

Longitud de los Telómeros en Leucocitos Circulantes y Progresión de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Sara Estefanía Cazorla Rivero
2021



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría

TESIS DOCTORAL

Longitud de los Telómeros en Leucocitos Circulantes y Progresión de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Memoria presentada por la Licenciada en Biología

Sara Estefanía Cazorla Rivero

para la obtención del grado de Doctor

Director: Dr. Ciro Casanova Macario

Codirectora: Dra. Aída Elizabeth Córdoba Lanús

ULL- Unidad de Investigación HUNSC 2021

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Autorización del Director y la Codirectora de Tesis

El Dr. **Ciro Casanova Macario** y la Dra. **Aída Elizabeth Córdoba Lanús**, director y codirectora respectivamente, de la tesis doctoral presentada por la Licenciada en Biología **Sara Estefanía Cazorla Rivero**:

Certifican que:

La memoria presentada por la Licenciada en Biología Sara Estefanía Cazorla Rivero titulada *“Longitud de los telómeros en leucocitos circulantes y progresión de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica”*, realizada en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, reúne las condiciones de calidad y rigor científico, por lo que autorizan que pueda ser presentada y defendida ante la comisión nombrada al efecto para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Salud con Mención Internacional y mediante la modalidad por compendio, por la Universidad de la Laguna.

En Santa Cruz de Tenerife, a 12 de abril de 2021

Director

Fdo: **Dr. Ciró Casanova Macario**

Codirectora

Fdo: **Dra. Aída Elizabeth Córdoba Lanús**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las siguientes instituciones: al Fondo de Investigación Sanitario del Instituto de Salud Carlos III (PI 12/00355); fondos europeos de desarrollo regional, FEDER, por la financiación del proyecto de investigación "*Longitud telomérica en leucocitos circulantes y progresión de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica*"; a la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (PI13/007) por la finalización del proyecto "*Longitud telomérica en leucocitos circulantes y progresión de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica*"; a Laboratorios Menarini SA. por financiar el proyecto "*Longitud de los telómeros en leucocitos circulantes y progresión de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Biomarcadores de riesgo de cáncer de pulmón en pacientes con EPOC*".

Por último, agradezco al departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría de la Universidad de la Laguna, a la Comisión de Doctorado y a la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, por la autorización para realizar los estudios de doctorado en estos centros.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

A mis padres

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Agradecimientos

Quisiera mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a que esta tesis doctoral sea posible.

A mis directores por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral. Ciro, gracias por contar conmigo para formar parte de tu grupo, por el entusiasmo y profesionalidad transmitidos y por tu disposición para ayudarme siempre que lo he necesitado.

Eli, gracias por servirme de guía en este camino, enseñarme a ser una buena profesional y a luchar por conseguir lo que quiero. Gracias por tu amistad, por todas las horas que has invertido en mí sin recibir nada a cambio, y por tenerme en cuenta y ayudarme en todos los aspectos de la vida.

A Delia, por tu incansable trabajo, pero sobre todo por tu apoyo y tu ayuda, siempre dándome buenos consejos y muy buenos ratos en los momentos críticos. Tu positividad ante la vida hace ver que cualquier problema, por grande que sea, tenga fácil solución.

Quisiera agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, a los que hoy en día puedo llamar amigos (Cristina, Jessel, Elena, Félix, Carla, Silvia, Omar, Isa, Lari...) por el apoyo, por las horas de charlas y fiestas. Ustedes han sido fundamentales en todos estos años.

A mi compañero, amigo y marido. No tengo palabras para agradecerte tu apoyo. Siempre presente, ayudándome cuando lo he necesitado de una manera u otra. Has hecho posible que mi experiencia en esta isla fuese inolvidable. Tu paciencia y comprensión desde el inicio de mi carrera hasta hoy hacen que estos méritos también te pertenezcan.

A mis padres. Todo lo que tengo es gracias a ustedes. Gracias por apoyarme en todas las decisiones de mi vida, por darme la oportunidad de ser quien soy hoy en día y por estar tan orgullosos de cada paso que doy. Esta tesis es una pequeña demostración del gran esfuerzo que han hecho por mí, permitiéndome escoger mi futuro, pero, sobre todo, enseñándome a ser mejor persona.

A los que ya no están, desgraciadamente muchos. Lo que daría porque estuvieseis. Las lágrimas que he derramado por vuestra ausencia me han enseñado algo, a darle importancia a las cosas que realmente lo merecen. No me imaginaba un futuro sin ustedes, pero la vida tiene estas cosas que te ponen a prueba. Sé que estaríais orgullosos de mí.

Y finalmente quería darme las gracias a mí misma. Pensaba que no era capaz, y lo he conseguido. Esto sólo es una demostración de que el esfuerzo y la constancia hacen posible que se consigan muchas cosas en la vida. Debido a las adversidades que se me han presentado durante este periodo, de las que, desgraciadamente, no tienen solución, me he permitido dudar, replantearme mi futuro y mi carrera, y aun así, he escogido seguir adelante con mis sueños.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ÍNDICE.

RESUMEN	5
I.- INTRODUCCIÓN	5
1.- Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	6
Definición.	6
1.1.- Prevalencia.	7
1.2.- Etiología.	8
1.3.- Patogenia.	10
1.4.- Comorbilidades.	12
1.5.- Mortalidad.	13
2.- EPOC y envejecimiento.	14
2.1.- Biomarcadores de envejecimiento.	15
2.2.- Telómeros y EPOC.	19
2.3.- Estructura telomérica.	20
2.3.1.- La telomerasa y proteínas del complejo shelterin.	22
II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	31
1.- Diseño del estudio.	32
2.- Cohortes de estudio.	32
2.1.- Sub-cohorte de pacientes con EPOC.	32
2.2.- Sub-cohorte de fumadores sin EPOC.	34
2.3.- Sub-cohorte de no fumadores sin EPOC.	36
2.4.- Sub-cohorte de pacientes no fumadores con obstrucción del flujo aéreo.	37
3.- Aspectos éticos y legales.	38

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

4.- Pruebas clínicas y de función pulmonar.	38
5.- Preparación de las muestras de sangre y suero.	39
5.1- Extracción y valoración del ADN.	40
5.2- Determinación de la longitud telomérica relativa mediante PCR a	41
5.3- Determinación de la longitud telomérica absoluta mediante Southern	46
6.- Análisis estadísticos.	48
IV. RESULTADOS	52
1.- Artículo 1.	53
1.1.- Resultados basales.	53
1.2.- Dinámica de la longitud de los telómeros.	54
1.3.- Relación del cambio de longitud de los telómeros y las variables clínicas y de función pulmonar.	56
2.- Artículo 2.	58
3.- Artículo 3.	62
3.1.- Análisis basal.	62
3.2.- TFR por análisis de transferencia Southern.	63
3.3.- Análisis longitudinal de la longitud de los telómeros.	64
3.4.- Acortamiento de la longitud de los telómeros y función pulmonar	65
3.5.- Longitud de los telómeros y riesgo de mortalidad.	65
V.- DISCUSIÓN	68
VI.- CONCLUSIONES	79
VII.- BIBLIOGRAFÍA	83
VIII.- ANEXOS	99

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ANEXO I	101
8.1.- Artículo 1	102
“Acortamiento telomérico y envejecimiento acelerado en EPOC: hallazgos en la cohorte BODE”	102
ANEXO II	113
9.1.- Artículo 2	114
“Telómeros más cortos en pacientes no fumadores con limitación de la vía aérea”	114
ANEXO III	129
10.1.- Artículo 3	123
“Dinámica de la longitud de los telómeros durante 10 años y resultados relacionados en pacientes con EPOC”	123

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Características antropométricas de la sub-cohorte de pacientes con EPOC durante el período de seguimiento_____	34
Tabla 2. Características antropométricas de la sub-cohorte de fumadores sin EPOC durante el período de seguimiento_____	35
Tabla 3. Características demográficas y clínicas de la sub-cohorte poblacional no fumadora sin enfermedad respiratoria, grupo control_____	36
Tabla 4. Características clínicas y de función pulmonar de la sub-cohorte control de pacientes no fumadores con obstrucción crónica del flujo aéreo_____	37
Tabla 5. Cebadores empleados en la reacción de qPCR para la determinación de la longitud telomérica_____	43
Tabla 6. Cantidades y concentraciones de cada uno de los componentes de la reacción de qPCR multiplex_____	43
Tabla 7. Condiciones de amplificación de la reacción de qPCR multiplex para la determinación de la longitud telomérica_____	44

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Enfisema	6
Figura 2. Bronquitis crónica	7
Figura 3. Tabla con las prevalencias de la EPOC en España, en las diferentes comunidades autónomas y diferenciadas por sexo	8
Figura 4. Mecanismos subyacentes al desarrollo de la EPOC. La respuesta inflamatoria en el pulmón ante agentes irritantes depende de la interacción multifactorial de distintos elementos, nocivos, ambientales y genéticos	11
Figura 5. Comorbilidades de la EPOC	13
Figura 6. Representación de los eventos biológicos que contribuyen al proceso envejecimiento	16
Figura 7. Representación de los telómeros de los cromosomas donde se observa el extremo 3' de ADN lineal formado por la secuencia TTAGGG	21
Figura 8. Interpretación esquemática del ADN lineal telomérico formando complicadas estructuras en una configuración de bucle en T con un bucle en D de desplazamiento	22
Figura 9. Replicación del ADN telomérico por parte de la telomerasa. El alargamiento de una cadena de ADN, a través del mecanismo de transcriptasa es seguido por la síntesis de la otra cadena de ADN telomérico por ADN polimerasa	23
Figura 10. Representación del complejo proteico shelterin unido al telómero, también llamado telosoma	25
Figura 11. Proceso de extracción de ADN mediante el uso de columnas de sílica	40

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Figura 12. La medición de la longitud de los telómeros se realizó mediante qPCR cuantitativa multiplex monocromática. Las lecturas a 74°C proporcionaron los valores de Ct para la amplificación de telómeros (T). Las lecturas a 88°C proporcionaron los valores de Ct para la amplificación de la albúmina_____42

Figura 13. Detección por quimioluminiscencia de los telómeros en cada muestra. Se establece un patrón de bandas para la posterior comparación con el Marcador de Peso Molecular (MWM). Cuanto mayor es el peso molecular del fragmento, mayor es la densidad óptica_____47

Figura 14. Longitud media relativa de los telómeros (T/S) en pacientes con EPOC (n = 121) frente a fumadores de la misma edad sin EPOC (n = 121)_____54

Figura 15. Dinámica de la longitud de los telómeros (relación T/S relativa) en pacientes con EPOC (n = 70) frente a la de fumadores de la misma edad sin EPOC (n = 73) después de 3 años de seguimiento (p = 0,001, utilizando GLIM - modelo lineal general para medidas repetitivas; diferencias T/S entre grupos p (T/Sxgroups) = 0,002) ____55

Figura 16. Correlación entre la longitud inicial de los telómeros y la tasa de cambio en el acortamiento telomérico en pacientes con EPOC después de un seguimiento de 3 años (r = -0,49, p = 0,001, ajustado por edad)_____56

Figura 17. Diagrama de flujo que representa la evaluación de los pacientes y los individuos sanos considerados para el análisis en el presente estudio_____58

Figura 18. Longitud de los telómeros (T/S) en pacientes no fumadores con obstrucción del flujo de aire, en comparación con fumadores con EPOC y controles sanos_____60

Figura 19. Longitud de los telómeros en pacientes con EPOC distribuidos por rango de edad al inicio del estudio, según se indica: ≤59 años (n = 83), 60-69 años (n = 95) y ≥70 años (n = 85) (p = 0,022)_____63

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Figura 20. Correlación entre la medida de la longitud de los telómeros por TFR y la relación T/S _____ 64

Figura 21. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con EPOC con diferentes longitudes teloméricas. Los pacientes se dividieron en tertiles de T/S (relación de longitud relativa de los telómeros): T1 (T/S largo), T2 (T/S medio) y T3 (T/S corto)

_____ 66

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ABREVIATURAS.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ANOVA: análisis de la varianza.
a tiempo real.

COPD: del inglés, *Chronic Obstructive
Pulmonary Disease*.

CV: Coeficientes de varianza.

DL_{co}: capacidad de difusión del
monóxido de carbono en el pulmón.

EPOC: enfermedad pulmonar
obstructiva crónica.

FEV₁: Volumen espiratorio forzado en el
primer segundo

FEV₁/FVC: cociente del volumen
espiratorio forzado en el primer segundo
y la capacidad vital forzada.

FVC: capacidad vital forzada.

GLIM: modelo lineal generalizado

GOLD: Iniciativa global para el estudio
de la EPOC, del inglés, *Global Initiative
for Chronic Obstructive Lung Disease*.

HR: Hazard ratio.

IMC: Índice de masa corporal

IC/TLC: cociente entre la capacidad
inspiratoria y la capacidad pulmonar
total.

LOCF: arrastre de la última
observación disponible, del inglés, *last
observation carried forward*.

mMRC: escala modificada para el
estudio de la disnea, del inglés, *modified
Medical Research Council*.

KCO: coeficiente de transferencia
alveolo-capilar del monóxido de
carbono.

PaO₂: presión parcial de oxígeno en la
sangre arterial.

PaCO₂: presión parcial de dióxido de
carbono en la sangre arterial.

PM6M: prueba de la marcha de 6
minutos.

qPCR: Reacción en cadena de la
polimerasa.

TL: longitud telomérica.

T/S: ratio de la longitud telomérica
relativa.

T/S_mCh: Cambio en T/S con
respecto a su media en el tiempo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

RESUMEN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

RESUMEN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) puede estar asociada con un envejecimiento acelerado. El acortamiento telomérico es el biomarcador de envejecimiento por excelencia. En este trabajo se contó con una cohorte bien caracterizada con seguimiento anual, de 681 pacientes fumadores con EPOC, fumadores sin EPOC, controles no fumadores sin enfermedad respiratoria, y pacientes no fumadores con obstrucción de la vía aérea similar a la EPOC. Se realizaron mediciones anuales de longitud telomérica relativa mediante qPCR a toda la cohorte y se recogió en una base de datos las variables clínicas y de función pulmonar de cada paciente en cada visita. Las medidas absolutas de longitud telomérica se obtuvieron mediante la técnica de Southern Blot en un subgrupo de 40 pacientes de la cohorte.

