ausencia de estos síntomas. En ambos casos fue condición que durante el último mes no hubieran sido tratados con medicamentos inhibidores de la bomba de protones (antiácidos de la familia del omeprazol). También se excluyeron los pacientes con diagnóstico de cáncer.

V.2. Obtención de muestras mediante biopsia

La obtención de las muestras de tejido esofágico mediante biopsia estuvo a cargo del Servicio de Endoscopía del Departamento de Gastroenterología del HGM. Por cada paciente se tomaron cinco muestras de tejido de la porción distal del esófago, cerca de la unión gastroesofágica. Cada muestra tuvo un volumen aproximado de 2 a 4 mm³ y un peso húmedo de alrededor de 10 mg. Las muestras se colocaron en recipientes estériles adecuados etiquetados con un identificador único. Sólo una de esas cinco muestras estuvo destinada al análisis de longitud telomérica. Dicha muestra se transportó en hielo seco

hasta al laboratorio, donde se conservó en congelación a -80°C hasta el momento de ser procesada.

De las cuatro muestras restantes, una se entregó al Departamento de Patología del HGM para su análisis histopatológico y las otras tres se destinaron al proyecto *“Estudio sobre senescencia celular y perfiles de expresión de micro RNA en la mucosa esofágica de pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico”*, desarrollado por investigadores del Departamento de Medicina Experimental, quienes llevaron a cabo la identificación por inmunohistoquímica de los marcadores de senescencia celular p16, p21 y p53.

V.3. Extracción de DNA genómico

Las muestras de tejido esofágico fueron procesadas con un kit comercial para la purificación de DNA genómico (QIAmp DNA mini kit®, QIAGEN) basado en la adsorción selectiva de los ácidos nucleicos en una membrana de gel de sílice. Cada muestra se sometió al protocolo de extracción mostrado en el Anexo X.3.

La integridad del DNA extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Cada gel se preparó con 0.6 g de agarosa en 60 mL de bufer TBE (Tris-HCl 70 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), añadiendo 3 μL de una solución concentrada de bromuro de etidio. En cada pozo se cargó una mezcla de 5 μL de cada elución de DNA más 5 μL de buffer muestra 2x (azul de bromofenol 0.03%, glicerol 30%). También se incluyeron dos pozos con DNA λ /HindIII como marcador de peso molecular en cada gel. Los geles se corrieron a un voltaje constante de 100 V durante aproximadamente 40 min, tras lo cual se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador UV.

V.4. Cuantificación de DNA

Una vez extraído el DNA de todas las muestras de tejido, se procedió a determinar su concentración espectrofotométricamente. Para esto se realizaron diluciones 1:40 de cada una de las muestras en buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0) y se midió su absorbancia a 260, 280 y 320 nm (A_{260} , A_{280} y A_{320} , respectivamente), utilizando buffer TE

como blanco. Se empleó un espectrofotómetro Thermo Scientific Biomate 3 en todas las mediciones, usando celdas de cuarzo de 0.5 mL.

Con la razón $(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})$ se determinó la presencia de RNA (si el cociente era cercano a 2.0) como estimación de la pureza. Con la absorbancia a 260 nm se determinó la concentración de DNA, siguiendo el criterio para ácidos nucleicos de doble cadena que establece que $(A_{260}-A_{320})=1$ equivale a una concentración de 50 ng/ μ L (QIAGEN 2001).

V.5. Medición de longitud relativa de telómeros mediante qRT-PCR

El método para medir la longitud telomérica empleado aquí es el propuesto por Cawthon (2009), con algunas modificaciones, que está basado en la cuantificación relativa de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, también llamada PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

Todas las determinaciones se realizaron en un termociclador ABI 7300 controlado con el software SDS versión 1.2.3 (Applied Biosystems). Se utilizaron placas para qRT-PCR de 12x8 pozos, con reacciones de 20 μ L de la mezcla indicada en la Tabla 1.

Tabla 1
Composición de la mezcla de reacción para la qRT-PCR.

Reactivo	Concentración
Betaína	1 M
Ditiotreitol	1 mM
Oligo <i>forward</i> (telg o albu)	450 nM
Oligo <i>reverse</i> (telc o albd)	450 nM
SybrGreen Master Mix® (Applied Biosystems)*	1X
DNA	16 ng/20 μ L

*Conteniendo SYBR® Green I, DNA polimerasa AmpliTaq Gold®, dNTPs, MgCl₂, referencia pasiva y buffer.

Los oligonucleótidos iniciadores (sintetizados por Eurofins MWG Operon) empleados en las qRT-PCR son los que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2
Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las qRT-PCR (Cawthon, 2009).

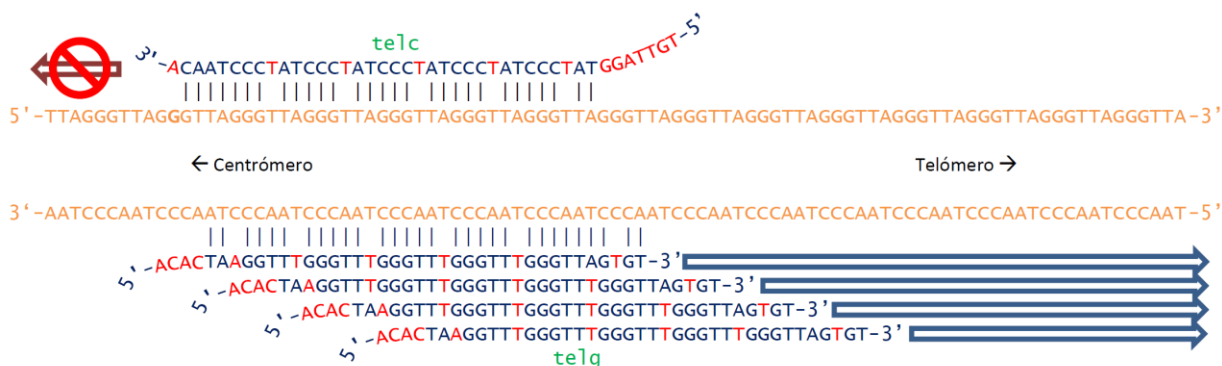
Oligo iniciador	Secuencia
telg	5'-ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT-3'
telc	5'-TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACAA-3'
albu	5'-CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGAAATGCTGCACAGAATCCTTG-3'
albd	5'-GCCCCGCCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGAAAAGCATGGTCGCCTGTT-3'

El empleo de estos dos pares de oligonucleótidos (telg/telc y albu/albd) permite realizar una cuantificación relativa por el método de las curvas estándar, determinando la cantidad relativa de DNA inicial en cada muestra con respecto a una cantidad de DNA estándar, tanto para la amplificación de la secuencia telomérica (telg y telc) como para la amplificación de un fragmento de la secuencia del gen de albúmina (albu y albd), un gen con sólo dos copias presentes en cada célula diploide, empleado aquí como normalizador (control de carga).

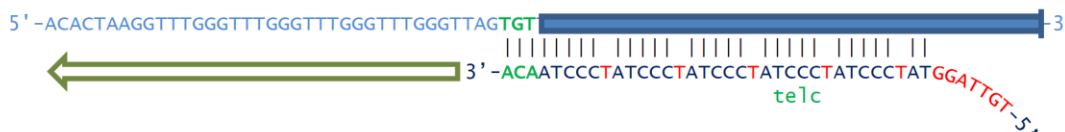
El par de oligonucleótidos iniciadores usados para amplificar la secuencia de telómero (telg y telc) está diseñado para inhibir la formación de dímeros telg·telc y para que a partir del tercer ciclo de amplificación se genere un producto de 79 pb (Figura 4). La cantidad de amplicón generado es proporcional a la longitud de los telómeros en la muestra. En el primer ciclo (Figura 4a), el oligo telc reconoce las repeticiones hexaméricas de la hebra rica en G, pero no es capaz de iniciar la extensión de la cadena debido a la disparidad de bases en el extremo 3'. El oligo telg reconoce las repeticiones de la hebra rica en C y genera una variedad de productos, cada uno con una longitud determinada por el sitio inicial de hibridación del oligo con el telómero. En el segundo ciclo (Figura 4b) el oligo telc se alinea con los productos generados en el primer ciclo. Gracias a la complementariedad de tres bases entre los extremos 3' de los oligos, telc ahora es capaz de iniciar la extensión de hebras sencillas con una longitud constante de 79 pb. A partir del

tercer ciclo (Figura 4c) telg hibrida con la hebra de 79 pb y genera un producto de dos cadenas perfectamente complementarias cuya concentración se incrementa exponencialmente en los ciclos subsecuentes.

a) Hibridación de telg a lo largo del telómero y extensión en el primer ciclo de la PCR:



b) Hibridación de telc con los productos del primer ciclo y extensión en el segundo ciclo de la PCR:



c) Producto principal de 79 pb a partir del tercer ciclo de la PCR:



Figura 4

Productos obtenidos en los primeros ciclos de la qRT-PCR a partir de la secuencia telomérica (en naranja). Figura adaptada de Cawthon, 2009.

El par de oligonucleótidos empleados para amplificar la secuencia del gen de copia única (albu y albd) posee abrazaderas G-C que incrementan la temperatura de disociación (T_m) del amplicón, permitiendo detectar su presencia a una temperatura en la que el amplicón del telómero está totalmente disociado, lo que resulta útil en el montaje de una reacción multiplex, aunque el equipo utilizado en nuestras determinaciones no permitió

esta funcionalidad, por lo que se realizaron dos qRT-PCR singleplex, una para amplificar la secuencia telomérica y otra para amplificar la secuencia del gen de albúmina. Las muestras fueron cargadas en posiciones coincidentes en ambas placas, es decir, con las mismas coordenadas para fila y columna.

Los perfiles térmicos de las dos reacciones singleplex se muestran gráficamente en la Figura 5. Inicialmente la DNA polimerasa se activó por calor y la muestra de DNA genómico se desnaturalizó. En la Etapa 1 fueron necesarios dos ciclos de temperatura relativamente baja para alinear y extender efectivamente los oligos telg y telc. La Etapa 2 comprendió la repetición de un ciclo con los pasos de desnaturalización, alineamiento y extensión con adquisición de señal típicos de la qRT-PCR. La temperatura de extensión y recolección de datos fue de 65°C para telómero y 74°C para albúmina, aproximadamente 10°C por debajo de la T_m de cada amplicón. Finalmente se evaluó la curva de disociación de los amplicones.