En el estudio transversal se observó que los pacientes fumadores con EPOC, al ser comparados con los fumadores sin la enfermedad, presentaron un acortamiento acelerado de los telómeros, y esta tasa de desgaste dependía de la longitud inicial de los mismos. Así mismo, se observó que el acortamiento de los telómeros se asocia con la limitación del flujo de aire independientemente del tabaquismo, al analizar los pacientes fumadores con EPOC frente a los no fumadores con obstrucción de la vía aérea. El estudio longitudinal de la cohorte permitió encontrar una asociación significativa entre el acortamiento acelerado de los telómeros y el empeoramiento progresivo del intercambio gaseoso pulmonar, la hiperinsuflación pulmonar y afectación extrapulmonar en pacientes con EPOC a lo largo de 10 años de seguimiento. Además, los telómeros persistentemente más cortos durante este periodo de observación aumentaron el riesgo de mortalidad.

2

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) may be associated with accelerated aging. Telomere shortening has been proposed as a biomarker of aging. In this study, a well-characterized cohort with annual follow-up, of 681 smoking patients with COPD, smokers without COPD, non-smoking controls without respiratory disease, and non-smoking patients with COPD-like airway obstruction was analysed. Annual measurements of relative telomeric length were performed using qPCR in the entire cohort and the clinical and pulmonary function variables of each patient were collected in a database at each visit. Absolute measurements of telomere length were obtained using the Southern Blot technique in a subgroup of 40 patients in the cohort.

In the cross-sectional study, it was observed that smokers with COPD, when compared with smokers without the disease, presented accelerated telomere shortening, and this wear rate depended on their initial length. Likewise, it was observed that telomere shortening is associated with airflow limitation regardless of smoking when analysing smokers with COPD versus non-smokers with airway obstruction. The longitudinal study of the cohort found a significant association between accelerated telomere shortening and progressive worsening of pulmonary gas exchange, pulmonary hyperinflation, and extrapulmonary involvement in COPD patients over a 10-year follow-up. Furthermore, persistently shorter telomeres during this observation period increased the risk of all-cause mortality.

3

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

I.- INTRODUCCIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

1.- Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Definición.

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una enfermedad común, prevenible y tratable que se caracteriza por síntomas respiratorios persistentes y limitación del flujo de aire (definida espirométricamente por el cociente FEV1/FVC < 0,7) debido a anomalías en las vías respiratorias y / o alveolares generalmente causadas por una exposición significativa a partículas o gases nocivos, principalmente por el tabaco, e influenciados por factores del huésped incluyendo desarrollo pulmonar anormal. Se asocia frecuentemente con comorbilidades que pueden tener un impacto en la morbilidad y la mortalidad. (Agarwal *et al.*, 2013)

La respuesta inflamatoria que se produce juega un papel fundamental ya que contribuye a la aparición de dos patologías:

Enfisema: agrandamiento anormal y permanente de los espacios aéreos distales hasta los bronquiolos terminales, que se acompaña de la destrucción del parénquima sin fibrosis evidente y que generalmente se asocia al tabaquismo. **Figura 1**



Figura 1. Enfisema. Imagen adaptada disponible en <https://www.health.harvard.edu/media/content/images/cr/205041.jpg>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

Bronquitis crónica: implica el engrosamiento de las paredes de los bronquios e hipersecreción mucosa con tos y expectoración durante un periodo de al menos tres meses al año durante dos años consecutivos. **Figura 2**

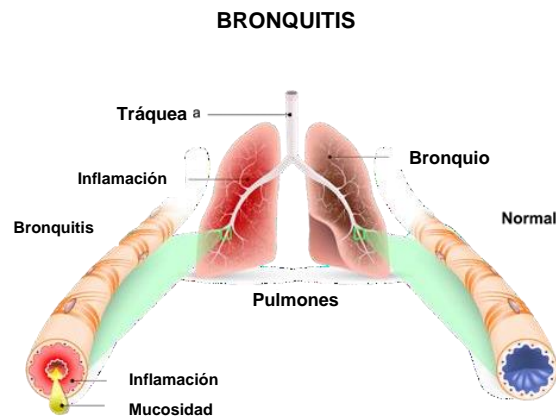


Figura 2. Bronquitis crónica. Imagen adaptada, disponible en <https://www.nationaljewish.org/NJH/media/img/Conditions/bronchitis.png?width=298&height=212>

1.1.- Prevalencia.

La EPOC es una enfermedad que aumenta con la edad. En nuestro país se han realizado tres estudios epidemiológicos importantes, IBERCOP, EPISCAN I y II. Según el estudio EPIS-CAN II (2021) el 11,8 % de la población mayor de 40 años en España padece enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), concretamente en Canarias es del 11,1%. Las diferencias son significativas entre hombres y mujeres, con una prevalencia del 14,6 % y del 9,4 % en el ámbito nacional, respectivamente, mientras que en la comunidad canaria estos porcentajes van desde el 14,9 % en hombres y 8,9% en mujeres.

7

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

La EPOC es una enfermedad infradiagnosticada, con un 74,7% de pacientes que desconocen que la padecen en toda España, siendo este dato en Canarias del 70,6%.

En mayores de 80 años, la prevalencia aumenta hasta el 34,7 % en hombres y el 26,1% en mujeres, por lo que, de media, la EPOC afecta a casi uno de cada tres individuos mayores de esta edad. (Soriano *et al.*, 2021) (Figura 3)

CC.AA.	Prevalencia EPOC (%)			Prevalencia infradiagnóstico (%)
	Hombres	Mujeres	Ambos sexos	
Andalucía	10,2	6,7	8,5	79,6
Aragón	14,5	10,7	12,6	76
Asturias	9,1	5,2	7,1	78
C. Valenciana	12,1	9,1	10,4	74
Cantabria	15,2	7,6	11,3	70,1
Castilla-La Mancha	13	6,4	9,7	87,3
Castilla y León	13,8	8,8	10,7	87,7
Cataluña	22,7	11,9	17,3	80,6
Extremadura	21,1	12,7	16,9	82,3
Galicia	22,8	10,2	16,8	72,8
I. Baleares	13,6	8,5	11,1	71,2
I. Canarias	14,9	8,9	11,1	70,6
La Rioja	11,7	7,6	9,6	41,2
Madrid	11,5	16,6	14	67,9
Murcia	10,5	8,2	9,4	85,5
Navarra	16	12,3	13,5	68,2
País Vasco	16,5	6	10,1	60,7
TOTAL	14,6	9,4	11,8	74,7

Figura 3. Tabla con las prevalencias de la EPOC en España, en las diferentes comunidades autónomas y diferenciadas por sexo. (Soriano *et al.*, 2021)

1.2.- Etiología.

El tabaquismo es el factor de riesgo más importante de la progresión de la enfermedad.

En estudios prospectivos de cohortes se estima que el riesgo absoluto de desarrollar EPOC entre fumadores es 10 veces superior que entre no fumadores. Aun así, entre el 35 y el 50% de fumadores desarrollarán a lo largo de su vida una EPOC. El riesgo es

Introducción

proporcional al consumo acumulado de tabaco, de tal forma que el riesgo es del 26% en los fumadores de 15-30 paquetes al año, y se incrementa al 51% en los fumadores de más de 30 paquetes al año.

Una proporción de casos de EPOC ocurre en personas que no han fumado nunca. Entre estas personas no fumadoras, el tabaquismo pasivo es un factor de riesgo que se ha implicado en la patogenia de la EPOC. El tabaquismo pasivo es la inhalación involuntaria del humo de otra persona que fuma tabaco. Aunque se produzcan riesgos de salud inferiores a los del tabaquismo activo, obviamente, estos no solo son evitables, sino involuntarios. Diversos estudios observacionales han demostrado que el tabaquismo pasivo se asocia a un mayor riesgo de EPOC. **(Miravittles et al., 2017)**

También ha sido descrito como factor de riesgo la inhalación de otras sustancias procedentes del uso de biomasa (madera, carbón, residuos vegetales y abonos), fuente principal de energía en países en desarrollo, siendo a nivel mundial, este tipo de exposición muy significativo, lo que según la GOLD afecta alrededor de unos 3000 millones de personas. En el estudio National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III), en los EE. UU., se constató que la exposición ocupacional puede ser causa de un 19 % de los casos de EPOC.

No se ha definido claramente si la contaminación ambiental está implicada en el desarrollo de la EPOC. Se sabe que una gran exposición a la misma tiene una influencia nociva en personas con enfermedades del aparato respiratorio. **(GOLD, 2020)**

Existen otros factores como la alteración del desarrollo pulmonar durante la infancia **(Lange et al., 2015)**, una mala alimentación, el estado socioeconómico y padecer enfermedades tales como asma crónica, secuelas de tuberculosis o bronquiectasias que pueden llegar a provocar la aparición de obstrucción en la vía aérea en pacientes no fumadores. **(Salvi & Barnes, 2009)**

9

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

1.3.- Patogenia.

La patogenia de la EPOC depende de la interacción entre los factores ambientales y genéticos. Se han identificado varios mecanismos que intervienen en el desarrollo y evolución de la enfermedad.

El enfisema debido a la deficiencia de alfa-1-antitripsina (AAT) es una enfermedad autosómica recesiva, en la que bajas concentraciones de los niveles de esta proteína dan lugar a una afectación pulmonar enfisematosa, independiente del tabaco, aunque se agrava ante la exposición de este. Esta es la única forma de expresión de EPOC que está asociada con alteraciones en un solo gen y que no requiere interacción con factores ambientales (Lara, 2010). Todos los demás casos de la enfermedad parecen ser el resultado de alteraciones moleculares que se deben a una interacción compleja entre múltiples genes y factores ambientales.

Se han identificado distintos genes relacionados con la disminución de la relación entre el volumen espirado en el primer segundo (FEV₁) y la capacidad vital forzada (FVC) como el gen de la SERPINA2 que codifica un inhibidor del plasminógeno tisular que se expresa en el epitelio de la vía aérea.

En los pacientes con EPOC el proceso inflamatorio persiste aún después de dejar de fumar. Estaríamos ante una posible etiopatogenia autoinmune con un desbalance entre proteinasas y antiproteinasas, favoreciendo el incremento de estrés oxidativo y disminuyendo o inactivando distintas antiproteinasas (α 1-antitripsina, inhibidores tisulares de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP)), a la vez que promoviendo la liberación de proteinasas (elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina L, catepsina S y proteinasa-3). (Díez *et al.*, 2009)

El estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la EPOC, ya que puede dañar directamente los componentes del tracto respiratorio y exacerbar otros

10

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

mecanismos involucrados. Se ha observado que existe un aumento de distintos marcadores de estrés oxidativo (ROS), tanto en el aire exhalado, como en la orina, en el suero/plasma de los pacientes con EPOC.

La inflamación crónica en la EPOC se asocia con un aumento en la producción de diversos mediadores y proteínas proinflamatorias, incluidas las citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatorias, receptores y moléculas de adhesión, que están reguladas por factores de transcripción génica. Destacan las citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 y entre los mediadores, los que son quimiotácticos para las células inflamatorias, en particular leucotrienos B4 y la IL-8. Los factores de crecimiento, incluido el TGF- β , que induce fibrosis en las vías respiratorias pequeñas, también se consideran importantes. Los elementos celulares más importantes en la inflamación en la EPOC son células epiteliales, neutrófilos, macrófagos alveolares, linfocitos CD8 y eosinófilos.

(Cavalcante & Bruin, 2009) (Figura 4).

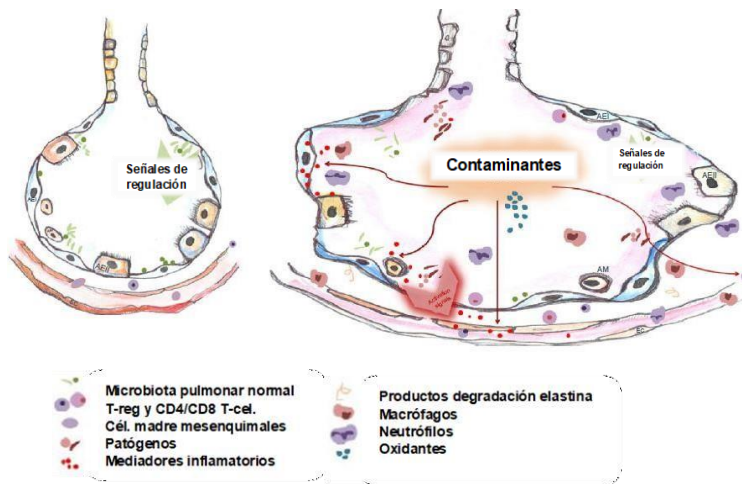


Figura 4. Mecanismos subyacentes al desarrollo de la EPOC. La respuesta inflamatoria en el pulmón ante agentes irritantes depende de la interacción multifactorial de distintos elementos, nocivos, ambientales y genéticos que van a dar lugar a diferentes patologías como respuesta del

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

sistema inmune. Imagen adaptada propiedad de **Cavalcante & Bruin, 2009** disponible en *International Journal of COPD*.

1.4.- Comorbilidades.

La EPOC a menudo coexiste con otras enfermedades (comorbilidades) que pueden tener un impacto significativo en el pronóstico. Algunas de ellas surgen independientemente de la EPOC, mientras que otras pueden estar relacionadas causalmente, ya sea con factores de riesgo compartidos o por una enfermedad que aumenta el riesgo o agrava la severidad de la otra.

Es posible que las características de la EPOC se compartan con otras enfermedades y, como tal, este mecanismo representa un vínculo entre la EPOC y algunas de sus comorbilidades (cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, osteoporosis, anemia normocítica, diabetes *mellitus*, hipertensión, síndrome metabólico). Además, se observa una mayor frecuencia de depresión y de trastornos de ansiedad. Este riesgo de enfermedad comórbida puede incrementarse por las secuelas de la EPOC, por ejemplo, reducción de la actividad física o fumar. **(Barnes & Celli, 2009)**

Independientemente de que la EPOC y las enfermedades comórbidas estén relacionadas o no, el manejo del paciente con EPOC debe incluir la identificación y el tratamiento de sus comorbilidades. Es importante destacar que las comorbilidades con síntomas también asociados con la EPOC pueden pasarse por alto, por ejemplo, insuficiencia cardíaca y cáncer de pulmón (disnea) o depresión (fatiga y reducción de la actividad física).

Hay evidencias de que existe una amplia asociación entre la EPOC y el cáncer de pulmón. La asociación entre enfisema y cáncer de pulmón es más fuerte que entre la

12

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

limitación del flujo de aire y el cáncer de pulmón. El mayor riesgo se observa en sujetos con ambos hallazgos. La edad avanzada y los antecedentes de tabaquismo aumentan aún más el riesgo.

Las comorbilidades aumentan el riesgo de hospitalización y mortalidad en pacientes con EPOC, especialmente a medida que la obstrucción de las vías respiratorias se vuelve más grave. (Barnes & Celli, 2009)

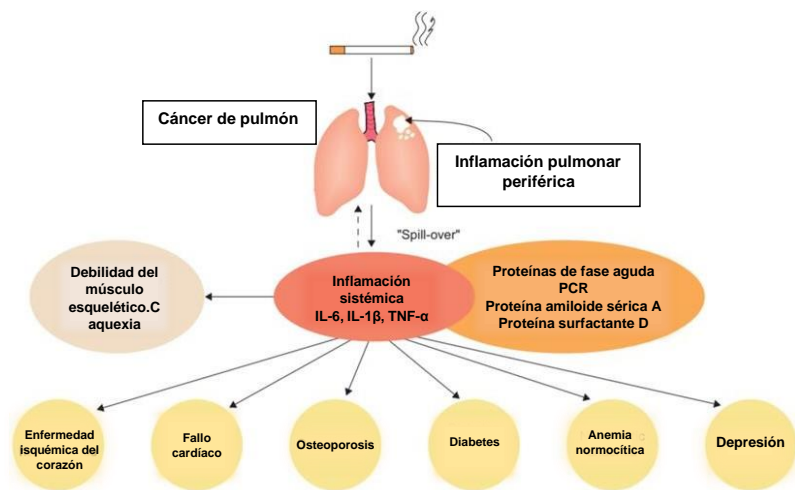


Figura 5. Comorbilidades de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Imagen adaptada propiedad de Barnes & Celli, 2009, disponible en *European Respiratory Journal*.

1.5.- Mortalidad.

La falta de reconocimiento y el infradiagnóstico de la EPOC afectan a la precisión de los datos de mortalidad. La institución GOLD: “estrategia mundial para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)” proyectó que la EPOC, que ocupó el sexto lugar

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

como causa de muerte en 1990, se convertiría en la tercera causa de muerte en todo el mundo para 2020. Actualmente es la tercera causa de muerte en países desarrollados detrás de las enfermedades cardiovasculares y neoplasias (**Soriano et al., 2017**). Este aumento de la mortalidad se debe principalmente a la creciente epidemia de tabaquismo (aumento de mujeres fumadoras), la reducción de la mortalidad por otras causas comunes de muerte y el envejecimiento de la población mundial, especialmente en los países de ingresos altos; y escasez de terapias eficaces para modificar la enfermedad. (**Vestbo et al., 2013**)

2.- EPOC y envejecimiento.

El envejecimiento es una degeneración progresiva de los tejidos que tiene un impacto negativo en la estructura y función de los órganos vitales. Es uno de los factores de riesgo más importantes para la mayoría de las enfermedades crónicas.

El envejecimiento se caracteriza por la pérdida de la integridad fisiológica, la disminución de la homeostasis, la degeneración progresiva de los tejidos y la capacidad reducida para responder a los estímulos ambientales, que contribuyen a un mayor riesgo de enfermedad y muerte. (**Kirkwood, 2005**)

El aumento mundial de la esperanza de vida ha ido acompañado de un aumento en la prevalencia de enfermedades relacionadas con la edad que resultan en una morbilidad y mortalidad significativas, y representan una enorme carga para la salud pública y los recursos económicos.

Muchos de los cambios que ocurren en los pulmones durante el envejecimiento normal, como la disminución de la función pulmonar, la pérdida de la retracción elástica

14

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

pulmonar y el agrandamiento de los espacios aéreos distales, también están presentes en la EPOC.

Se ha constatado la presencia de senescencia celular en los pulmones enfisematosos, estimada por diferentes factores como telómeros acortados, moléculas antienviejimiento disminuidas, y niveles elevados de inflamación y estrés oxidativo, en comparación con pulmones sanos, lo que sugiere un envejecimiento acelerado en los pulmones de pacientes con EPOC. **(MacNee, 2016)**

El hecho de que la prevalencia de la EPOC aumenta exponencialmente con la edad, y el que estos pacientes sufren de enfermedades propias del envejecimiento 10 o 20 años antes de lo observado en personas sin la enfermedad soportan esta hipótesis. **(Divo et al., 2018)**

Al estudiar otras enfermedades pulmonares como la fibrosis pulmonar idiopática, también se ha observado que entre el 20% y el 25% de estos pacientes tenían longitudes teloméricas por debajo del percentil 10 en relación con los sujetos control de la misma edad **(Cronkhite et al., 2008)**. Los telómeros cortos en algunos pacientes pueden ser el resultado de polimorfismos genéticos y de factores ambientales, como el tabaquismo.

2.1.- Biomarcadores de envejecimiento.

Existen distintas características biológicas que contribuyen al proceso de envejecimiento. Éstas se van manifestando con el paso de los años y han servido de biomarcadores de envejecimiento en multitud de estudios cuya finalidad es comprender cuál es el impacto del paso del tiempo en los diferentes organismos. **(Figura 6)**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción



Figura 6. Representación de los eventos biológicos que contribuyen al proceso de envejecimiento. Imagen propiedad de **López-Otín et al., 2013** disponible en *Cell*.

La inestabilidad genómica es uno de los eventos biológicos asociados al envejecimiento. El ADN a lo largo de la vida se ve continuamente atacado por agentes físicos, químicos y biológicos exógenos, así como por amenazas endógenas que incluyen errores en la replicación del ADN, reacciones hidrolíticas espontáneas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (**Hoeijmakers, 2009**). Para ello, los organismos han desarrollado mecanismos de reparación de ADN que son capaces de combatir la mayor parte del daño infligido al ADN nuclear. (**Lord & Ashworth, 2012**)

Existen regiones cromosómicas, como los telómeros, son particularmente susceptibles al deterioro relacionado con la edad (**Blackburn et al., 2006**). Las ADN polimerasas replicativas carecen de la capacidad de replicar completamente los extremos terminales de las moléculas de ADN lineales, una función especializada de la telomerasa. La mayoría de las células somáticas de mamíferos no expresan la telomerasa y esto conduce a la pérdida progresiva de las secuencias protectoras de los telómeros en los extremos cromosómicos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

Otro mecanismo importante en el proceso de envejecimiento lo constituyen las alteraciones epigenéticas que afectan a todas las células y tejidos a lo largo de la vida (**Talens et al., 2012**). Los cambios epigenéticos implican alteraciones en los patrones de metilación del ADN, modificación postraduccional de las histonas y remodelación de la cromatina. Los sistemas enzimáticos múltiples que aseguran la generación y el mantenimiento de patrones epigenéticos incluyen ADN metiltransferasas, histonas acetilasas, desacetilasas, metilasas y desmetilasas, así como complejos de proteínas implicados en la remodelación de la cromatina.

El envejecimiento y algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento están relacionadas con la homeostasis proteica o proteostasis (**Powers et al., 2009**). Todas las células aprovechan una variedad de mecanismos de control de calidad para preservar la estabilidad y la funcionalidad de sus proteomas. Todos estos sistemas funcionan de manera coordinada para restaurar la estructura de los polipéptidos mal plegados o para eliminarlos y degradarlos por completo, evitando así la acumulación de componentes dañados y asegurando la renovación continua de las proteínas intracelulares. En consecuencia, muchos estudios han demostrado que la proteostasis se altera con el envejecimiento (**Koga et al., 2011**). La expresión crónica de proteínas desplegadas, mal plegadas o agregadas contribuye al desarrollo de algunas patologías relacionadas con la edad, como el Alzheimer, el Parkinson y cataratas. (**Powers et al., 2009**)

Los polimorfismos genéticos o mutaciones que reducen las funciones de la hormona del crecimiento GH, receptor de IGF-1, receptor de insulina o efectores intracelulares como AKT, mTOR y FOXO, se han relacionado con la longevidad, lo que ilustra el gran impacto de vías tróficas y bioenergéticas en la longevidad. (**Barzilai et al., 2012; Fontana et al., 2010; Kenyon, 2010**)

17

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

La disfunción mitocondrial puede contribuir al envejecimiento al aumentar la producción de ROS. El envejecimiento está asociado con la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial. A medida que las células y los organismos envejecen, la eficacia de la cadena respiratoria tiende a disminuir, lo que aumenta la fuga de electrones y reduce la generación de ATP. **(Green et al., 2011)**

En cuanto al proceso de senescencia celular, cuyo objetivo principal es evitar la propagación y eliminar las células dañadas y potencialmente oncogénicas de los tejidos, se observado que las células senescentes aumentan a lo largo de la vida, asumiéndose que este proceso contribuye al envejecimiento. Se requiere un sistema eficiente de reemplazo celular que implique la eliminación de células senescentes y la movilización de progenitoras para restablecer el número de células. En organismos envejecidos, este sistema de renovación puede volverse ineficiente o agotar la capacidad regenerativa de las células progenitoras, lo que resulta en la acumulación de células senescentes que pueden agravar el daño y contribuir al envejecimiento.

Las células senescentes, a diferencia de las células apoptóticas, permanecen metabólicamente activas y exhiben el fenotipo secretor asociado a la senescencia.

La disminución del potencial regenerativo de los tejidos es característico del envejecimiento. Por ejemplo, la hematopoyesis disminuye con la edad, resultando en una disminución en la producción de células inmunes adaptativas, un proceso denominado inmunosenescencia, y en una mayor incidencia de anemia y neoplasias mieloides. **(Shaw et al., 2010)**

El envejecimiento también implica cambios a nivel de comunicación intercelular, ya sea endocrino, neuroendocrino o neuronal **(Laplante & Sabatini, 2012; Rando & Chang, 2012; Russell & Kahn, 2007; Zhang et al., 2013)**. Por lo tanto, la señalización neurohormonal tiende a desregularse en el envejecimiento a medida que aumentan las

18

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

reacciones inflamatorias, disminuye la inmunovigilancia contra los patógenos y las células premalignas, y la composición del entorno intra y extracelular cambia, lo que afecta las propiedades mecánicas y funcionales de todos los tejidos. **(López-Otín et al., 2013)**

2.2.- Telómeros y EPOC.

El acortamiento progresivo de los telómeros produce el envejecimiento de los organismos. Es por ello por lo que se consideran un biomarcador de la edad biológica **(Houben et al., 2008; Mather et al., 2011; Armanios, 2013).**

Algunos autores han propuesto que el acortamiento de los telómeros podría acelerarse en pacientes con EPOC y servir como un biomarcador de progresión de la enfermedad **(Houben et al., 2009)**, una teoría que tiene cierto respaldo clínico porque la longitud de los telómeros en leucocitos circulantes de pacientes con EPOC se ha relacionado con eventos importantes para la salud, como la mortalidad por todas las causas, cáncer **(Lee, et al 2012; Jin et al., 2018)**, exacerbaciones y peor función pulmonar. **(Albrecht et al., 2014; Rutten et al., 2016).**

Diferentes estudios han demostrado que los pacientes con EPOC exhiben telómeros más cortos en leucocitos circulantes en comparación con fumadores sin EPOC de la misma edad. **(Savale et al., 2009; Mui et al., 2009)**

En la población general, la longitud de los telómeros es heterogénea, y oscila entre las 5 y 15 Kilobases. La variabilidad de la longitud telomérica entre individuos parece estar determinada genéticamente **(Slagboom & Boomsma, 1994)**, y ciertos factores

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

ambientales como la obesidad, el hábito tabáquico o el estrés se han relacionado negativamente. (Epel, 2009)

Según estudios previos, los telómeros de leucocitos acortan entre 40 y 105 pares de bases por año (Houben *et al.*, 2011) y cuando alcanzan una longitud crítica, su capacidad para proteger el ADN disminuye, lo que resulta en la detención del ciclo celular y finalmente conduce a la senescencia o la muerte celular por apoptosis (Houben *et al.*, 2008). La longitud telomérica obtenida de cada paciente es un promedio de las diferentes longitudes teloméricas de las distintas poblaciones leucocitarias presentes en la sangre en el momento de la extracción. (Daniali *et al.*, 2013)

Un estudio reciente en población fumadora sin diagnóstico de EPOC con evaluación longitudinal de datos clínicos y con una sola medida de longitud telomérica al inicio del estudio, observó que aquellos fumadores con telómeros más cortos presentaban peor función pulmonar a lo largo del tiempo. (Andujar *et al.*, 2018)

Los estudios que sugieren una asociación entre la longitud de los telómeros y la función respiratoria fueron de diseño transversal. Ningún estudio de pacientes con EPOC midió la longitud de los telómeros a lo largo del tiempo ni exploró la asociación entre los cambios en la relación de la longitud de los telómeros con las variables clínicas y fisiológicas registradas longitudinalmente.

2.3.- Estructura telomérica.