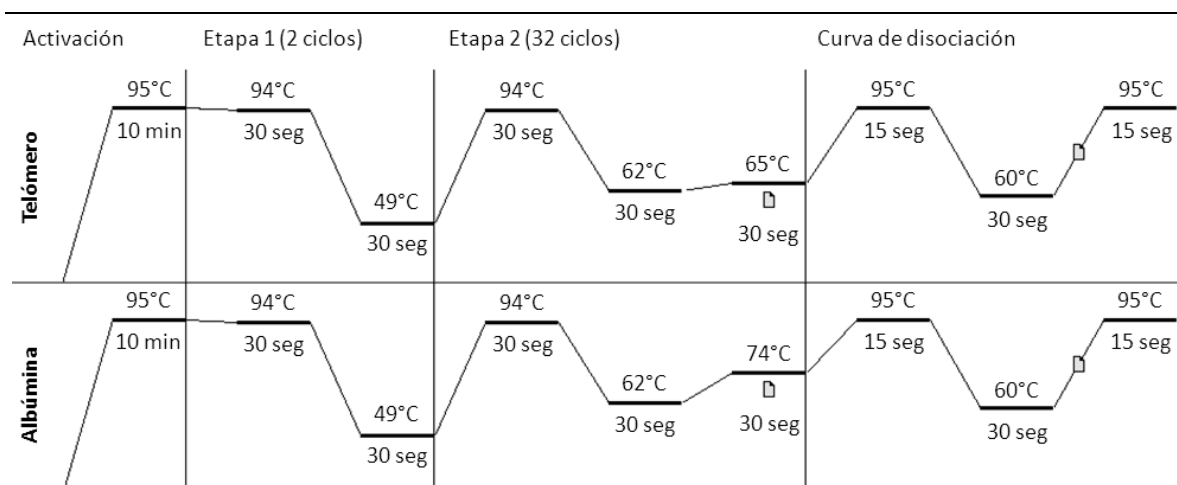


Figura 5
Perfiles térmicos para la amplificación de las secuencias del telómero y del gen de albúmina mediante qRT-PCR. □ = adquisición de datos.

Como estándar cuantitativo se empleó una muestra independiente de DNA humano. A partir de una solución *stock* de este DNA (concentración de 121.25 ng/μL) se prepararon cuatro diluciones seriales en proporción 1:3, usando agua desionizada estéril como solvente. Cada curva estándar comprendió, por lo tanto, cinco concentraciones y las

determinaciones se realizaron por cuadruplicado. Las muestras de controles y pacientes se corrieron por triplicado.

La relación entre la cantidad de amplicón telomérico (T) y la cantidad de amplicón del gen de albúmina (S), obtenidos mediante el ciclo umbral (C_T) para cada muestra en la qRT-PCR, expresada mediante el cociente T/S, permitió comparar la longitud relativa de los telómeros entre las diferentes muestras de tejido.

V.6. Análisis estadístico

La captura y procesamiento de los datos generados se realizó en la hoja de cálculo Microsoft Office Excel (Microsoft 2008). Para el análisis estadístico se utilizó el programa de cómputo SPSS versión 20 (IBM Corporation 2011). Se emplearon gráficos Q-Q para el análisis de las distribuciones de frecuencia para la longitud telomérica, análisis de regresión para la obtención de ecuaciones lineales de las curvas estándar, prueba *t* de Student para la comparación de la longitud telomérica entre los grupos estudiados, análisis de varianza (ANOVA) de un factor con prueba *post hoc* de Tukey para la comparación intergrupar con respecto a la longitud telomérica y ANOVA factorial univariante para la evaluación del efecto individual y conjunto de los marcadores de senescencia celular p16, p21 y p53 sobre la longitud telomérica.

VI. RESULTADOS

VI.1. Población estudiada

Las muestras analizadas en este estudio provinieron de 70 pacientes con síntomas de ERGE (52 mujeres, 18 hombres) y 50 individuos control (32 mujeres, 18 hombres). La edad promedio de los pacientes con ERGE fue de 42.94 años (20 a 62 años) y la de los individuos control de 40.92 años (20 a 58 años). Las Tablas 3 y 4 muestran las características de los individuos reclutados, y la detección de tres marcadores de senescencia celular (p16, p21 y p53) en muestras de esófago independientes, indicando la presencia o no de alteraciones histológicas relacionadas con reflujo (alargamiento papilar, infiltración de eosinófilos, hiperplasia basal, etc.), de acuerdo a los resultados preliminares del proyecto “*Estudio sobre senescencia celular y perfiles de expresión de micro RNA en la mucosa esofágica de pacientes con enfermedad por reflujo gastroesofágico*”.

Tabla 3
Características de los individuos control.

Muestra	Sexo	Edad (años)	p16	p21	p53	AHRE	Muestra	Sexo	Edad (años)	p16	p21	p53	AHRE
C02	F	58	-	+	+	NO	C27	F	44	-	-	-	SI
C03	F	47	-	-	-	NO	C28	F	54	-	-	-	NO
C04	F	41	-	-	+	NO	C29	F	47	-	-	-	SI
C05	M	34	-	+	+	SI	C30	M	33	-	-	-	SI
C06	F	48	-	-	+	NO	C31	M	47	-	-	-	NO
C07	F	52	-	-	-	NO	C32	M	40	+	-	+	NO
C08	F	45	-	-	+	NO	C33	M	39	+	-	-	SI
C09	F	42	-	-	-	NO	C34	M	31	-	-	-	NO
C10	M	39	-	-	-	NO	C35	F	40	+	+	+	NO
C11	F	50	-	-	+	SI	C36	F	32	+	-	+	NO
C12	F	45	-	-	-	NO	C37	M	58	-	+	-	NO
C13	M	41	-	-	-	NO	C38	M	40	-	+	+	NO
C14	F	33	-	-	-	NO	C39	M	46	-	-	NR	SI
C15	M	44	-	-	-	SI	C40	F	44	-	+	+	SI
C16	F	35	-	-	-	SI	C41	M	39	-	+	-	NO
C17	F	57	-	-	-	NO	C42	F	40	+	+	-	NO
C18	M	38	+	+	-	SI	C43	F	46	+	+	+	NR
C19	M	41	-	-	NR	SI	C44	F	29	+	-	-	NR
C20	F	33	-	+	-	SI	C45	F	38	-	-	-	NR
C21	F	28	-	+	-	SI	C46	M	45	-	-	-	NR
C22	F	52	+	-	-	SI	C47	F	38	+	+	-	NR
C23	M	21	-	+	NR	SI	C48	F	20	+	+	-	NR
C24	F	39	-	-	-	NR	C49	F	53	NR	NR	NR	NR
C25	M	47	+	+	+	NO	C50	F	31	NR	NR	NR	NR
C26	F	40	-	+	NR	SI	C51	F	22	NR	NR	NR	NR

AHRE: Alteraciones histológicas relacionadas con reflujo; F: femenino; M: masculino; -: negativo; +: positivo; NR: no reportado

Tabla 4
Características de los pacientes con ERGE.

Muestra	Sexo	Edad (años)	Calificación Carlsson-Dent	Evolución de ERGE (meses)	p16	p21	p53	AHRE
P01	F	45	13	24	-	-	-	SI
P02	F	60	5	8	-	-	-	SI
P03	M	50	12	180	+	+	+	NR
P04	F	58	6	48	+	+	-	SI
P05	F	60	8	24	+	-	-	NO
P06	M	30	9	36	-	+	-	SI
P07	M	20	9	5	-	-	-	SI
P08	F	56	4	24	-	-	-	SI
P09	F	53	13	36	+	-	-	SI
P10	F	24	13	6	+	-	-	SI
P11	F	45	11	6	+	-	-	SI
P12	M	39	11	6	+	-	-	SI
P13	F	32	6	36	+	-	-	SI
P14	F	51	16	72	-	-	-	SI
P15	M	29	5	36	+	+	+	NR
P16	M	27	10	7	-	+	-	NO
P17	F	47	8	24	-	-	-	NO
P18	F	34	7	264	-	+	-	SI
P19	F	48	12	96	+	-	+	NO
P20	M	32	12	72	-	-	-	NR
P21	F	60	9	5	-	-	-	SI
P22	M	30	11	72	-	-	-	SI
P23	F	47	11	24	+	-	-	NO
P24	F	22	9	48	+	+	+	SI
P25	F	56	10	36	+	+	+	NO
P26	F	62	3	36	+	-	-	SI
P27	M	52	12	24	-	-	-	NO
P28	M	43	7	24	+	-	-	NO
P29	F	36	9	36	-	-	-	SI
P30	F	40	14	18	-	+	+	NO
P31	F	49	10	120	-	+	+	SI
P32	F	51	9	84	-	-	+	SI
P33	M	33	11	12	-	+	+	SI
P34	M	53	11	12	-	-	-	SI
P35	F	37	7	12	-	+	+	NO
P36	F	52	12	96	-	-	+	SI
P37	F	33	8	24	+	+	-	NO
P38	F	53	13	240	-	-	-	SI
P39	F	59	14	36	-	-	-	SI
P40	M	42	11	60	-	-	-	NO
P41	M	46	12	96	-	-	-	NO
P42	F	53	11	24	-	-	-	SI
P43	F	35	13	24	-	-	-	NO
P44	F	31	11	2	-	-	-	NO
P45	F	30	11	12	-	-	-	NO
P46	F	39	11	120	-	-	-	SI
P47	F	45	9	12	-	-	-	NO
P48	F	46	2	120	-	-	-	NR
P49	M	58	16	72	-	+	+	NR
P50	F	45	10	36	-	+	+	SI

Tabla 4 (continuación)

Muestra	Sexo	Edad (años)	Calificación Carlsson-Dent	Evolución de ERGE (meses)	p16	p21	p53	AHRE
P51	F	49	7	36	-	+	+	NO
P52	F	48	14	108	-	-	-	SI
P53	F	40	11	120	-	-	-	NO
P54	F	42	13	18	-	+	+	NO
P55	M	33	7	3	-	-	-	SI
P56	F	32	12	12	-	-	-	SI
P57	F	45	7	24	-	-	-	NO
P58	F	57	13	60	-	-	-	SI
P59	F	53	6	240	-	-	-	NO
P60	M	41	10	7	-	-	-	SI
P61	F	43	12	120	-	-	-	NO
P62	F	32	12	48	+	-	+	SI
P63	M	56	11	12	-	-	+	NO
P64	F	30	14	6	+	+	-	SI
P65	F	34	11	60	+	+	-	NO
P66	F	44	9	120	-	+	+	SI
P67	F	41	11	12	-	-	-	NO
P68	F	22	12	3	+	-	-	SI
P69	F	33	14	24	+	-	-	SI
P70	F	53	16	72	-	+	-	NO

AHRE: Alteraciones histológicas relacionadas con reflujo; F: femenino; M: masculino; -: negativo; +: positivo; NR: no reportado.

VI.2. Extracción y cuantificación de DNA

La Figura 6 presenta a manera de ejemplo, el corrimiento electroforético del DNA purificado a partir de 10 muestras de esófago control y de 10 pacientes con ERGE.

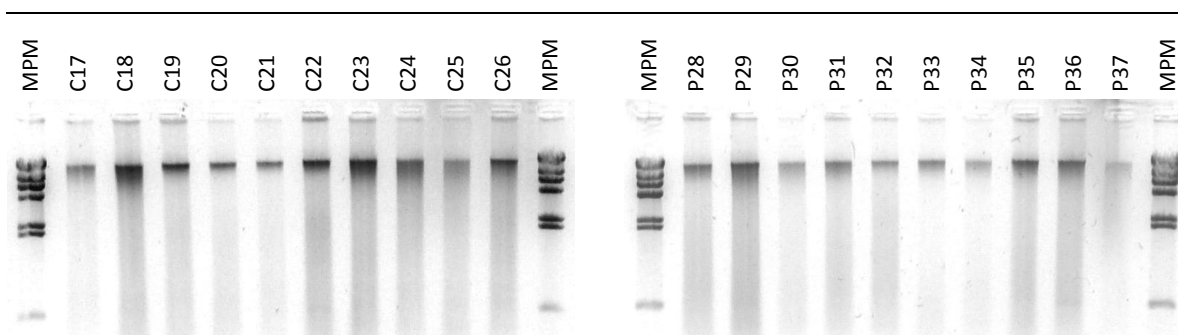


Figura 6

DNA genómico, purificado de un grupo de muestras de esófago, analizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. MPM = marcador de peso molecular λ /HindIII

Las tablas 5 y 6 presentan los resultados de la cuantificación espectrofotométrica de la concentración del DNA eluido en la purificación de las muestras. Esta concentración se utilizó posteriormente para calcular el volumen de DNA necesario en cada reacción de PCR.

Tabla 5.

Resultados de la cuantificación del DNA purificado a partir de las muestras de individuos control.

Muestra	Concentración DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Muestra	Concentración DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Muestra	Concentración DNA ($\mu\text{g/mL}$)
C02	48.5	C19	79.5	C36	154.5
C03	85.5	C20	56.5	C37	45.5
C04	40.5	C21	44.5	C38	82.5
C05	46.5	C22	97.5	C39	122.5
C06	76.5	C23	104.5	C40	53.5
C07	33.5	C24	87.5	C41	43.5
C08	105.5	C25	60.5	C42	59.5
C09	56.5	C26	86.5	C43	93.0
C10	51.5	C27	80.5	C44	79.0
C11	53.5	C28	84.5	C45	51.0
C12	103.5	C29	66.5	C46	73.0
C13	101.5	C30	75.5	C47	93.0
C14	76.5	C31	91.5	C48	44.0
C15	58.5	C32	24.5	C49	75.0
C16	32.5	C33	61.5	C50	31.0
C17	51.5	C34	55.5	C51	37.0
C18	106.5	C35	73.5		

Tabla 6

Resultados de la cuantificación del DNA purificado a partir de las muestras de pacientes con ERGE.

Muestra	Concentración DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Muestra	Concentración DNA ($\mu\text{g/mL}$)	Muestra	Concentración DNA ($\mu\text{g/mL}$)
P01	63.0	P25	44.0	P49	48.0
P02	64.0	P26	76.0	P50	49.0
P03	64.0	P27	62.0	P51	72.0
P04	49.0	P28	77.0	P52	94.0
P05	53.0	P29	115.0	P53	42.0
P06	34.0	P30	34.0	P54	89.0
P07	49.0	P31	69.0	P55	64.0
P08	43.0	P32	56.0	P56	86.0
P09	24.0	P33	27.0	P57	117.0
P10	73.0	P34	24.0	P58	76.0
P11	42.0	P35	87.0	P59	69.0
P12	141.0	P36	88.0	P60	33.0
P13	72.0	P37	20.0	P61	56.0
P14	64.0	P38	62.0	P62	53.0
P15	21.0	P39	55.0	P63	30.0
P16	66.0	P40	107.0	P64	127.0
P17	58.0	P41	29.0	P65	37.0
P18	71.0	P42	58.0	P66	43.0
P19	80.0	P43	72.0	P67	54.0
P20	113.0	P44	64.0	P68	98.0
P21	57.0	P45	42.0	P69	75.0
P22	96.0	P46	52.0	P70	121.0
P23	52.0	P47	71.0		
P24	45.0	P48	43.0		

VI.3. Cuantificación relativa de la longitud telomérica mediante qRT-PCR

En la Figura 7 se presentan curvas de amplificación representativas, en este caso para las diluciones seriales de DNA empleadas para construir dos curvas estándar, una para la amplificación de la secuencia telomérica y otra para la de albúmina. La Figura 8 muestra las dos curvas estándar construidas a partir de los resultados graficados en la Figura 7, así como las ecuaciones de la recta y los coeficientes de correlación del modelo de regresión lineal utilizado. Las Tablas 8 y 9 presentan la concentración inicial de DNA amplificado, determinada a partir de las curvas estándar, y la longitud telomérica relativa (T/S) calculada para cada muestra analizada.

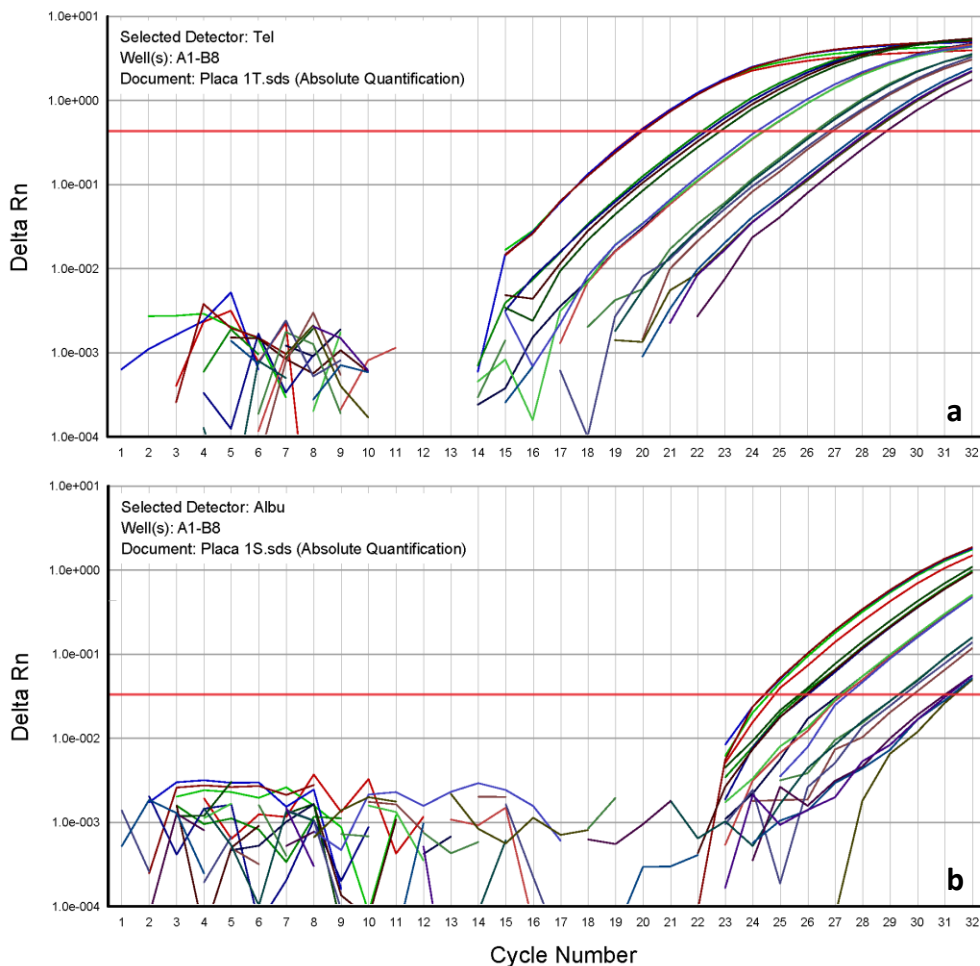


Figura 7

Curvas de amplificación para telómero (a) y albúmina (b).
La línea roja horizontal indica el umbral respectivo.

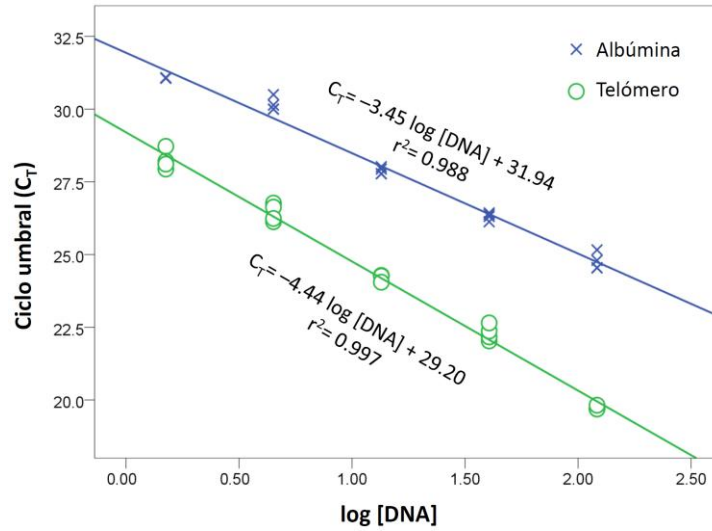


Figura 8

Curvas estándar para la amplificación de las secuencias de telómero y albúmina con su ajuste lineal correspondiente.

Tabla 8

Resultados de la cuantificación relativa mediante qRT-PCR de DNA telomérico en muestras de individuos control.