Los telómeros, extremos de los cromosomas, son esenciales para la protección de éstos frente a la recombinación y a la degradación. Se trata de estructuras especiales de cromatina, que en el caso de los vertebrados están compuestos por repeticiones en

20

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

tándem de la secuencia TTAGGG en la hebra que constituye el extremo 3' de los cromosomas, denominada hebra rica en guanina (*G-rich strand*). (Greider & Blackburn, 1985) (Figura 7)

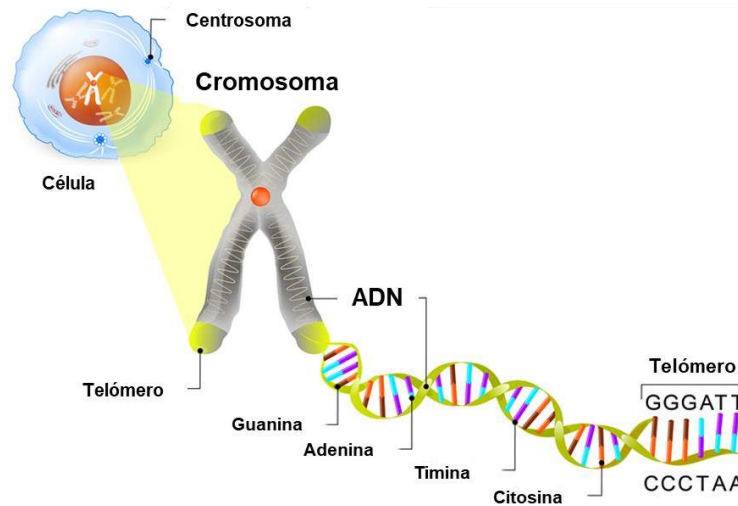


Figura 7. Representación de los telómeros de los cromosomas donde se observa el extremo 3' de ADN lineal formado por la secuencia TTAGGG. Imagen libre.

La hebra rica en guanina del ADN lineal telomérico presenta un extremo sobresaliente que puede formar complicadas estructuras. La formación de tales estructuras en los telómeros puede suponer un problema para la replicación del ADN y para la actuación de telomerasa (Gomez *et al.*, 2012). Figura 8

Introducción

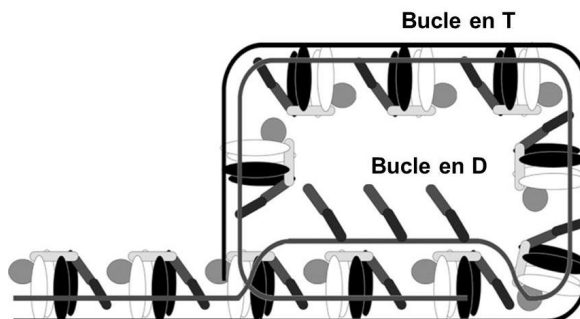


Figura 8. Interpretación esquemática del ADN lineal telomérico formando complicadas estructuras en una configuración de bucle en T con un bucle en D de desplazamiento. Imagen adaptada propiedad de **Gomez et al., 2012**, disponible en *International Journal of Oncology*.

Los telómeros pierden continuamente repeticiones de TTAGGG cada vez que se produce una división celular debido a la replicación incompleta de los cromosomas lineales por las ADN polimerasas convencionales que necesitan una doble de cadena de ADN para poder actuar, produciéndose el llamado "problema al final de la replicación".

2.3.1.- La telomerasa y proteínas del complejo shelterin.

Los telómeros son el sustrato de la telomerasa, enzima responsable de agregar ADN a los extremos de los cromosomas, manteniendo así la longitud de los mismos. Se trata de una ribonucleoproteína formada por dos componentes principales: un componente de ARN no codificante (TER, ARN de la telomerasa) y un componente proteico con capacidad transcriptasa inversa (TERT), transcribe el ARN a ADN. (**Giardini et al., 2014**)

22

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

El ADN telomérico no apareado presenta repeticiones en tándem (secuencia **TTAGGG**). La telomerasa reconoce dichas secuencias y realiza una extensión del telómero en dirección 5' - 3', utilizando como molde para la síntesis de ADN, su propia molécula de ARN sin necesidad de cebador alguno y facilitando la acción de las ADN polimerasas convencionales. **(Figura 9)**

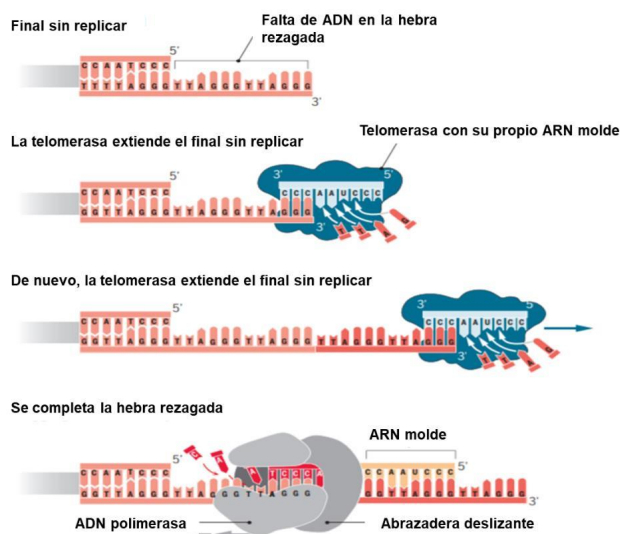


Figura 9. Replicación del ADN telomérico por parte de la telomerasa. El alargamiento de una cadena de ADN, a través del mecanismo de transcriptasa es seguido por la síntesis de la otra cadena de ADN telomérico por ADN polimerasa. Imagen propiedad de **Blackburn et al., 2015**, disponible en <http://science.sciencemag.org/> , VOL 350 ISSUE 6265.

Las células germinales y algunas células cancerosas expresan altos niveles de telomerasa, lo que previene el acortamiento crítico de los telómeros y mantiene la viabilidad celular.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

En los humanos, un conjunto de seis proteínas está unido al ADN telomérico, constituyendo el complejo shelterin, compuesto por: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 y POT1 (**Palm & de Lange, 2008**). Este complejo evita la activación de la maquinaria de respuesta al ADN dañado (*DNA damage response*, DDR), a nivel telomérico y participa en la regulación de la actividad telomerasa, a nivel de los extremos cromosómicos también. (**Blasco et al., 2011**) (**Figura 10**)

La deficiencia de telomerasa en humanos se asocia con el desarrollo prematuro de enfermedades como la fibrosis pulmonar, la disqueratosis congénita y la anemia aplásica, que implican la pérdida de la capacidad regenerativa de diferentes tejidos (**Armanios & Blackburn, 2012**). La evidencia reciente también indica que el envejecimiento puede revertirse mediante la activación de la telomerasa. (**Jaskelioff et al., 2011**)

Los esfuerzos de investigación actuales se centran en cómo nuestro conocimiento de la biología de los telómeros y su conexión con las enfermedades humanas se puede trasladar a la clínica para mejorar la salud. Aunque algunas terapias basadas en los telómeros ya han llegado a ensayos clínicos, el camino aún es largo. El hecho de que la disfunción de los telómeros pueda tener resultados diferentes e incluso opuestos en el envejecimiento y el cáncer hace que el objetivo de desarrollar terapias anti-envejecimiento y contra el cáncer basadas en los telómeros sea un desafío delicado que requiere una tecnología altamente controlable. Los resultados obtenidos en modelos de ratón con terapia génica de telomerasa como tratamiento para enfermedades asociadas al envejecimiento y síndromes en telómeros, como tratamiento terapéutico contra el cáncer, constituyen oportunidades prometedoras para un mayor desarrollo clínico. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para determinar los

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Introducción

efectos no deseados a largo plazo asociados con la reexpresión exógena de la telomerasa. (Martínez & Blasco, 2017)

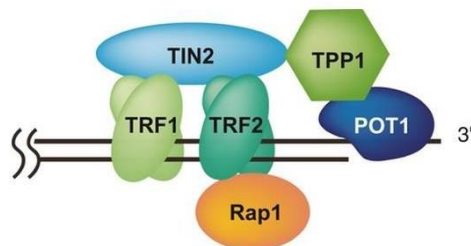


Figura 10. Representación del complejo proteico shelterin unido al telómero, también llamado al conjunto de proteínas y telómero, telosoma. Imagen propiedad de *Journal Of Genetics and Biotechnology*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Hipótesis y Objetivos

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) puede estar asociada con un envejecimiento acelerado. El acortamiento de los telómeros es un biomarcador de envejecimiento ampliamente utilizado. Muchos estudios han tratado de caracterizar la relación entre la longitud de los telómeros (TL) y la EPOC, sin embargo, todos estos fueron diseñados transversalmente, imposibilitando avanzar en predicciones de causalidad.

HIPÓTESIS.

La longitud telomérica y su dinámica podría estar implicada en la etiopatogenia y progresión de la EPOC. La longitud de los telómeros y su progresión en el tiempo podrían identificar los pacientes que van a presentar más comorbilidades. Esto abriría la posibilidad de establecer terapias preventivas para los pacientes con mayor riesgo.

OBJETIVOS.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar los cambios en la dinámica de acortamiento en la longitud de los telómeros a lo largo del tiempo en una cohorte bien caracterizada de pacientes con EPOC e individuos control y comprobar su relación con parámetros clínicos y de función pulmonar. Además, evaluamos la influencia del humo del tabaco y de la obstrucción de la vía aérea en la afectación en la longitud de los telómeros, analizando a pacientes fumadores y no fumadores con limitación del flujo de aire.

28

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Hipótesis y Objetivos

OBJETIVOS GENERALES:

- Evaluar la historia natural de la longitud de los telómeros en leucocitos circulantes en relación con la progresión de la EPOC.
- Avanzar en los mecanismos etiopatogénicos de la EPOC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la longitud telomérica en leucocitos circulantes en pacientes con EPOC e individuos control basalmente y en un seguimiento longitudinal (0, 3, 5 y 10 años de seguimiento).
- Determinar la longitud telomérica en leucocitos circulantes en pacientes no fumadores con EPOC e individuos control basalmente para evaluar la influencia del tabaco frente a la obstrucción de la vía aérea en el proceso natural de acortamiento telomérico.
- Evaluar la relación de la longitud telomérica y su dinámica de acortamiento con la evolución del FEV₁, con la afectación extrapulmonar (índice de masa corporal, índice BODE, capacidad de ejercicio estimada con la prueba de la marcha de 6 minutos), exacerbaciones, comorbilidades y mortalidad.
- Estudiar la posible asociación entre la longitud de los telómeros y los pacientes que presentan el fenotipo enfisema (índice de masa corporal, DL_{CO}, IC/TLC).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

1.- Diseño del estudio.

Esta investigación se centra en el estudio del acortamiento telomérico como marcador del proceso de envejecimiento y su relación con la EPOC. Por lo tanto, el estudio se aborda desde dos perspectivas:

- Estudio transversal. Comparativa entre los diferentes grupos de estudio: pacientes con EPOC vs. individuos control fumadores y no fumadores, y pacientes con EPOC vs. individuos no fumadores con obstrucción de la vía aérea. Se determinaron las medidas de longitud telomérica (dado su implicación en el proceso de envejecimiento) en estos grupos de estudio y se analizaron en relación con los datos clínicos y de función pulmonar registrados basalmente.
- Estudio longitudinal. Se realizó el seguimiento durante 10 años de los pacientes con EPOC y los fumadores sanos para estudiar la dinámica de la longitud de los telómeros y su relación con las demás variables recogidas.

2.- Cohortes de estudio.

2.1.- Sub-cohorte de pacientes con EPOC.

Para llevar a cabo el presente trabajo se dispuso de los datos clínicos y muestras biológicas de pacientes fumadores con EPOC diagnosticados por el Servicio de Neumología del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (consultas externas, laboratorio de función pulmonar y planta de hospitalización) de Tenerife

32

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Material es y métodos

(España) desde el año 1997 al año 2019. Estos pacientes forman parte del estudio observacional BODE. (Celli *et al*, 2004)

Los pacientes incluidos fueron seguidos anualmente desde el 2002 para el estudio de la progresión de la enfermedad realizando pruebas funcionales respiratorias, recogiendo muestras de sangre para su análisis bioquímico rutinario y de biología molecular, así como recogiendo la información generada en entrevistas personales, creando así una base de datos detallada de esta cohorte. De los 263 pacientes con EPOC que se reclutaron inicialmente, 136 fueron seguidos 3 años después, 86 tras 5 años y 42 a lo largo de una década (Tabla 1).

Criterios de inclusión: Los criterios seguidos para la inclusión de los pacientes EPOC en este estudio fueron:

- Edad \geq 35 años.
- Historial de tabaquismo \geq 20 paquetes/año.
- FEV₁/ FVC < 70% (medida 20 minutos después de la administración de 400 mg de albuterol inhalado).
- Clínicamente estable \geq 6 semanas previas al estudio.
- Ausencia de otra enfermedad respiratoria crónica que pudiera alterar las pruebas de función pulmonar.
- No existencia de déficit de alfa1-antitripsina.
- Ausencia de comorbilidades importantes que condicionaran su pronóstico vital a corto plazo.

Criterios de exclusión:

- Incapacidad para realizar las pruebas de función pulmonar.
- No cumplir todos los criterios de inclusión.

33

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

Variable	Al inicio	3 años de seguimiento	5 años de seguimiento	10 años de seguimiento
N	263	136	86	42
Edad	64,7±9,7	66,7±9,7	68,7±9,7	73,7±9,7
Género (hombres %)	73,8	73,5	70,9	66,7
IMC	27,4±5,4	27,5±5,2	27,7±5,4	27,3±5,6
FEV₁ (L)	1,52±0,65	1,45±0,62	1,47±0,63	1,36±0,57
FEV₁ (% pred)	57±21	57±21	58±20	56±19
FVC (L)	2,93±0,93	2,87±0,92	2,84±1,01	2,64±0,88
FVC (% pred)	88±23	89±24	88±24	86±24
FEV₁/FVC (% pred)	51±12	50±12	52±11	51±10
PaO₂	71,5±11,7	68,3±11,4	67,9±11,5	67,6±9,9
PaCO₂	42,7±5,5	42,3±5,5	42,6±6,2	43,4±5,2
IC/TLC (%)	34±9	31±8	32±9	31±9
PM6M (mts)	481±100	473±104	475±105	453±127
DL_{co}	72±22	64±22	62±22	60±25
K_{co}	77±27	73±27	76±26	73±28

Tabla 1. Características antropométricas de la sub-cohorte de pacientes con EPOC durante el período de seguimiento.