Muestra	log[DNA] _{Tel}	T (ng/μL)	log[DNA] _{Alb}	S (ng/μL)	T/S*	Muestra	log[DNA] _{Tel}	T (ng/μL)	log[DNA] _{Alb}	S (ng/μL)	T/S*
C02	0.921	8.336	1.071	11.775	0.708	C27	0.985	9.656	1.082	12.066	0.800
C03	1.014	10.329	1.142	13.880	0.744	C28	1.147	14.026	1.093	12.392	1.132
C04	1.004	10.082	1.001	10.033	1.005	C29	0.687	4.861	0.807	6.418	0.757
C05	0.969	9.311	0.949	8.898	1.046	C30	0.763	5.799	0.804	6.375	0.910
C06	1.157	14.370	1.241	17.412	0.825	C31	0.883	7.646	0.953	8.978	0.852
C07	0.840	6.917	1.019	10.443	0.662	C32	0.861	7.260	0.846	7.015	1.035
C08	1.157	14.345	1.308	20.344	0.705	C33	0.881	7.607	0.865	7.334	1.037
C09	1.211	16.274	1.259	18.164	0.896	C34	1.043	11.049	0.940	8.703	1.270
C10	0.846	7.013	1.005	10.123	0.693	C35	0.940	8.720	0.959	9.098	0.958
C11	0.923	8.380	1.075	11.880	0.705	C36	1.069	11.718	1.234	17.144	0.684
C12	0.898	7.915	1.182	15.204	0.521	C37	0.829	6.751	0.954	8.998	0.750
C13	0.781	6.034	1.011	10.259	0.588	C38	1.042	11.011	1.158	14.383	0.766
C14	0.919	8.308	0.934	8.587	0.967	C39	0.757	5.709	1.047	11.138	0.513
C15	0.980	9.556	1.080	12.013	0.796	C40	0.754	5.680	0.903	7.998	0.710
C16	0.535	3.429	0.749	5.616	0.610	C41	0.969	9.311	1.063	11.567	0.805
C17	1.077	11.943	1.057	11.414	1.046	C42	0.895	7.847	0.936	8.626	0.910
C18	1.086	12.194	1.125	13.336	0.914	C43	0.611	4.083	0.886	7.684	0.531
C19	0.989	9.740	1.013	10.304	0.945	C44	0.667	4.648	0.950	8.918	0.521
C20	0.732	5.393	0.586	3.858	1.398	C45	0.803	6.355	0.855	7.156	0.888
C21	0.810	6.455	0.744	5.542	1.165	C46	0.851	7.098	1.019	10.443	0.680
C22	0.893	7.820	0.949	8.898	0.879	C47	0.693	4.929	1.065	11.619	0.424
C23	1.091	12.342	1.168	14.739	0.837	C48	1.056	11.379	1.064	11.593	0.982
C24	0.660	4.568	0.710	5.127	0.891	C49	1.024	10.564	0.957	9.058	1.166
C25	0.931	8.526	0.988	9.726	0.877	C50	1.112	12.954	1.119	13.159	0.984
C26	1.037	10.879	0.995	9.878	1.101	C51	0.659	4.560	0.791	6.180	0.738

* T/S promedio ± desviación estándar = 0.847 ± 0.206, n=50. Se muestran en rojo los valores inferiores a la media y en azul los superiores a la media.

Tabla 9
Resultados de la cuantificación relativa mediante qRT-PCR de DNA telomérico en muestras de pacientes con ERGE.

Muestra	log[DNA] _{Tel}	T (ng/μL)	log[DNA] _{Alb}	S (ng/μL)	T/S*
P01	1.066	11.638	1.176	15.003	0.776
P02	1.329	21.311	1.346	22.187	0.961
P03	1.097	12.514	1.177	15.020	0.833
P04	1.243	17.500	1.345	22.137	0.791
P05	0.760	5.749	0.762	5.781	0.994
P06	0.965	9.215	0.857	7.188	1.282
P07	0.919	8.293	0.924	8.399	0.987
P08	1.453	28.394	1.436	27.282	1.041
P09	0.872	7.450	0.743	5.530	1.347
P10	1.304	20.130	1.295	19.721	1.021
P11	1.086	12.194	0.836	6.860	1.777
P12	1.278	18.948	1.035	10.845	1.747
P13	1.021	10.491	0.844	6.984	1.502
P14	1.059	11.458	1.101	12.615	0.908
P15	1.592	39.060	1.491	30.967	1.261
P16	0.888	7.726	1.037	10.893	0.709
P17	1.416	26.043	1.553	35.702	0.729
P18	0.934	8.585	0.828	6.725	1.277
P19	1.063	11.557	1.060	11.490	1.006
P20	1.376	23.743	1.146	14.004	1.695
P21	0.967	9.263	1.014	10.327	0.897
P22	1.046	11.126	1.240	17.374	0.640
P23	0.880	7.593	0.991	9.791	0.776
P24	1.106	12.776	0.982	9.597	1.331
P25	1.434	27.146	1.457	28.649	0.948
P26	0.765	5.819	0.905	8.033	0.724
P27	0.567	3.687	0.700	5.015	0.735
P28	1.185	15.319	1.177	15.036	1.019
P29	1.161	14.494	1.176	15.003	0.966
P30	0.925	8.409	0.947	8.859	0.949
P31	0.915	8.222	0.966	9.241	0.890
P32	0.701	5.024	0.670	4.681	1.073
P33	1.024	10.564	1.147	14.035	0.753
P34	0.896	7.874	0.981	9.576	0.822
P35	0.874	7.476	1.002	10.055	0.743

Muestra	log[DNA] _{Tel}	T (ng/μL)	log[DNA] _{Alb}	S (ng/μL)	T/S*
P36	1.052	11.262	0.988	9.726	1.158
P37	1.040	10.954	0.950	8.918	1.228
P38	0.749	5.611	0.664	4.608	1.218
P39	0.653	4.497	0.613	4.105	1.096
P40	1.260	18.178	0.974	9.428	1.928
P41	0.965	9.215	1.032	10.773	0.855
P42	0.888	7.726	0.864	7.317	1.056
P43	1.142	13.857	1.106	12.756	1.086
P44	0.913	8.193	0.807	6.418	1.277
P45	0.982	9.589	1.053	11.288	0.850
P46	0.844	6.989	0.819	6.591	1.060
P47	0.986	9.689	0.953	8.978	1.079
P48	1.276	18.883	1.421	26.387	0.716
P49	0.767	5.849	0.867	7.366	0.794
P50	1.034	10.823	1.152	14.192	0.763
P51	0.880	7.580	0.889	7.753	0.978
P52	1.081	12.047	1.087	12.228	0.985
P53	0.959	9.089	1.079	11.986	0.758
P54	0.717	5.209	0.835	6.845	0.761
P55	1.037	10.879	1.063	11.567	0.941
P56	1.067	11.678	1.040	10.966	1.065
P57	0.855	7.160	0.985	9.661	0.741
P58	0.928	8.482	0.916	8.251	1.028
P59	0.818	6.578	0.875	7.498	0.877
P60	1.225	16.789	1.070	11.749	1.429
P61	0.842	6.953	0.897	7.892	0.881
P62	0.717	5.209	0.761	5.768	0.903
P63	0.638	4.345	0.745	5.554	0.782
P64	1.248	17.682	1.245	17.568	1.006
P65	0.822	6.636	0.947	8.859	0.749
P66	0.625	4.219	0.613	4.105	1.028
P67	1.047	11.145	0.860	7.236	1.540
P68	1.034	10.804	1.090	12.310	0.878
P69	0.829	6.740	0.915	8.214	0.821
P70	1.122	13.248	1.051	11.238	1.179

* T/S promedio ± desviación estándar = 1.020 ± 0.278, n=70. Se muestran en rojo los valores inferiores a la media y en azul los superiores a la media.

La Figura 9 presenta la distribución de frecuencias de T/S en los dos grupos estudiados. En el caso de los individuos control, la distribución se ajusta a la curva normal (asimetría=0.279, error estándar=0.337). Para el caso de los pacientes con ERGE, la distribución es asimétrica con sesgo positivo (asimetría=1.325, error estándar=0.287).

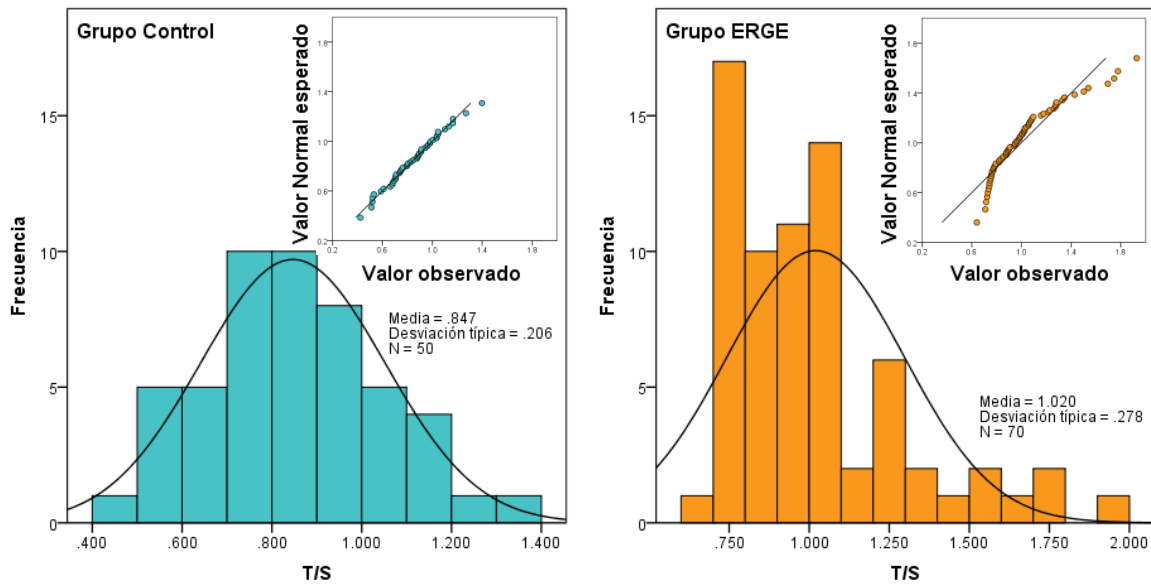


Figura 9

Distribución de frecuencias de la longitud telomérica relativa (T/S) en controles y pacientes en comparación con la distribución normal. Los recuadros presentan los gráficos de probabilidad Q-Q.

Para determinar si hay diferencia significativa entre la longitud telomérica promedio de los grupos analizados se utilizó la prueba *t* para muestras independientes. Se encontró que la longitud relativa promedio de los telómeros en las muestras control ($T/S=0.847\pm 0.206$, $n=50$) es menor con respecto a la de las muestras de pacientes con ERGE ($T/S=1.020\pm 0.278$, $n=70$), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0.0005$, Figura 10).

En la Figura 11 se presenta una comparación entre la edad de los pacientes y la T/S. En este caso no se encontró correlación estadísticamente significativa en ninguno de los dos grupos estudiados. En el caso de los pacientes con ERGE tampoco se encontró correlación entre la T/S y la calificación del cuestionario de Carlsson-Dent, ni entre la T/S y el tiempo de evolución de la enfermedad (datos no mostrados).

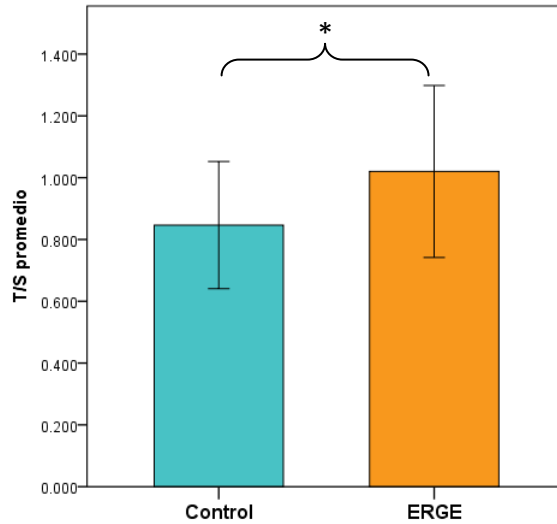


Figura 10
 Comparación de la longitud relativa de los telómeros (T/S) entre los grupos de individuos control (n=50) y pacientes con ERGE (n=70). Las barras de error indican la desviación estándar con respecto a la media (* $p < 0.0005$).

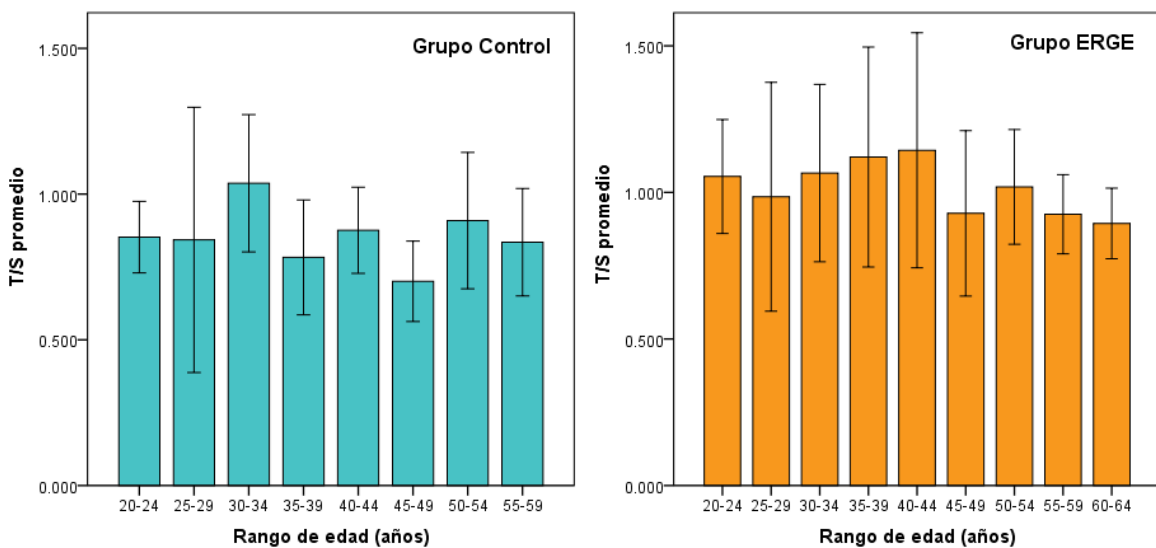


Figura 11
 Comparación de la longitud relativa de los telómeros (T/S) entre los grupos de edad en controles y pacientes. Las barras de error indican la desviación estándar con respecto a la media.

La Figura 12 presenta la comparación de los valores de T/S promedio entre los grupos de controles y pacientes con ERGE, con respecto a la presencia de tres marcadores de senescencia celular: p16, p21 y p53. Más allá de la propia diferencia de T/S entre los grupos control y ERGE, el ANOVA factorial no reveló diferencia que estuviera correlacionada con la presencia de estos tres marcadores para los grupos analizados.

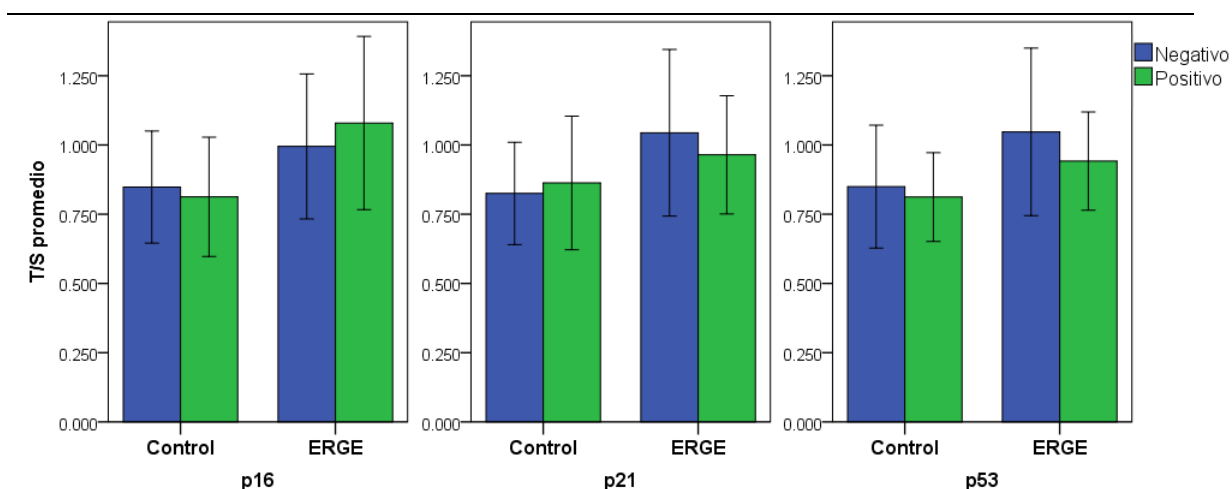


Figura 12
Comparación de la longitud relativa de los telómeros (T/S) con respecto a la presencia de tres marcadores de senescencia celular en controles y en pacientes con ERGE. Las barras de error indican la desviación estándar alrededor de la media.

Por último, observando que la presencia de alteraciones histológicas se detectó tanto en muestras de pacientes con ERGE como en muestras de individuos control, se procedió a realizar la comparación de la longitud telomérica promedio en los siguientes cuatro grupos de individuos: asintomáticos sin alteraciones histológicas ($T/S=0.843\pm 0.180$, $n=23$), asintomáticos con alteraciones histológicas relacionadas con reflujo ($T/S=0.890\pm 0.217$, $n=17$), sintomáticos sin alteraciones histológicas ($T/S=0.969\pm 0.279$, $n=27$) y sintomáticos con alteraciones histológicas relacionadas con reflujo ($T/S=1.051\pm 0.261$, $n=38$). Sólo se encontró diferencia significativa ($p<0.01$) entre la LT promedio del grupo de individuos asintomáticos sin alteraciones histológicas y la LT promedio del grupo de individuos sintomáticos con histología alterada (Figura 13).

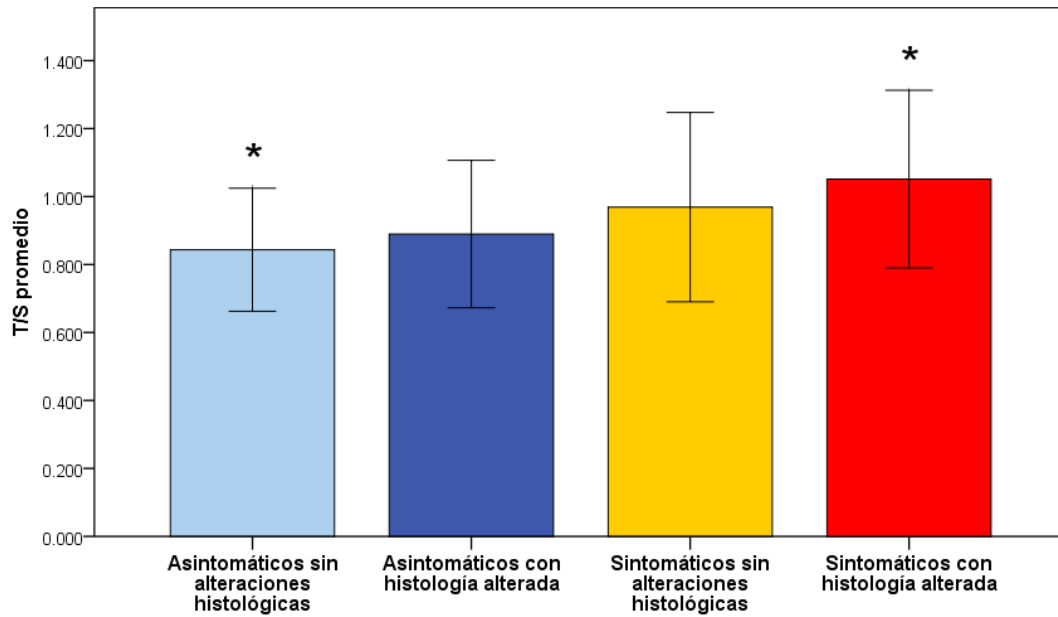


Figura 13

Comparación de la longitud relativa de los telómeros (T/S) entre los grupos de individuos sintomáticos y asintomáticos con o sin alteraciones histológicas. Las barras de error indican la desviación estándar con respecto a la media; *diferencia significativa entre estos grupos ($p < 0.01$).