2.2.- Sub-cohorte de fumadores sin EPOC.

Los pacientes fumadores sin EPOC incluidos en el estudio fueron reclutados en el Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (Tenerife) y en la Clínica Universitaria de Navarra. Este grupo control está compuesto inicialmente por 172 pacientes que contaron con visitas anuales para el registro de variables clínicas y de función respiratoria, así como para la recogida de muestras de sangre. De estos, se mantiene registro de 85 pacientes durante cinco años de seguimiento y de 10 pacientes, 10 años después (**Tabla 2**).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

Criterios de inclusión: Los criterios seguidos para la inclusión de los fumadores sin EPOC control fueron:

- Edad \geq 35 años.
- Historial de tabaquismo \geq 20 paquetes/año.
- FEV₁ \geq 80%.
- FEV₁/ FVC \geq 70% (medida 20 minutos después de la administración de 400 mg de albuterol inhalado).
- Clínicamente estables \geq 6 semanas previas al estudio.
- Ausencia de enfermedad respiratoria.

Variable	Al inicio	5 años de seguimiento	10 años de seguimiento
N	172	85	10
Edad	53,4 \pm 10,1	58,4 \pm 10,1	63,4 \pm 10,1
Género (hombres %)	52,3	64,7	50
IMC	27,8 \pm 4,9	28,1 \pm 4,1	29,7 \pm 4,6
FEV₁ (L)	2,91 \pm 0,73	2,78 \pm 0,72	2,34 \pm 0,63
FEV₁ (% pred)	101 \pm 15	101 \pm 17	94 \pm 9
FVC (L)	3,76 \pm 0,96	3,75 \pm 0,92	3,22 \pm 0,89
FVC (% pred)	107,30 \pm 16	109,38 \pm 16	104,20 \pm 15
FEV₁/FVC (% pred)	77 \pm 6	74 \pm 6	73 \pm 5
PM6M (mts)	555 \pm 72	564 \pm 69	554 \pm 73

Tabla 2. Características antropométricas de la sub-cohorte de fumadores sin EPOC durante el período de seguimiento.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

2.3.- Sub-cohorte de no fumadores sin EPOC.

El grupo de pacientes control no fumadores sin EPOC proceden de una cohorte de 15.00 canarios entre 18 y 75 años, reclutados dentro del estudio de cohortes de Canarias CDC. El CDC es un estudio de cohortes que estudia la incidencia de los tres principales problemas de Canarias: cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Cabrera de León *et al*, 2008). En el presente estudio se incluyeron 166 pacientes (Tabla 3) seleccionados en base a presentar por lo menos dos generaciones de ancestros canarios para disminuir el sesgo de una posible estratificación poblacional (Maca-Meyer *et al*, 2004) y que disponían de datos clínicos y muestras de sangre al momento de su reclutamiento.

Criterios de inclusión:

- Edad \geq 35 años.
- Ausencia de historial de tabaquismo.
- Ausencia de enfermedad respiratoria declarada.

Variable	Al momento del diagnóstico
N	40
Edad	57 \pm 7
Género (hombres %)	55
IMC	28 \pm 5
FEV ₁ (L)	3,06 \pm 0,91
FEV ₁ (% pred)	105 \pm 17
FVC (% pred)	113 \pm 18
FEV ₁ /FVC (% pred)	77 \pm 5

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de la sub-cohorte poblacional no fumadora sin enfermedad respiratoria, grupo control.

Materiales y métodos

2.4.- Sub-cohorte de pacientes no fumadores con obstrucción del flujo aéreo.

El cuarto grupo de estudio lo constituyen 80 pacientes no fumadores con obstrucción de la vía aérea diagnosticados por el Servicio de Neumología del Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín (Gran Canaria). Los datos clínicos y de función respiratoria, (Tabla 4) así como sus muestras de sangre fueron cedidas por dicho centro para incluirse en el presente estudio.

Criterios de inclusión: Los criterios seguidos para la inclusión de los pacientes no fumadores con obstrucción de la vía aérea en este estudio fueron:

- Edad \geq 35 años.
- Ausencia de historia de tabaquismo.
- FEV₁ / FVC < 70% (medida 20 minutos después de la administración de 400 mg de albuterol inhalado).
- Clínicamente estable \geq 6 semanas previas al estudio.

Variable	Al momento del diagnóstico
N	80
Edad	64,54 \pm 9,3
Género (hombres %)	45
IMC	29,36 \pm 5,4
FEV₁ (L)	1,68 \pm 0,78
FEV₁ (% pred)	66 \pm 19
FVC (L)	2,90 \pm 1,18
FVC (% pred)	93,19 \pm 22
FEV₁/FVC (% pred)	58 \pm 9
PM6M (mts)	518 \pm 109
IC/TLC (%)	38 \pm 10

Tabla 4. Características clínicas y de función pulmonar de la sub-cohorte control de pacientes no fumadores con obstrucción del flujo aéreo.

37

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

3.- Aspectos éticos y legales.

Los consentimientos informados de los pacientes fueron recogidos acorde a lo establecido por la ley 41/2002 (BOE-A-2002-22188). Los resultados que se obtienen tras la realización del presente estudio son confidenciales, sólo teniendo acceso los miembros del equipo investigador. Esta investigación cuenta con la aprobación del Comité Ético de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (14/12).

4.- Pruebas clínicas y de función pulmonar.

Los datos clínicos y los resultados de las diferentes pruebas de función pulmonar que se realizaron anualmente a los pacientes que participaron en el estudio fueron registradas en las bases de datos.

Las pruebas espirométricas fueron realizadas con un neumotacógrafo siguiendo la normativa de la American Thoracic Society (Miller, 1991), obteniendo datos de FEV₁ (Volumen espiratorio forzado: volumen máximo espirado en el primer segundo de una espiración forzada), FVC (Capacidad vital forzada: volumen total que expulsa el paciente desde la inspiración máxima hasta la espiración máxima) y el cociente FEV₁ / FVC.

También se midieron la capacidad inspiratoria en reposo (IC, inspiratory capacity) y su relación con la capacidad pulmonar total (TLC, total lung capacity), la prueba de difusión del monóxido de carbono (DLco), su ajuste con el volumen alveolar K_{CO} y la presión parcial de oxígeno y dióxido de carbono en la sangre arterial (PaO₂ y PaCO₂).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

Para medir la capacidad de ejercicio se realizó la prueba de la marcha de los 6 minutos (PM6M) midiendo la máxima distancia recorrida en un pasillo de 30 metros con registro oximétrico continuo siguiendo la normativa de la ATS (**American Thoracic Society, 2002**).

Se calculó el índice BODE que permite una evaluación multidimensional del paciente a través de 4 parámetros: el IMC (índice de masa corporal, calculado como el cociente del peso en kilogramos y la estatura en metros al cuadrado), el FEV₁ (%), la disnea (usando la escala modificada de la MRC (mMRC), y el resultado de la prueba de la marcha de los 6 minutos (PM6M). El índice obtenido oscila de 0 a 10, siendo 10 el estadio más avanzado de la enfermedad y de peor pronóstico para el paciente.

Mediante entrevista a los pacientes junto con la valoración del registro de las historias clínicas se evaluaron: el tratamiento recibido, las exacerbaciones (y hospitalizaciones), las comorbilidades (índice de Charlson) (**Charlson et al.,1987**) y las causas de muertes.

5.- Preparación de las muestras de sangre y suero.

Se recolectó la sangre de todos los individuos incluidos en el estudio. Para ello se llevó a cabo la extracción de 4 mililitros de sangre venosa recogidos en un *Tubo BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA K2* del cual se separó una alícuota de 200 µl para la posterior extracción de ADN.

A partir de dos *Tubos Separadores de Suero Vacutainer® SST™ II Advance* se obtuvo el suero por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, y se distribuyó en ocho alícuotas de 500 µl. Tanto la sangre como el suero se guardaron a -80°C para su posterior uso.

39

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

Adicionalmente se recogieron un *Tubo BD Vacutainer® con anticoagulante EDTA K2*, dos *Tubos Separadores de Suero Vacutainer® SST™ II Advance* y un *Tubo Vacutainer® Heparina* por cada paciente para llevar a cabo el hemograma y el análisis bioquímico. También se recogió muestras de la primera orina de la mañana.

Estas muestras se analizaron en el Laboratorio Central del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria.

5.1- Extracción y valoración del ADN.

Se extrajo ADN genómico a partir de 200 µl de sangre total mediante kit QIAamp DNA Mini Kit (GE Healthcare) siguiendo el protocolo de extracción tal y como detalla el fabricante. (Figura 11)

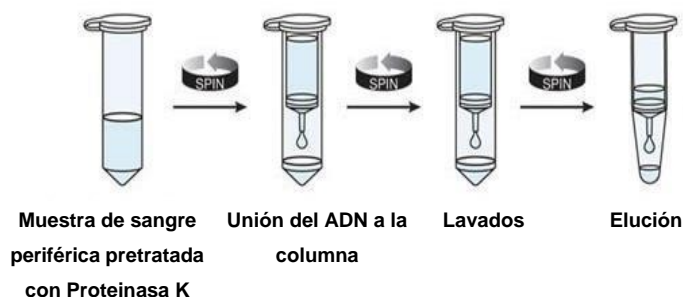


Figura 11. Proceso de extracción de ADN mediante el uso de columnas de sílica.

Materiales y métodos

La lectura espectrofotométrica a 260 nm con el Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), permitió determinar la concentración del ADN extraído. Como *blanco* se empleó agua libre de nucleasas. También se midió la absorbancia a 280 nm (A280) para estimar la pureza del ADN: considerándose un grado de pureza óptimo si el cociente $A_{260} / A_{280} \geq 1,8$.

La integridad del ADN aislado se determinó mediante una electroforesis, visualizándose una única banda de gran tamaño (ADN genómico).

Realizamos diluciones estandarizadas con el objetivo final de obtener una concentración final de 10 ng/μl de todas las muestras a analizar.

Las muestras de ADN extraídas y sus diluciones a 10 ng/μl se almacenaron a -20° C hasta su uso.

5.2- Determinación de la longitud telomérica relativa mediante PCR a tiempo real.

La determinación de la longitud telomérica (TL) en las muestras de ADN genómico de la cohorte se llevó a cabo mediante la técnica de PCR a tiempo real descrita previamente por **Cawthon, 2009**.

Esta técnica permite la cuantificación relativa de la longitud telomérica a través del cálculo del ratio T/S. Este ratio representa la proporción entre el número fijo de repeticiones en tándem de la secuencia telomérica (T) presentes en la muestra y el número de copias de un gen de copia única (S), el gen de la albúmina.

41

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

Las reacciones de amplificación de las repeticiones teloméricas y del gen de copia única se realizaron de forma conjunta en la misma reacción de amplificación (reacción multiplex) (**Figura 12**). Las muestras se analizaron por triplicado y en placas de 96 pocillos (*Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1mL*)

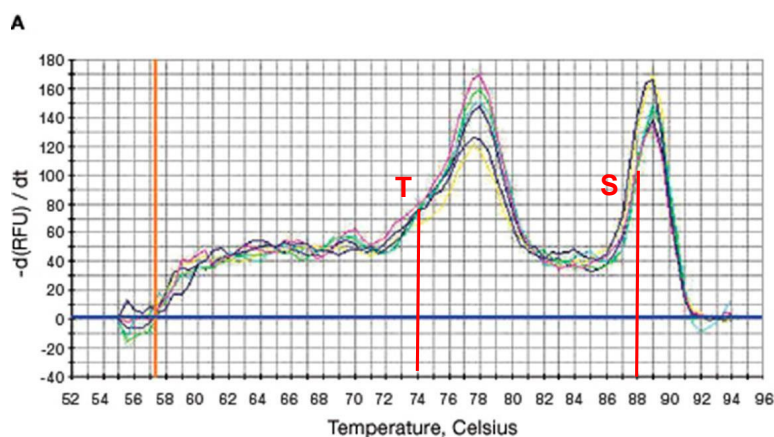


Figura 12. La medición de la longitud de los telómeros se realizó mediante qPCR cuantitativa multiplex monocromática. Las lecturas a 74°C proporcionaron los valores de Ct para la amplificación de telómeros (T). Las lecturas a 88°C proporcionaron los valores de Ct para la amplificación de la albúmina.

El equipo empleado para llevar a cabo la PCR a tiempo real fue el modelo *Bio-Rad iCycler iQ Real-Time PCR Detection System*. Para el manejo de los resultados obtenidos en este equipo se usó el programa informático *iCycler*.

Cada reacción de PCR constó de un volumen final de 20 microlitros. Su composición se señala en la **Tabla 5**. Se utilizaron para la misma cebadores diseñados para telómeros y albúmina de 79 y 98 pares de bases respectivamente. (**Tabla 6**).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

Reactivos	Microlitros por reacción de PCR
SYBRGreen PCR Master Mix (BioRad)*	10
Telg	0,9 (0,9 µM)
Telc	0,9 (0,9 µM)
Albu	0,6 (0,6 µM)
Albd	0,6 (0,6 µM)
ADN	2 (10 ng/µl)
H₂O libre de nucleasas	5
Volumen total	20

Tabla 5. Cantidades y concentraciones de cada uno de los componentes de la reacción multiplex de qPCR.

* El SYBR Green fue utilizado como agente fluoróforo. Es un agente intercalante que se une con gran afinidad al surco menor del ADN bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces.