VII. DISCUSIÓN

De acuerdo con la distribución de frecuencias de la LT (Figura 9), observamos que en el grupo control de nuestra muestra este parámetro presenta una variabilidad que se ajusta a la curva normal, en contraste con la distribución asimétrica de la LT en los pacientes con ERGE, en donde los telómeros tienden a presentar una mayor longitud dentro de un rango más estrecho (entre 0.75 y 1.10 según nuestra escala relativa).

Observando la comparación entre la LT media de los grupos control y ERGE, los resultados de nuestro estudio muestran que los telómeros en las muestras de pacientes con ERGE ($T/S=1.020\pm 0.278$) son, en promedio, aproximadamente 20.4% más largos que los de las muestras control ($T/S=0.847\pm 0.206$), con una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.0005$, Figura 10).

Nuestros resultados contrastan, por lo tanto, con los de Finley *et al.* (2006) y Souza *et al.* (2007) quienes encontraron telómeros más cortos en muestras de pacientes con ERGE. Aunque este es el escenario esperado para un tejido con proliferación alta, como la que se reporta en el esófago sometido constantemente a reflujo ácido, es necesario hacer notar que el grupo de Finley comparó la LT del esófago con ERGE con tejido epitelial estomacal del mismo paciente como referencia. En el caso del grupo de Souza, de un total de 38 pacientes en ese estudio, 25 presentaban esófago de Barrett además de ERGE, lo cual implica condiciones citológicas diferentes a las que se establecen durante la ERGE sin EB. En nuestro caso, la comparación de la LT se realizó en tejido esofágico de un grupo de pacientes con síntomas de ERGE sin EB con respecto al tejido esofágico de un grupo de individuos asintomáticos. Sin embargo, debido a diferentes fuentes de incertidumbre que se discutirán más adelante, nuestros resultados merecen corroboración adicional en poblaciones similares con un diseño experimental más estricto.

Respecto a la relación que tiene la LT con la edad de los individuos, los reportes más representativos evalúan los telómeros en muestras de tejidos que en condiciones normales presentan una tasa de proliferación alta, particularmente células germinales

hematopoyéticas y células del sistema inmune en muestras de sangre periférica (Aubert y Lansdorp 2008). En estos tejidos la LT es altamente variable entre los individuos de una misma edad, pero se puede observar una tendencia clara hacia el acortamiento de los telómeros en edades avanzadas. El estudio de la relación entre LT y edad para tejidos distintos a los mencionados es muy limitado. En las muestras de tejido esofágico del presente trabajo no encontramos evidencia de correlación entre la LT y la edad de los pacientes (Figura 11).

Tampoco encontramos correlación entre la LT y el tiempo de progreso de la enfermedad, cuya evaluación está condicionada al criterio subjetivo del paciente respecto al tiempo en que ha percibido los síntomas de ERGE. Lo mismo ocurre con respecto a la calificación del cuestionario de Carlsson-Dent, que si bien es una herramienta sumamente útil para el diagnóstico, no puede emplearse como una medida objetiva de la severidad del padecimiento.

Ahora bien, la presencia o ausencia de los marcadores de senescencia celular p16, p21 y p53 tampoco tuvo correlación significativa con la longitud telomérica en ninguno de los grupos (Figura 12), lo que sugiere la ausencia de mecanismos de senescencia en el tejido estudiado.

Por otra parte, como puede apreciarse a partir de las Tablas 3 y 4, existen individuos tanto asintomáticos como sintomáticos cuyas biopsias de esófago revelan alteraciones histológicas relacionadas con reflujo (alargamiento papilar, infiltración de eosinófilos, hiperplasia basal, entre otras). Al reagrupar nuestras muestras de acuerdo a la presencia o ausencia de síntomas de ERGE y de alteraciones histológicas (Figura 13) y realizar el análisis de varianza entre los cuatro grupos resultantes, encontramos que la T/S es significativamente diferente ($p < 0.01$) entre los individuos control con histología normal y los pacientes sintomáticos con alteraciones histológicas. Una posible explicación a estas observaciones es que los diferentes individuos podrían reflejar una susceptibilidad variable al reflujo ácido (Remes *et al.* 2011).

Con respecto a las probables fuentes de incertidumbre en nuestro estudio, es necesario hacer las siguientes anotaciones. Para los análisis correspondientes a las Figuras 12 y 13 se excluyeron las muestras cuya evaluación de marcadores de senescencia o de alteraciones histológicas no estuvo disponible. Entre las razones para esta ausencia de datos cabe mencionar que, en más de un caso, las biopsias destinadas al análisis histológico no correspondían a tejido esofágico, sino estomacal. Como se sabe, la recolección de especímenes endoscópicos implica un proceso de muestreo independiente en el que cada muestra de tejido es retirada una por una desde la zona de muestreo (unión gastroesofágica en este caso) hasta el exterior del paciente. Además, la presencia de ulceraciones en los pacientes con ERGE erosiva avanzada dificulta la toma de muestras. Por lo tanto existe la posibilidad de que las muestras obtenidas en una misma sesión endoscópica no provengan exactamente de la misma zona muestreada. Estas circunstancias añaden cierta incertidumbre a nuestros resultados, puesto que para el análisis de longitud telomérica se extrajo DNA de un solo espécimen endoscópico, sin posibilidad de corroborar su origen tisular con las técnicas y métodos utilizados. El volumen de cada espécimen es tan pequeño (2 a 4 mm³) que para la extracción de DNA debe utilizarse por completo uno de ellos, sin la posibilidad de apartar una porción del mismo para realizar ensayos adicionales. Por lo tanto, resulta altamente recomendable que en futuros diseños experimentales similares al nuestro se busque la posibilidad de aumentar el tamaño del espécimen endoscópico colectado, sin causar daño al individuo, o bien se implemente un control más estricto de la correspondencia entre las diferentes biopsias endoscópicas empleadas en las diferentes etapas del análisis.

Cabe mencionar también la dificultad que existe para reclutar individuos que sirvan como control en un estudio de este tipo. Dada la alta incidencia estimada de ERGE en la población mexicana, la mayoría de los pacientes atendidos en el Servicio de Endoscopia del Departamento de Gastroenterología del HGM presentan síntomas de reflujo. Esta es la razón por la cual el número de individuos control reclutados es menor al de pacientes con ERGE. En todo caso son pacientes con alguna afección gastrointestinal que eventualmente podría afectar nuestros resultados.

A pesar de las fuentes de incertidumbre en nuestro estudio es necesario que, de confirmarse la extensión telomérica en los pacientes con ERGE, se investiguen los posibles mecanismos que la promueven, incluyendo la actividad de telomerasa o la activación de vías alternativas de alargamiento telomérico en este tejido (Nabetani e Ishikawa 2011). También resultaría útil investigar las diferencias que puedan existir al comparar la longitud telomérica del tejido directamente afectado con tejido no expuesto a reflujo proveniente del mismo paciente, como el del esófago proximal. Esto podría proporcionar un control adicional (incluso con potencial diagnóstico) con el cual comparar el progreso o severidad del daño causado por el reflujo.

VIII. CONCLUSIONES

Se encontró que la longitud telomérica (T/S) promedio en las muestras de tejido esofágico de individuos control se ajusta a la distribución normal, con una T/S promedio de 0.847 y una desviación estándar de 0.206.

Se encontró que la longitud telomérica en las muestras de tejido esofágico de pacientes con ERGE presenta una distribución asimétrica con sesgo positivo, con una T/S promedio de 1.020 y una desviación estándar de 0.278.

La longitud telomérica promedio en el tejido esofágico distal fue significativamente menor en los individuos control que en los pacientes con ERGE ($p < 0.0005$).

No hubo evidencia estadísticamente significativa de una correlación entre la longitud telomérica promedio y la edad de los individuos, la presencia de marcadores de senescencia celular, el tiempo de evolución de la enfermedad o la calificación obtenida en el cuestionario de Carlsson-Dent en la población estudiada.

Al analizar la correlación entre la longitud telomérica promedio con respecto a la presencia o ausencia de síntomas de ERGE y de alteraciones histológicas, sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los individuos asintomáticos con histología normal y los pacientes sintomáticos con histología alterada.

A pesar de ciertas fuentes de incertidumbre relacionadas con la obtención de las muestras, los resultados aquí presentados podrían suponer la existencia de mecanismos de modificación de la longitud telomérica hacia un tamaño preferencialmente largo durante la ERGE. De corroborarse estas observaciones resultaría necesario dirigir la investigación a los mecanismos que promueven la extensión telomérica en los pacientes con ERGE con respecto a los pacientes control.

IX. PERSPECTIVAS

De acuerdo a la discusión y conclusiones anteriores proponemos, en resumen, que en caso de realizarse un diseño experimental similar al aquí descrito deberá implementarse un control más estricto de la correspondencia entre las biopsias endoscópicas de cada paciente, tomando en cuenta la posibilidad de corroborar el origen tisular de las muestras con técnicas adecuadas.

También deberá buscarse aumentar el número de individuos control, de preferencia tratando de reclutar personas ajenas a las que requieren la atención del servicio de endoscopía por problemas gastrointestinales.

De confirmarse la extensión telomérica en los pacientes con ERGE, es necesario investigar los posibles mecanismos que la promueven, incluyendo la actividad de telomerasa o la activación de vías alternativas de alargamiento telomérico en este tejido.

Resultará útil incluir además la recolección de muestras de tejido esofágico no expuesto a reflujo, como el del esófago proximal, tanto en los pacientes con ERGE como en los controles. Esto proporcionaría un control adicional (incluso con potencial diagnóstico) con el cual comparar el progreso o severidad del daño causado por el reflujo.

X. ANEXOS

X.1. Cuestionario de Carlsson-Dent

Cuestionario de Carlsson-Dent

Fecha: _____
No de paciente: _____ (asignado por el investigador)
Nombre del paciente: _____
Expediente: _____ Género: _____ Edad: _____

- 1.- ¿Cuál de los siguientes enunciados describe mejor el malestar principal que siente en su estómago o en medio de su pecho?
(5) _____ Sensación de quemadura o ardor que inicia en el estómago, o en la parte baja del pecho y que sube hacia su cuello.
(0) _____ Mareo o náusea.
(1) _____ Dolor en medio del pecho cuando traga.
(0) _____ Ninguna de las anteriores. Por favor describa su molestia.