Gen	Secuencia (5' → 3')
Telómero	Telg Fw: AACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT Telc Rv: TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA
Albúmina	Albu Fw: CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGaaatgctgcacagaatcctg Albd Rv: GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGaaaagcatggtgcctggt

Tabla 6. Cebadores empleados en la reacción de qPCR para la determinación de la longitud telomérica.

En cada placa fue incluida una curva estándar para evaluar la eficiencia de cada reacción de qPCR, utilizando para ello una muestra control de telómeros largos (paciente joven, no fumador, sin enfermedad diagnosticada, menor de 25 años). La curva se preparó realizando una dilución seriada de ADN y comprendió cuatro puntos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

con cantidades conocidas de 80, 16, 3,2 y 0,64 nanogramos/microlitros, respectivamente.

Esta muestra también fue utilizada como muestra de referencia, añadiéndola en cada placa a la misma concentración que las muestras a analizar (10 ng/μl).

También se añadió una muestra control de telómeros cortos, procedentes de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATCC Cat#HTB-22), en todas las placas que se analizaron. Por último, como control negativo se utilizó agua. Todas las muestras, así como la curva estándar se analizaron por triplicado.

Las condiciones de amplificación de la qPCR se reflejan en la **Tabla 7**.

Tiempo	Temperatura (°C)	Número de ciclos	
15 minutos	95	1	
15 segundos	94	2	
15 segundos	49		
15 segundos	94	32	
10 segundos	62		
15 segundos	74		<input checked="" type="checkbox"/>
10 segundos	84		
15 segundos	88		<input checked="" type="checkbox"/>
Curva de Melting			
15 segundos	95	1	
1 minuto	60		
15 segundos	95		<input checked="" type="checkbox"/>

Tabla 7. Programa de ciclos utilizado para la qPCR multiplex con adquisición de la señal de fluorescencia a los 74°C (para obtener los valores Ct: Ciclo umbral de los amplicones teloméricos) y a los 88° (para obtener los valores Ct de los amplicones de la albúmina). Posteriormente se realizó la curva de melting para confirmar la especificidad de los amplicones.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

La eficiencia de cada reacción se calculó utilizando la pendiente de la curva estándar generada en cada placa, tanto para telómeros como para la albúmina. Los valores de eficiencia entre 90% y 110% se consideraron aceptables para el estudio.

La precisión y reproducibilidad del ensayo fue determinada a través de la variación intra e inter-ensayo. Para determinar la variabilidad entre triplicados de una muestra (intra-ensayo) se calculó el coeficiente de variación (CV). Se calcularon las medias entre las tres repeticiones siempre y cuando los valores entre ellos no difirieran en más de 0,5 (CV < 5%).

La variabilidad inter-ensayo (entre placas), se calculó midiendo la misma muestra en ensayos independientes y se expresó como el CV de los valores Ct de la muestra, aceptando sólo aquellas placas con un CV < 10%.

Cuantificación relativa de la longitud telomérica:

La longitud telomérica relativa se calculó utilizando el modelo matemático de **Pfaffl et al, (2002)** a través del ratio T/S.

A partir de la eficiencia de la PCR (E) y los ciclos umbrales (Ct) obtenemos como resultado final un ratio (T/S) entre el valor de las repeticiones teloméricas (T) y del gen de referencia o housekeeping (S) que sirve como control de carga, corregido por el valor de una muestra control o calibrador (Ecuación 1).

$$\text{Ratio} = \frac{(\text{E gen diana} = \text{repeticiones teloméricas})^{\Delta C_t (\text{calibrador-test})}}{(\text{E gen de referencia} = \text{Albúmina})^{\Delta C_t (\text{calibrador-test})}}$$

45

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

La elección de esta técnica se debe a las diversas ventajas que ofrece al trabajar con grandes cohortes:

- Baja cantidad de ADN de partida
- Bajo coste económico
- Tiempos cortos de obtención de resultados
- Alta reproducibilidad
- Técnica validada en estudios poblacionales

5.3- Determinación de la longitud telomérica absoluta mediante Southern blot.

Se procedió a la determinación de la longitud telomérica absoluta en un subgrupo de muestras (40) de la cohorte. Para ello, empleamos *el kit comercial TeloTAGGG Telomere Length Assay® (Roche)*.

El ADN genómico (3 microgramos) fue sometido a digestión mediante las enzimas de restricción, *Hinf I* y *Rsa I*. Tras la digestión, los fragmentos de ADN fueron separados en un gel de electroforesis y transferidos a una membrana de nailon por *Southern blotting*.

Los fragmentos de ADN transferidos se hibridaron con una sonda específica para las repeticiones teloméricas marcada con digoxigenina, e incubados con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado covalentemente a la fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP; DIG *antibody coupled to Alkaline Phosphate*).

46

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

La metabolización del sustrato CDP-Star por esta enzima genera una señal quimioluminiscente que permite visualizar los fragmentos teloméricos.

Como control positivo de telómeros largos se utilizó la muestra de un paciente joven (<25 años) sin diagnóstico de enfermedad, y como control positivo de telómeros cortos se usó una muestra procedente de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATCC Cat#HTB-22).

La cuantificación absoluta se realizó empleando el software ImageQuant. (Figura 13)

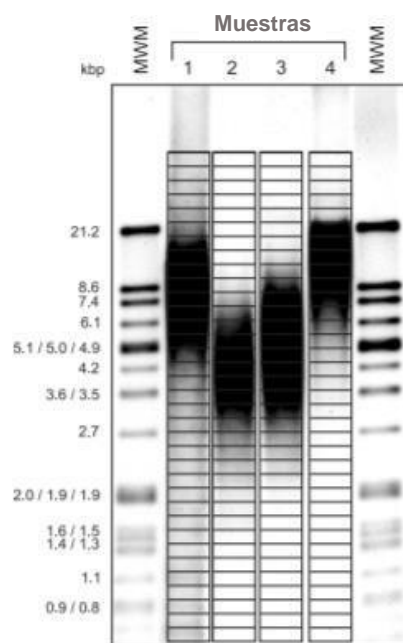


Figura 13. Detección por quimioluminiscencia de los telómeros en cada muestra. Se establece un patrón de bandas para la posterior comparación con el Marcador de Peso Molecular (MWM). Cuanto mayor es el peso molecular del fragmento, mayor es la densidad óptica. La diferencia entre los telómeros de los distintos cromosomas y en las distintas células dio lugar, tras la hibridación, a una *arrastre (banda ancha)* que abarca todas las longitudes de los fragmentos teloméricos presentes en cada muestra.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

En cada caso, se estableció el parámetro de longitud de telómeros medida en Kilobases teniendo en cuenta las diferentes intensidades de la señal de hibridación. Cuanto mayor es el peso molecular del fragmento, mayor es la densidad óptica.

Para ello se determinó la longitud media de los fragmentos teloméricos, en cada muestra, empleando la siguiente fórmula:

Media= (DO_i) / (DO_i/L_i), donde DO_i es la densidad óptica en la posición i y L_i es la longitud de los fragmentos teloméricos, en Kb, en esa posición.

6.- Análisis estadísticos.

Se realizaron pruebas t-Student, ANOVA (ANOVA, Analysis Of Variance), y la prueba T pareada (con variables que seguían una distribución normal) para evaluar las diferencias en las medias y proporciones entre las características basales y de seguimiento de los pacientes en los diferentes grupos de estudio. Las pruebas no paramétricas que se llevaron a cabo fueron: Chi², la prueba exacta de Fisher y la prueba de Kruskal-Wallis

La correlación entre la longitud telomérica basal (T/S₀) o el cambio de la longitud telomérica con variables clínicas y / o de función pulmonar se exploró utilizando los coeficientes de correlación de Pearson. Se realizó una regresión logística múltiple para probar la asociación de la longitud telomérica con la susceptibilidad a la EPOC ajustada por edad, sexo y paquetes/año.

Para el análisis longitudinal y mediante el uso de un modelo lineal general para medidas repetidas (GLIM) se analizó la diferencia de la dinámica de los telómeros entre pacientes

48

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

con EPOC y fumadores sin EPOC, o dentro de estos grupos entre actuales fumadores y aquellos ex-fumadores, con la progresión de la enfermedad. Analizando las variables clínicas y de función pulmonar utilizando el cambio en la longitud de los telómeros como factor comparativo.

El efecto del cambio en la longitud telomérica relativa a lo largo del tiempo se analizó en relación con las variables de función pulmonar medidas durante el tiempo de observación por la variable T/S_mCh: como el cambio en T/S con respecto a su media a lo largo del tiempo en cada individuo. La edad, el sexo y la media de T/S de cada individuo se usaron como covariables para el ajuste.

Para analizar el efecto de la longitud de los telómeros sobre la mortalidad (por todas las causas), comparamos el riesgo de mortalidad a través del ratio T/S durante el período de seguimiento total utilizando un modelo de regresión de la relación de riesgos proporcionales de Cox (HR) en un análisis multivariado. La longitud telomérica relativa (T/S) se midió al inicio, al tercer, quinto y al décimo año, por lo que los individuos fueron analizados por su T/S a lo largo del tiempo, utilizando el enfoque LOCF, o arrastre de la última observación de T/S en los diferentes modelos y por otro lado, analizando tertiles de T/S durante el seguimiento.

En el modelo multivariado se incluyeron como covariables: edad, sexo, tabaquismo (paquete de años de tabaquismo), tabaquismo activo (actuales o exfumadores), FEV₁%, índice BODE y PM6M de cada año de seguimiento.

Se analizó el riesgo de mortalidad en los siguientes 12 meses desde la última evaluación clínica. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, utilizando una prueba de log-rank, se representaron comparando grupos de pacientes con T/S cortos/medios versus T/S largos a lo largo del tiempo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Materiales y métodos

Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa SPSS (v.25.0) (SPSS Inc., Chicago; IBM SPSS Statistics for Windows, Armonk – IBM Corp.) y el programa R (R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

IV. RESULTADOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

1.- Artículo 1.

“Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort”. Córdoba-Lanús E, Cazorla-Rivero S, Espinoza A, et al. *Respiratory Research*, 2017. (***“Acortamiento telomérico y envejecimiento acelerado en EPOC: hallazgos en la cohorte BODE”***).

Los resultados obtenidos en el citado artículo muestran:

1.1.- Resultados basales.

El análisis de 121 pacientes con EPOC y 121 controles al inicio del estudio muestra que el rango de obstrucción del flujo de aire distribuido por etapas GOLD en la EPOC fue el siguiente: 1 (19,8%), 2 (43%), 3 (28,9%) y 4 (8,3%).

Como se esperaba, los pacientes con EPOC tenían una peor función pulmonar y un índice BODE más alto que los controles. Sin embargo, los dos grupos fueron similares en edad, sexo, IMC y puntaje de comorbilidad de Charlson.

La longitud de los telómeros medida por la relación T/S se correlacionó inversamente con la edad en ambos grupos. Los pacientes con EPOC tenían telómeros significativamente más cortos que los fumadores sin EPOC ($T/S = 0,68 \pm 0,25$ vs. $0,88 \pm 0,52$; $p < 0,0001$) incluso después de ajustar por edad, sexo y paquetes/año (IC 95%: 0,11–0,64; $p = 0,003$) (**Figura 14**). No hubo diferencias significativas entre hombres y mujeres dentro del grupo de pacientes con EPOC o entre los fumadores sin enfermedad.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

No hubo relación entre la longitud de los telómeros y los parámetros clínicos y de función pulmonar, así como con comorbilidades en pacientes con EPOC a nivel transversal.

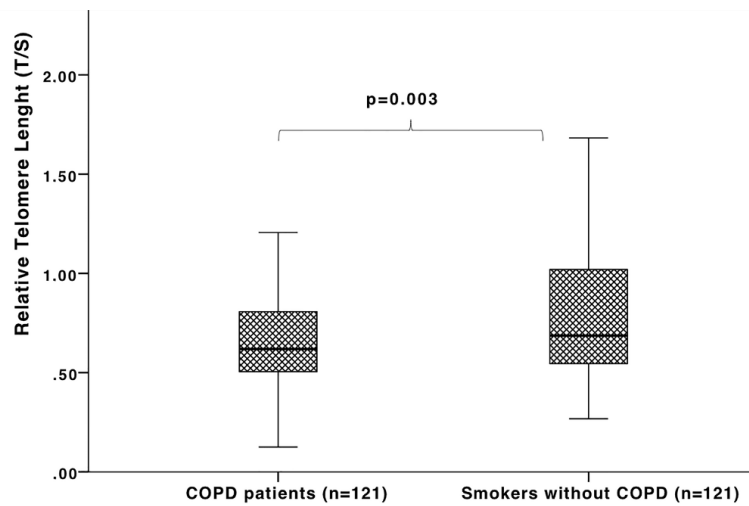


Figura 14. Longitud media relativa de los telómeros (T/S) en pacientes con EPOC (n = 121) frente a fumadores de la misma edad sin EPOC (n = 121).

1.2.- Dinámica de la longitud de los telómeros.

La diferencia encontrada entre grupos en la longitud de los telómeros a nivel basal permaneció significativa después de 3 años en los 70 pacientes con EPOC y 73 controles fumadores con seguimiento analizados ($T/S_3 = 0,46 \pm 0,16$ vs. $0,74 \pm 0,52$; $p < 0,001$); incluso después de ajustar por edad, sexo y hábito tabáquico en un análisis de regresión logística (IC del 95%: 0,12 a 0,90); $p = 0,03$).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

La longitud de los telómeros en el grupo control de fumadores sin EPOC disminuyó significativamente ($T/S_0 = 0,83 \pm 0,56$ vs. $T/S_3 = 0,74 \pm 0,52$; $p = 0,002$) después del período de seguimiento, al igual que en el grupo de pacientes con EPOC ($T/S_0 = 0,66 \pm 0,21$ vs. $T/S_3 = 0,46 \pm 0,16$; $p < 0,001$). Sin embargo, cuando comparamos la trayectoria de los telómeros en el tiempo entre estos grupos, pudimos observar un acortamiento acelerado de los telómeros en los individuos con EPOC en contraste con el grupo control (GLIM, modelo lineal general para medidas repetitivas; $p = 0,001$). (Figura 15)

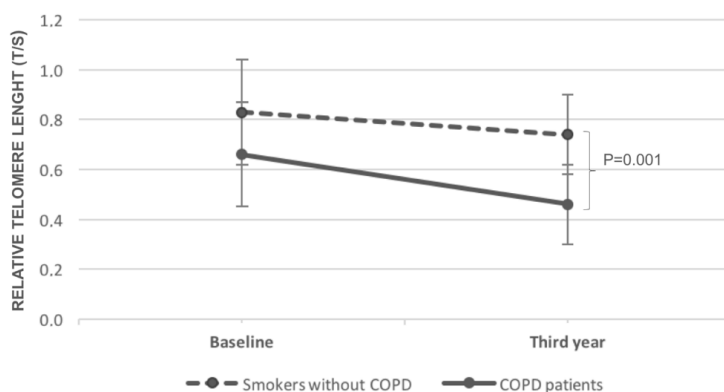


Figura 15. Dinámica de la longitud de los telómeros (relación T/S relativa) en pacientes con EPOC ($n = 70$) frente a fumadores de la misma edad sin EPOC ($n = 73$) después de 3 años de seguimiento ($p = 0,001$, utilizando GLIM - modelo lineal general para medidas repetitivas; diferencias T/S entre grupos $p (T/S \times \text{groups}) = 0,002$).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

1.3.- Relación del cambio de longitud de los telómeros y las variables clínicas y de función pulmonar.

El estudio permitió encontrar una relación significativa entre la longitud de los telómeros basalmente y el cambio en la longitud telomérica ($r = -0,49$; $p < 0,001$; ajustado por edad). (Figura 16)

Se pudo evidenciar que aquellos pacientes con un acortamiento más acusado de sus telómeros presentaban características similares de función pulmonar en comparación con los pacientes con EPOC que no cambiaron, alargaron o tuvieron una baja tasa de acortamiento de sus telómeros.

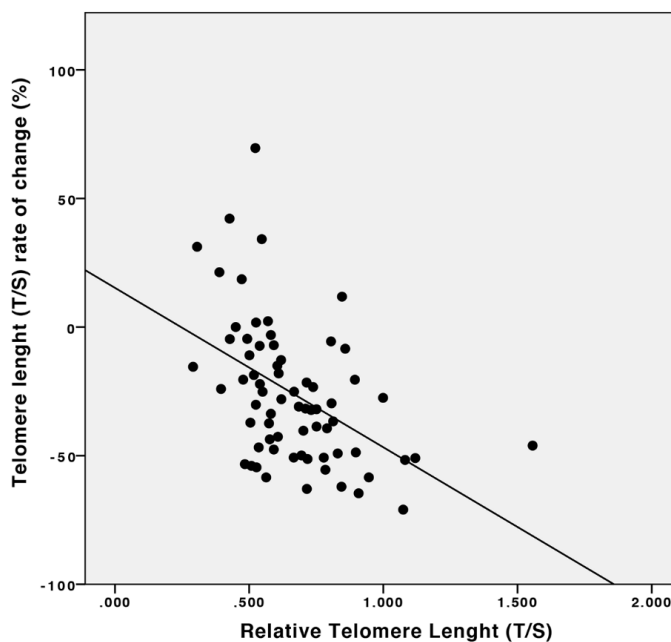


Figura 16. Correlación entre la longitud inicial de los telómeros y la tasa de cambio en el acortamiento telomérico en pacientes con EPOC después de un seguimiento de 3 años ($r = -0,49$; $p = 0,001$, ajustado por edad).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

2.- Artículo 2.

“Shorter telomeres in non-smoking patients with airflow limitation” Córdoba-Lanús E, Cabrera-López C, Cazorla-Rivero S, et al. *Respiratory Medicine*, 2018 (**“Telómeros más cortos en pacientes no fumadores con limitación de la vía aérea”**).

Los resultados obtenidos en el citado artículo muestran:

Se compararon tres grupos de pacientes: fumadores con EPOC, no fumadores con obstrucción crónica al flujo aéreo (mayoritariamente pacientes con asma) y controles sanos no fumadores:

Se analizaron en la primera etapa: 80 pacientes no fumadores con limitación del flujo de aire y 80 fumadores con EPOC. **(Figura 17)**

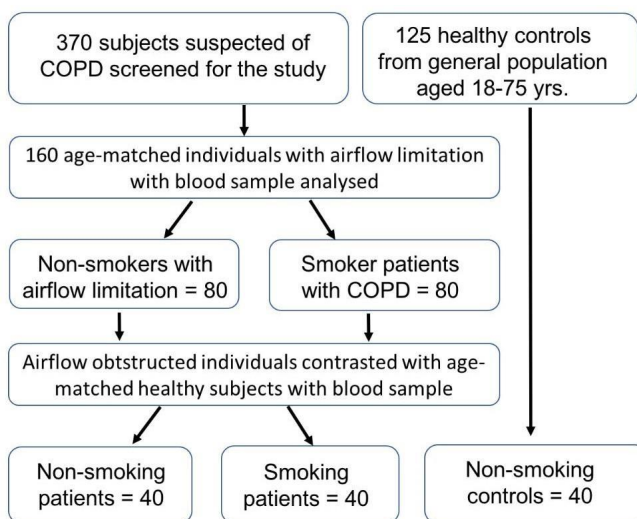


Figura 17. Diagrama de flujo que representa la evaluación de los pacientes y los individuos sanos considerados para el análisis en el presente estudio.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

El rango de obstrucción del flujo de aire distribuido según el índice GOLD en pacientes con EPOC fumadores fue el siguiente: 1 (21%), 2 (48%), 3 (20%) y 4 (11%). Los pacientes fumadores con EPOC presentaron una función pulmonar ligeramente peor que los no fumadores con obstrucción del flujo de aire, medida por el FEV₁ y el FEV₁/FVC.

Entre los pacientes con EPOC que fumaron el 33% de ellos presentó un índice BODE ≥ 2 . Los dos grupos fueron similares en sexo, IMC y puntaje de comorbilidad de Charlson.

La longitud de los telómeros medida por la relación T/S se correlacionó inversamente con la edad ($r = -0,202$; $p = 0,05$). La longitud de los telómeros en pacientes no fumadores con limitación del flujo de aire fue similar a la de los fumadores de tabaco con EPOC ($T/S = 0,61 \pm 0,19$ frente a $0,60 \pm 0,23$).

En un análisis secundario, se observó que los pacientes no fumadores con limitación del flujo de aire presentaban telómeros más cortos que aquellos controles no fumadores sin enfermedad de edad similar (57 ± 7 años), independientemente de la edad y el sexo ($0,63 \pm 0,20$ frente a $0,79 \pm 0,40$; IC 95%: $0,03-0,79$; $p = 0,01$). **(Figura 18)**

La longitud de los telómeros entre mujeres y hombres ($0,60 \pm 0,16$ frente a $0,63 \pm 0,22$; $p = 0,44$) no mostró diferencias significativas entre los individuos no fumadores con obstrucción de la vía aérea.

La longitud de los telómeros no se asoció con parámetros clínicos y/o de función pulmonar. Tampoco se detectaron diferencias significativas en cuanto a longitud de sus telómeros entre pacientes con obstrucción del flujo aéreo según sus antecedentes de asma, bronquiectasias y/o tuberculosis por lo menos entre los individuos incluidos en este estudio.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

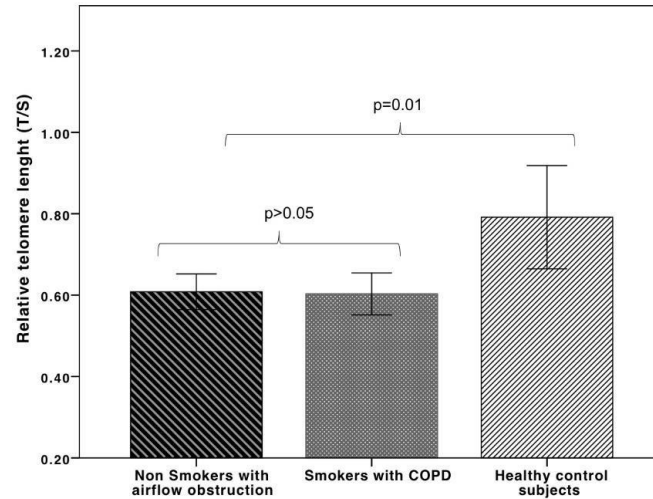


Figura 18. Longitud de los telómeros (T/S) en pacientes no fumadores con obstrucción del flujo de aire, en comparación con fumadores con EPOC y controles sanos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

3.- Artículo 3.

“Telomere length dynamics over 10-years and related outcomes in patients with COPD” Córdoba-Lanús E, Cazorla Rivero S, et al., Respiratory Research, 2021. (“Dinámica de la longitud de los telómeros durante 10 años y resultados relacionados en pacientes con EPOC”).

Los resultados obtenidos en el citado artículo muestran:

3.1.- Análisis basal.

Se estudiaron 263 pacientes con EPOC, caracterizados por una obstrucción del flujo de aire distribuidos según índice GOLD en los siguientes estadios: I (16,7%), II (43%), III (30,8%) y IV (9,5%). Los sujetos con telómeros más cortos eran de mayor edad ($p=0,005$) y fumaban más cigarrillos por año ($p = 0,023$). No se observó una asociación significativa entre la longitud de los telómeros y los parámetros clínicos y/o de función pulmonar ($p > 0,05$) en el estudio transversal. La longitud de los telómeros medida por la relación T/S se correlacionó inversamente con la edad en la EPOC ($r = -0,236$; $p < 0,001$). La mediana de TL de los pacientes con un promedio de 64 años fue de $7,8 \pm 2,7$ Kbp mostrando una disminución a medida que aumentó la edad. **Figura 19**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

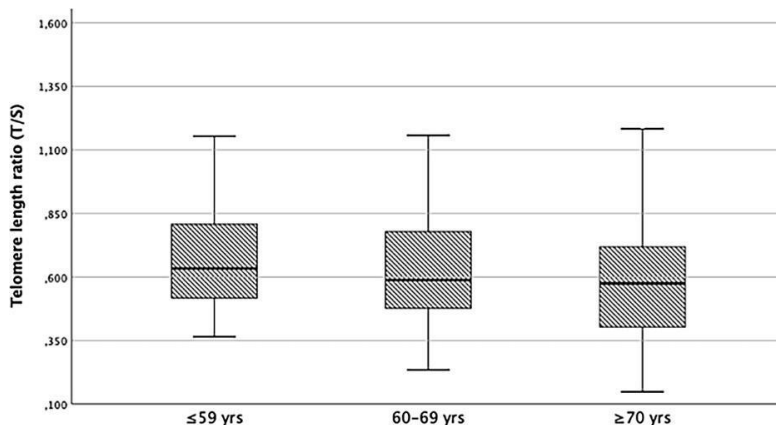


Figura 19. Longitud de los telómeros en pacientes con EPOC distribuidos por rango de edad al inicio del estudio de la siguiente manera: ≤59 (n = 83), 60-69 (n = 95) y ≥70 (n = 85) años (p = 0,022).

3.2.- TFR por análisis de transferencia Southern.

La longitud de los telómeros se midió en una muestra de cuarenta pacientes con EPOC mediante la técnica de transferencia “Southern”. La longitud relativa de los telómeros (T/S) determinada por qPCR en estas 40 muestras se correlacionó con la longitud de los telómeros (pb) medida por la transferencia Southern (r = 0,502; p = 0,001). **(Figura 20)**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

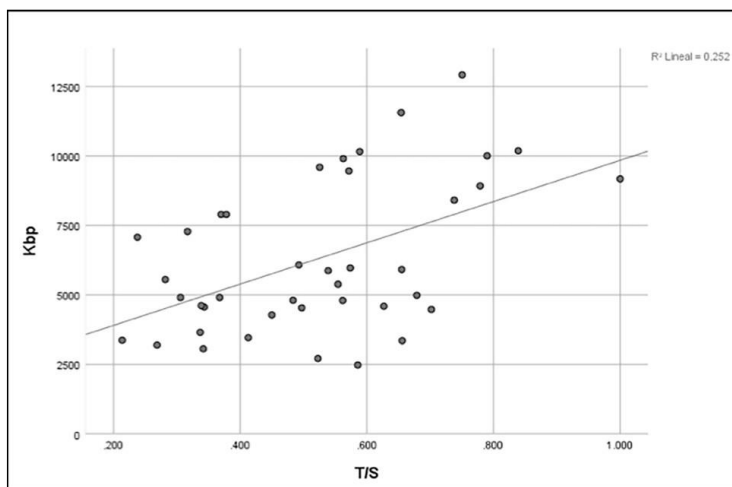


Figura 20. Correlación entre la medida de la longitud de los telómeros por TFR y la relación T/S.

3.3.- Análisis longitudinal de la longitud de los telómeros.

El estudio longitudinal se realizó en los 134 pacientes seguidos anualmente durante 10 años que presentaron al menos dos medidas T/S durante ese tiempo. 42 pacientes completaron ese período de observación después de 10 años de seguimiento.

En su mayoría eran hombres (67%) y tenían una edad media de 61 ± 8 años al inicio. La longitud media de los telómeros fue de 7583 ± 2328 pb al momento del reclutamiento y de 5755 ± 1456 pb 10 años después. La pérdida media de TL observada para estos individuos fue de 183 pb / año.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección https://sede.ull.es/validacion/	
Identificador del documento: 3371828	Código de verificación: Lsz3bQ+z
Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

3.4.- Acortamiento de la longitud de los telómeros y función pulmonar

Se analizó el efecto del cambio en T/S en relación con su valor medio para cada uno de los 134 pacientes incluidos en el estudio longitudinal en cada visita a lo largo de su seguimiento.