- 2.- De acuerdo con su respuesta anterior, escoja usted lo que mejor describe el momento en el que ocurre la molestia principal
(-2) _____ En cualquier momento, no mejora ni empeora con alimentos.
(2) _____ La mayoría de las veces, en las siguientes dos horas de haber ingerido alimentos.
(0) _____ Siempre a una hora específica del día o de la noche sin relación alguna con los alimentos.

- 3.- ¿Qué le sucede a la molestia principal con lo siguiente?:

	Empeora	Mejora	Sin efecto
Comida más abundante de lo normal	_____ (1)	_____ (-1)	_____ (0)
Comida muy grasosa	_____ (1)	_____ (-1)	_____ (0)
Comida picante o condimentada	_____ (1)	_____ (-1)	_____ (0)

- 4.- ¿Qué efecto tienen los medicamentos para la indigestión sobre la molestia principal?

(0) _____ No mejora.
(3) _____ Alivio en los primeros 15 minutos.
(0) _____ Alivio después de 15 minutos.
(0) _____ No aplica (no toma medicamentos para la indigestión).

- 5.- ¿Qué efecto tiene acostarse boca arriba, agacharse o doblarse sobre su molestia principal? Marque la que mejor describa su caso.

(0) _____ Ninguno.
(1) _____ La desencadena o empeora.
(-1) _____ La alivia.
(0) _____ No sabe.

- 6.- De las siguientes opciones, ¿cuál describe mejor el efecto de cargar o realizar esfuerzos sobre la molestia principal?

(0) _____ Ninguno.
(1) _____ La desencadena o empeora.
(-1) _____ La alivia.
(0) _____ No sabe.

- 7.- Si algún alimento o líquido de sabor ácido se regresa a su garganta o boca ¿qué efecto tiene sobre su molestia principal?

(0) _____ Ninguno.
(1) _____ La desencadena o empeora.
(-1) _____ La alivia.
(0) _____ No sabe o no aplica (no se le regresan los alimentos o líquidos ácidos).

Suma total: _____
Resultado ≥ 4 es positivo como diagnóstico de ERGE

X.2. Carta de información y consentimiento

Página 1 de 3

**CARTA DE INFORMACIÓN PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROTOCOLO:
ESTUDIO SOBRE SENESCENCIA CELULAR Y PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICRO RNA EN
LA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD POR REFLUJO
GASTROESOFÁGICO**

Proyecto de investigación de riesgo mínimo

Hospital General de México
Departamento de Medicina Experimental, UNAM
México D.F.

A ___ de _____ de 20__

Nombre del paciente: _____

Expediente: _____ Género: _____ Edad: _____

- **Objetivos del estudio**

La senescencia celular es un mecanismo natural de las células relacionado con la regeneración de los tejidos, el envejecimiento y el cáncer. El presente estudio pretende denotar el papel de la senescencia en las transformaciones celulares del esófago, provocadas por la enfermedad por reflujo, previas al desarrollo de cáncer.

- **Justificación del estudio**

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido sobre los procesos celulares que intervienen en la enfermedad por reflujo gastroesofágico.

- **Procedimientos del estudio**

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos. Durante el estudio de endoscopia al que será sometido y que forma parte de los procedimientos necesarios para su diagnóstico, se le tomarán de 5 a 6 biopsias de la mucosa esofágica, es decir, se realizarán, con unas pinzas muy pequeñas, unos pellizcos para tomar un pequeño fragmento de la capa que reviste su esófago.

Las biopsias obtenidas durante el estudio serán analizadas en el Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM y en la Unidad de Patología del Hospital con distintas técnicas de laboratorio para determinar la presencia de senescencia celular.

- **Molestias esperadas**

Durante este proceso usted puede sentir un pinchazo o un leve dolor en la boca del estómago.

1

ESTUDIO SOBRE SENESCENCIA CELULAR Y PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICRO RNA EN LA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD POR REFLUJO GASTROESOFÁGICO

- **Riesgos asociados**

Actualmente no se han reportado riesgos o efectos secundarios relacionados con la toma endoscópica de biopsias del esófago, sin embargo, pudieran ocurrir algún efecto desconocido hasta el momento. En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario o requiera otro tipo de atención, ésta se le brindará en los términos que siempre se le ha ofrecido.

- **Beneficios**

Durante el estudio de endoscopia usted obtendrá un auxiliar en su diagnóstico, y al participar en el protocolo, usted contribuirá a la generación de conocimiento sobre la enfermedad por reflujo gastroesofágico.

Aclaraciones:

- Usted tiene el derecho de recibir la aclaración de cualquier duda que tenga sobre el procedimiento y otros asuntos relacionados con la investigación.
- Podrá retirarse del estudio en cualquier momento, si así lo desea, informando de sus razones al investigador responsable. Su decisión será respetada íntegramente.
- Su nombre, identidad y toda la información que nos proporcione será manejada con total privacidad. Los datos obtenidos durante el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.
- A lo largo del estudio usted podrá solicitar información al investigador responsable sobre los resultados obtenidos en este.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a recibir tratamiento médico en esta institución, así como una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio y no directamente del procedimiento diagnóstico (endoscopia).
- Los gastos adicionales al estudio de endoscopia que pudieran surgir como resultado del protocolo, serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

Investigador responsable:

Dr. David Kershenobich Stalinkowitz
Tel: 56232673
Director de Investigación
Hospital General de México
Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad
Departamento de Medicina Experimental
Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Hilda Hidalgo Loperena
Tel: 27892000 ext: 1368
directo: 50043855
Presidenta de la Comisión de Ética
Hospital General de México

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO SOBRE SENESCENCIA CELULAR Y PERFILES DE EXPRESIÓN DE MICRO RNA EN LA MUCOSA ESOFÁGICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD POR REFLUJO GASTROESOFÁGICO

Proyecto de investigación de riesgo mínimo

Hospital General de México
Departamento de Medicina Experimental, UNAM
México D.F.
A __ de _____ de 2009

Por medio de la presente, yo, _____, en pleno uso de mis facultades y sin que haya mediado violencia física o moral, manifiesto que he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

En caso de dudas puede dirigirse con:

Dr. David Kershenovich Stalinkowitz
Tel: 56232673
Director de Investigación
Hospital General de México
Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad
Departamento de Medicina Experimental
Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Hilda Hidalgo Loperena
Tel: 27892000 ext: 1368
directo: 50043855
Presidenta de la Comisión de Ética
Hospital General de México

Nombre y firma del paciente o representante legal

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ los propósitos del estudio; le he explicado los procedimientos a los que se someterá; y le he informado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre y firma del investigador o representante

X.3. Protocolo de purificación de DNA genómico mediante el kit QIAmp DNA mini kit® de QIAGEN

1. Descongelar el tejido a temperatura ambiente durante unos 5 min y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
2. Añadir 80 µl de solución PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 7.4) y homogenizar mecánicamente con unas tijeras quirúrgicas de punta fina.
3. Añadir 100 µl de buffer de lisis ATL® y 20 µl de proteinasa K.
4. Agitar la mezcla en vórtex e incubar durante 2.5 hrs a 56°C, con agitación periódica.
5. Centrifugar brevemente a velocidad máxima (15 seg a 16100×g).
6. Añadir 200 µl de buffer de lisis AL® e incubar a 70°C por 10 min.
7. Centrifugar 15 seg a 16100×g.
8. Añadir 200 µl de etanol absoluto y mezclar por 15 seg.
9. Centrifugar 15 seg a 16100×g.
10. Transferir la mezcla a una columna QIAmp mini spin® con tubo colector y centrifugar a 6000×g por 1 min.
11. Añadir 500 µl de buffer de lavado AW1® y centrifugar a 6000×g durante 1 min.
12. Añadir 500 µl de buffer de lavado AW2® y centrifugar 4 min a 16100×g.
13. Desechar el líquido filtrado y centrifugar nuevamente a 16100×g por 1 min, para eliminar restos de buffer.
14. Colocar la columna en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL.
15. Añadir 200 µl de buffer de elución AE® e incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
16. Centrifugar a 6000×g durante 1 min, colectando la solución de DNA en el tubo eppendorf.
17. Etiquetar adecuadamente la muestra y conservarla en congelación a -20°C.

XI. REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. **2008**. "Molecular biology of the cell"; 5a. edición, Garland Science, Taylor & Francis Group; Nueva York, E.U.A.
- Allshire, R., Dempster, M. y Hastie, N. **1989**. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Research* **17(12)**: 4611-4627.
- Allsopp, R. y Harley, C. **1995**. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental Cell Research* **219(1)**: 130-136.
- Artandi, S. y De Pinho, R. **2010**. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* **31(1)**: 9-18.
- Aubert, G. y Lansdorp, P. **2008**. Telomeres and aging. *Physiological Reviews* **88**: 557-579.
- Álvarez, J., Sobrino, S., Hernández, A., Alonso, J., de-la-Mora, J., Molina, A., Domínguez, H. y Herrera, J. **2010**. Dilated intercellular spaces in subtypes of gastroesophageal reflux disease. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* **102(5)**: 302-307.
- Baird, D., Rowson, J., Wynford-Thomas, D. y Kipling, D. **2003**. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nature Genetics* **33(2)**: 203-207.
- Barron, R., Carmichael, R., Marcon, M. y Sándor, G. **2003**. Dental erosion in gastroesophageal reflux disease. *Journal of the Canadian Dental Association* **69(2)**: 84-89.
- Blot, W. y McLaughlin, J. **1999**. The changing epidemiology of esophageal cancer. *Seminars in Oncology* **26(5 Supl 15)**: 2-8.
- Bresadola, V., Adani, G., Londero, F., Leo, C., Cherchi, V., Lorenzin, D., Rossetto, A., Vit, G., Baccarani, U., Terrosu, G. y De Anna, D. **2011**. Non-erosive and uncomplicated erosive reflux diseases: Difference in physiopathological and symptom pattern. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* **2(3)**: 42-48.
- Canela, A., Klatt, P. y Blasco, M. **2007**. *Telomere length analysis*, en "Methods in Molecular Biology: Biological Aging: Methods and Protocols", pp 45-72. Humana Press Inc.; Totowa, New Jersey.

- Cawthon, R. **2002**. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* **30(10)**: e47.
- Cawthon, R. **2009**. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research* **37(3)**: e21
- Cesare, A. y Reddel, R. **2010**. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature Reviews Genetics* **11**: 319-330.
- Cosme, W., Shen, M., Lazar, A., Pathak, S., Lozano, G., Multani, A. y Chang, S. **2007**. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Reports* **8(5)**: 497-503.
- Childs, G. **1998**. Microanatomy Web Atlas. URL: <http://microanatomy.net/>
- Chiocca, J. y Salis, G. **2007**. Reflexiones acerca de la redefinición y clasificación de la enfermedad por reflujo gastroesofágico: a propósito del Consenso de Montreal. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana* **37**: 213-215.
- Chung, I., Osterwald; S., Deeg, K. y Rippe, K. **2012**. PML body meets telomere: The beginning of an ALternate ending? *Nucleus* **3(3)**: 1-13.
- d'Adda di Fagagna, F. **2008**. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews. Cancer* **8(7)**: 512-522.
- de Lange, T. **2005**. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development* **19**: 2100-2110.
- de Lange, T. **2009**. How telomeres solve the end-protection problem. *Science* **326**: 948-952.
- DeVault, K y Castell, O. **2005**. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *American Journal of Gastroenterology* **100**: 190-200.
- DiPalma, J. **2001**. Management of severe gastroesophageal reflux disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* **32(1)**: 19-26.
- Durant, S. **2012**. Telomerase-independent paths to immortality in predictable cancer subtypes. *Journal of Cancer* **3**: 67-82.
- Fass, R. y Ofman, J. **2002**. Gastroesophageal reflux disease – should we adopt a new conceptual framework? *American Journal of Gastroenterology* **97**: 1901-1909.

- Finley, J., Reid, B., Odze, R., Sánchez, C., Galipeau, P., Li, X., Self, S., Gollahon, K., Blount, P. y Rabinovitch, P. **2006**. Chromosomal Instability in Barrett's Esophagus Is Related to Telomere Shortening. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **15**: 1451-1457.
- Forsyth, N., Wright, W. y Shay J. **2002**. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation* **69(4-5)**: 188-197.
- Fullard, M., Kang, J., Neild, P., Poullis, A. y Maxwell, J. **2006**. Systematic review: does gastro-oesophageal reflux disease progress? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **24**: 33-45.
- Gertler, R., Doll, D., Maak, M., Feith, M. y Rosenberg, R. **2008**. Telomere length and telomerase subunits as diagnostic and prognostic biomarkers in Barrett carcinoma. *Cancer* **112(10)**: 2173-2180.
- Gilson, E. y Géli, V. **2007**. How telomeres are replicated. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**: 825-838.
- Gómez, O., Remes, J. M., Ruiz, J. C., Peláez, M., Schmulson, M. J. y Valdovinos, M. Á. **2004**. Utilidad diagnóstica del cuestionario de Carlsson-Dent en la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE). *Revista de Gastroenterología de México* **69(1)**: 16-23.
- Griffith, J., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R., Bianchi, A., Moss, H. y de Lange, T. **1999**. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**: 503-514.
- Heidelbaugh, J., Nostrant, T., Kim, C. y Van Harrison, R. **2003**. Management of Gastroesophageal Reflux Disease. *American Family Physician* **68(7)**: 1311-1318.
- Holt, S., Wright, W. y Shay, J. **1997**. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *European Journal of Cancer* **33(5)**: 761-766.
- Hsu, C., Lee, L., Shai, S. y Chen, C. **2005**. Clinical significance of telomerase and its associate genes expression in the maintenance of telomere length in squamous cell carcinoma of the esophagus. *World Journal of Gastroenterology* **11(44)**: 6941-6947.
- Hultdin, M., Grönlund, E., Norrback, K., Eriksson-Lindström, E., Just, T. y Roos, G. **1998**. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Research* **26(16)**: 3651-3656.
- IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social), **2009**. "Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la dispepsia funcional"; IMSS; México.

- Kammori, M., Poon, S., Nakamura, K., Izumiyama, N., Ishikawa, N., Kobayashi, M., Naomoto, Y. y Takubo, K. **2007**. Squamous cell carcinomas of the esophagus arise from a telomere-shortened epithelial field. *International Journal of Molecular Medicine*. 2007 **20(6)**: 793-799.
- Kumar, S. y Gupta, D. **2009**. Asthma and gastroesophageal reflux: end of the blame game. *Lung India* **26(4)**: 100-101.
- Levy, M., Allsopp, R., Futcher, B., Greider, C. y Harley, C. **1992**. Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology* **225**: 951-960.
- Livstone E., Sheahan, D. y Behar J. **1977**. Studies of esophageal epithelial cell proliferation in patients with reflux esophagitis. *Gastroenterology* **73(6)**: 1315-1319.
- Lowe, S., Cepero, E. y Evan, G. **2004**. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**: 307-315.
- Lundblad, V. **2002**. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene* **21**: 522-531.
- Makarov, V., Hirose, Y. y Langmore, J. **1997**. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**: 657-666.
- Meeker, A., Gage, W., Hicks, J., Simon, I., Coffman, J., Platz, E., March, G. y De Marzo, A. **2002**. Telomere length assessment in human archival tissues. *American Journal of Pathology* **160(4)**:1259-1268.
- Meeker, A., Hicks, J., Iacobuzio, C., Montgomery, E., Westra, W., Chan, T., Ronnett, B. y De Marzo A. **2004**. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clinical Cancer Research* **10**: 3317-3326.
- Nabetani, A. e Ishikawa, F. **2011**. Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *The Journal of Biochemistry* **149(1)**: 5-14.
- O'Callaghan, N., Dhillon, V., Thomas, P. y Fenech, M. **2008**. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *BioTechniques* **44**: 807-809.
- Peralta-Pedrero, M.L., Lagunes-Espinosa, A.L., Cruz-Avelar, A., Juárez-Cedillo, T., Rodríguez-Moctezuma, R., López-Carmona, J.M., Munguía-Miranda, C. **2007**. Frecuencia de síntomas de ERGE en adultos mayores que acuden a una unidad de medicina familiar. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **45(5)**: 447-452.

- Planzer, M. **2007**. Esofagitis eosinofílica. *Gastroenterología Latinoamericana* **18(2)**: 136-140.
- QIAGEN, **2001**. *Genomic DNA*, en "The Bench Guide. Protocols, hints, and tips for molecular biology labs". URL: <http://www.qiagen.com/literature/benchguide/>
- Ramos, C. y Huerta, J. **2006**. *Enfermedad de reflujo gastroesofágico*, en "Tópicos selectos de medicina interna". Asociación Peruana de Medicina Interna; Lima, Perú.
- Rayess, H., Wang, M. y Srivatsan, E. **2012**. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer* **130(8)**: 1715-1725.
- Remes, J., Ramírez, K. y Vela, M. **2011**. ¿Si no hay ácido no hay pirosis? Nuevos mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad por reflujo gastroesofágico. *Revista de Gastroenterología de México* **76(3)**:237-246.
- Riou, J., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Mégnin-Chanet, F., Hélène, C. y Mergny, J. L. **2002**. Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99(5)**: 2672-2677.
- Rudolph, K., Chang, S., Lee, H., Blasco, M., Gottlieb, G., Greider, C., y DePinho, R. **1999**. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96**: 701-712.
- Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury, G., Roosnek, E. y Lansdorp, P. **1998**. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nature Biotechnology* **16(8)**: 743-747.
- Sauer, P., Müller, M. y Kang, J. **1998**. Quantitation of DNA. *QIAGEN News* **2**: 23-26.
- Shammas, M., Koley, H., Beer, D., Li, Ch., Goyal, R., y Munshi, N. **2004**. Growth arrest, apoptosis, and telomere shortening of Barrett's-associated adeno-carcinoma cells by a telomerase Inhibitor. *Gastroenterology* **126(5)**: 1337-1346.
- Shammas, M., Qazi, A., Batchu, R., Bertheau, R., Wong, J., Rao, M., Prasad, M., Chanda, D., Ponnazhagan, S., Anderson, K., Steffes, C., Munshi, N., De Vivo, I., Beer, D., Gryaznov, S., Weaver, D. y Goyal, R. **2008**. Telomere maintenance in laser capture microdissection-purified Barrett's adenocarcinoma cells and effect of telomerase inhibition in vivo. *Clinical Cancer Research* **14(15)**: 4971-4980.
- Shiraishi, H., Mikami, T., Aida, J., Nakamura, K., Izumiyama-Shimomura, N., Arai, T., Watanabe, M., Okayasu, I. y Takubo, K. **2009**. Telomere shortening in Barrett's

mucosa and esophageal adenocarcinoma and its association with loss of heterozygosity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **44(5)**: 538-544.

Souza, R., Lunsford T., Ramírez, R., Zhang, X., Lee, E., Shen, Y., Owen, Ch., Shay, J., Morales, C. y Spechler, S. **2007**. GERD is associated with shortened telomeres in the squamous epithelium of the distal esophagus. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **293**: G19–G24.

Spechler, S. **1992**. Epidemiology and natural history of gastro-oesophageal reflux disease. *Digestion* **51 Suppl 1**: 24-9.

Takubo, K., Fujita, M., Izumiyama, N., Nakamura, K., Ishikawa, N., Poon, S., Fujiwara, M., Sawabe, M., Matsuura, M., Grabsch, H., Arai, T. y Aida, J. **2010**. Q-FISH analysis of telomere and chromosome instability in the oesophagus with and without squamous cell carcinoma in situ. *Journal of Pathology* **221(2)**: 201-209.

Uscanga, L., Nogueira, J., Gallardo, E., Bernal, R., González, M., Ballesteros, A. y el GMEERGE. **2002**. Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico. Resultados del Consenso del Grupo Mexicano para el Estudio de la ERGE. Asociación Mexicana de Gastroenterología. *Revista de Gastroenterología de México* **67(3)**: 216-223.

Von Zglinicki, T. **2000**. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences* **908**: 99-110.

Waga, S. y Stillman, B. **1998**. The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 721-751.

Wetscher, G., Hinder, R., Bagchi, D., Hinder, P., Bagchi, M., Perdakis, G. y McGinn, T. **1995**. Reflux esophagitis in humans is mediated by oxygen-derived free radicals. *American Journal of Surgery* **170(6)**: 552-556.

Wu, G., Aziz, K. y Whalen, G., editores. **2003**. "An internist's illustrated guide to gastrointestinal surgery"; Humana Press; Nueva Jersey, E.U.A.

Wu, L., Multani, A., He, H., Cosme, W., Deng, Y., Deng, J., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S., Deng, Y., Behringer, R. y Chang, S. **2006**. *Pot1* deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* **126**: 49-62.