En general, los pacientes que acortaron más sus telómeros durante ese tiempo tuvieron una peor medida de intercambio de gases pulmonares por PaO₂, KCO, mayor hiperinsuflación pulmonar estática (IC/TLC) y afectación extrapulmonar (índice BODE), incluso después del ajuste por edad, sexo, tabaquismo activo y la media de T/S de cada sujeto.

También es de resaltar que los pacientes que fallecieron durante el período de seguimiento presentaron un mayor acortamiento de los telómeros en relación con las mismas variables clínicas y de función pulmonar.

3.5.- Longitud de los telómeros y riesgo de mortalidad.

Durante el período de seguimiento, 87 (33%) de los participantes fallecieron (19,5% por cáncer, 39,1% por causa respiratoria y 5,8% por causa cardiovascular). Los pacientes con EPOC con telómeros más cortos (tertiles T1 y T2 de T/S) mostraron un mayor riesgo de mortalidad por cualquier causa (Cox HR = 5.481; p = 0.026). En la cohorte general, una variación individual de una disminución en 0,1 unidades de T/S a lo largo del tiempo aumentó el riesgo de mortalidad (HR = 1,446; p = 0,009). **(Figura 21)**

65

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Resultados

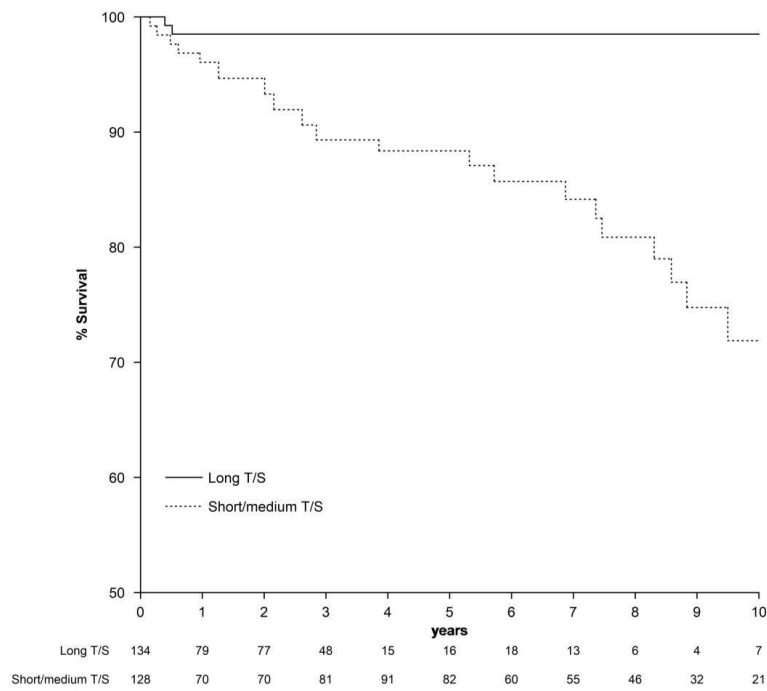


Figura 21. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con EPOC con diferente longitud telomérica. Los pacientes se dividieron en tertiles de T/S (relación de longitud relativa de los telómeros): T1 (T/S largo), T2 (T/S medio) y T3 (T/S corto)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

V.- DISCUSIÓN

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

Estudio transversal en pacientes con EPOC y fumadores sanos

El estudio de la cohorte a nivel transversal confirma que los pacientes con EPOC presentan telómeros en leucocitos circulantes más cortos que los fumadores sin la enfermedad, independientemente de la edad y el género. Además, la longitud de los telómeros fue más corta a edad avanzada, tanto en los pacientes con EPOC como en los fumadores control sin EPOC.

Estudios previos que evaluaron la relación entre la longitud de los telómeros y la EPOC han mostrado resultados discordantes. Morla y colaboradores (2006) no pudieron encontrar diferencias en la longitud de los telómeros entre pacientes con EPOC y fumadores sin la enfermedad, mientras que otros investigadores sí han confirmado que sujetos con EPOC presentan telómeros más cortos en comparación con fumadores y controles sanos (Houben *et al.*, 2009; Savale *et al.*, 2009; Mui *et al.*, 2009). Estos resultados discordantes entre los diferentes trabajos podrían deberse a diferencias en el tamaño muestral o a limitaciones debido a la técnica de medición, o en el diseño de los estudios, algunos de los cuales carecían de grupos controles adecuados.

Estudios transversales entre la longitud telomérica y las variables clínicas y de función pulmonar.

La ausencia de relación entre la longitud de los telómeros y los parámetros clínicos y de función pulmonar, observada en nuestra cohorte, están en consonancia con los resultados de Savale y colaboradores (2009). Estos autores sólo encontraron una correlación muy débil entre Pa_{O_2} y Pa_{CO_2} y la longitud de los telómeros, pero no con los parámetros de la función pulmonar. Por otro lado, Rode y colaboradores (2013) en un estudio

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

poblacional amplio reportaron una modesta asociación entre la longitud de los telómeros y la función pulmonar expresada por el FEV₁. Más recientemente, Rutten y colaboradores al estudiar varios marcadores de envejecimiento en pacientes con EPOC, hallaron que la longitud de los telómeros fue el único asociado con la función pulmonar (Rutten *et al.*, 2016). Todos estos estudios fueron de diseño transversal y, en consecuencia, no fueron adecuados para evaluar la posible relación entre la longitud de los telómeros y la progresión de la EPOC. Además, el único parámetro de función pulmonar evaluado fue el FEV₁, a lo que debe sumarse que se excluyeron los pacientes con comorbilidades.

Estudios transversales previos se han concentrado principalmente en la relación entre la longitud de los telómeros y el FEV₁. En nuestro estudio, ampliamos los análisis incluyendo no solo el FEV₁, sino también la hiperinsuflación pulmonar (IC/TLC), la capacidad de difusión (K_{CO}), el intercambio de gases, la afectación extrapulmonar (índice BODE) y su relación con la longitud telomérica. Sin embargo, no pudimos documentar asociación alguna entre la longitud de los telómeros y las variables mencionadas en pacientes con EPOC.

Estudio transversal en pacientes no fumadores con limitación crónica del flujo aéreo

En este estudio se muestra por primera vez un acortamiento de los telómeros en una cohorte de pacientes no fumadores con limitación del flujo de aire similar a la EPOC, que fue igual en magnitud a la observada en aquellos pacientes con EPOC debido al

70

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

tabaquismo, y más corta en ambos grupos que en individuos sanos emparejados por edad, independientemente de la edad y el género.

El humo de tabaco puede empeorar los eventos relacionados con el envejecimiento en los pulmones o puede acelerar el proceso de envejecimiento en este órgano debido a la reducción de las moléculas anti envejecimiento o al estimular las que favorecen el envejecimiento (**MacNee, 2016**). Es difícil establecer si ese acortamiento telomérico se debe a la enfermedad en sí misma o al efecto del tabaco en los pacientes con EPOC. Nuestra hipótesis sostiene que, si hubiese una relación entre la limitación del flujo de aire y la longitud de los telómeros en individuos con obstrucción de la vía aérea y sin antecedentes de tabaquismo, estos también se verían acortados.

Es interesante observar que el 75% de los no fumadores con limitación del flujo de aire tenían antecedentes de asma persistente. Esto está de acuerdo con estudios previos que han informado que los pacientes con asma grave parecen tener telómeros más cortos que los individuos control (**Kyoh et al., 2013; Belsky et al., 2014**). En contraste, los resultados difieren de los de un metanálisis que incluyó 13 estudios, donde se observó una asociación débil pero negativa entre el asma y la longitud de los telómeros (**Albrecht et al., 2014**). Los pacientes con asma en la edad adulta presentan un aumento significativo de las comorbilidades asociadas con el envejecimiento acelerado, como la EPOC, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. (**Fuchs et al., 2017**) Guerra y colaboradores sugirieron que los procesos de envejecimiento acelerado pueden aumentar el riesgo de que los pacientes con asma persistente desarrollen EPOC (**Guerra, 2014**). Estos procesos pueden tener sus propios orígenes en una predisposición genética, eventos de la primera infancia o alteraciones del desarrollo pulmonar en las primeras etapas de la vida. De hecho, los estudios de población indican que la exposición a contaminantes ambientales puede ser un desencadenante importante en el cambio de asma a EPOC. (**Zheng et al., 2015**)

71

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

Otro factor importante que sugiere una relación entre la exposición a contaminantes y la EPOC se relaciona con la inflamación crónica, asociada al estrés oxidativo posterior, inmunosenescencia celular y acortamiento de los telómeros (**Zeng et al., 2012; Faner et al., 2012; Amsellem et al., 2011**). La inflamación crónica puede ser el mecanismo etiológico responsable respaldado por la historia de bronquiectasias o tuberculosis pulmonar tratada en los individuos no fumadores con limitación del flujo de aire que no informaron asma en sus antecedentes. Los únicos estudios que exploraron esta relación mostraron telómeros más cortos y expresión alterada de inhibidores del ciclo celular y senescencia en pacientes con bronquiectasias severas (**Birch et al., 2016**). No hubo asociación entre la longitud de los telómeros y tuberculosis.

Los telómeros son altamente susceptibles al daño por estrés oxidativo debido a su alto contenido en guanidina. El daño oxidativo en las regiones de los telómeros puede inducir una respuesta persistente al daño del ADN (DDR) que da lugar a una senescencia celular replicativa independientemente de la longitud de los telómeros. (**Hewitt et al., 2012**)

Nuestros resultados muestran una falta de asociación entre la longitud de los telómeros y las variables de función pulmonar en la cohorte de pacientes no fumadores con obstrucción crónica del flujo aéreo, estando en línea con otros estudios de fumadores con EPOC. (**Houben et al., 2008; Savale et al., 2009; Mui et al., 2009**)

Estudio longitudinal en pacientes fumadores con y sin EPOC

Este es el primer estudio longitudinal que explora la relación entre la dinámica de la longitud telomérica durante un amplio tiempo de seguimiento y las variables clínicas, en

72

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

una cohorte de pacientes con EPOC. Aquellos pacientes que acortaron más sus telómeros durante el período de seguimiento tuvieron una peor afectación pulmonar a nivel alveolar y extrapulmonar, y peor caracterización clínica en comparación con aquellos cuyos telómeros no acortaron tanto. Además, los pacientes con telómeros más cortos presentaron un mayor riesgo de mortalidad por todas las causas.

Según estudios previos realizados en población general, los telómeros de los leucocitos acortan 40-105 pares de bases por año (Houben *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2015). Encontramos que, en la cohorte de pacientes con EPOC estudiada, con 64 años de edad media, la longitud media de los telómeros en el momento del reclutamiento era de 7,6 Kbp disminuyendo a 5,7 Kbp 10 años después (un desgaste de 190 pb / año). Un estudio longitudinal realizado por Ehrlenbach (2009) en sujetos sanos (edad media de 60 años) mostró un acortamiento de los telómeros de 8,2 Kbp a 7,4 Kbp en 10 años (Ehrlenbach *et al.*, 2009). También encontraron que la tasa de acortamiento de los telómeros fue menor en sujetos mayores de 70 años, un hallazgo similar al nuestro. Curiosamente, el grupo de sujetos de menos de 60 años de nuestro estudio presentó una disminución de la longitud telomérica ligeramente más rápida que los grupos de más de sesenta y setenta años. Posiblemente, alcanzar una longitud crítica en los telómeros puede ser perjudicial para el organismo, lo que provocaría, que, en los pacientes de mayor edad, se activaran mecanismos de mantenimiento para preservar la longitud de sus telómeros. Alternativamente, es probable que los pacientes con telómeros más cortos murieran antes por lo que no podemos descartar en nuestros hallazgos un fenómeno que representaría un sesgo de supervivencia.

Estudios clínicos poblacionales con muestras muy amplias han sugerido una relación entre la gravedad de la EPOC y el desarrollo de enfermedades características en ancianos (Patel *et al.*, 2006; Agustí & Celli, 2017). Recientemente, Divo y colaboradores (Divo *et al.*, 2018) utilizando un análisis de comorbilidades en red,

73

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

mostraron que los pacientes con EPOC presentan una prevalencia similar de enfermedades que se ven con frecuencia en las personas sanas de edad avanzada una o dos décadas antes que los individuos sin EPOC. El diagnóstico de EPOC se fundamentó en lo referido en las historias clínicas y no por espirometría.

Rutten y colaboradores sugirieron un desgaste anticipado de los telómeros en pacientes con EPOC correspondiente a una edad biológica 7 años mayor, aunque ese estudio fue de diseño transversal. **(Rutten et al., 2016)**

Un hallazgo importante de nuestro trabajo fue que los pacientes que acortaron más sus telómeros durante los 10 años de observación tuvieron valores de FEV₁ significativamente más bajos, así como menor K_{CO}, más hiperinflación (IC/TLC), peor oxigenación (PaO₂), mayor índice BODE y menor puntuación en la prueba de la marcha de 6 minutos (PM6M) que aquellos pacientes que no acortaron sus telómeros de forma tan acusada. Estos resultados refuerzan las hipótesis previas, basadas en estudios transversales, sobre el posible papel de los telómeros como biomarcador de gravedad en los pacientes con EPOC **(Rode et al., 2013; Rutten et al., 2016)**. Nuestros datos demuestran, por primera vez, una relación longitudinal entre el acortamiento de los telómeros y el empeoramiento de las variables clínicas y de función pulmonar más allá de las espirométricas en pacientes con EPOC. Aunque no podemos establecer la causalidad, demostramos una asociación clara entre el acortamiento de la longitud telomérica y la función extrapulmonar en la EPOC a lo largo de 10 años. Es de destacar que nuestros hallazgos respaldan el concepto de que el acortamiento de los telómeros es una de las principales causas de la disfunción tisular que caracteriza el proceso de envejecimiento *in vivo*, y ese acortamiento de los telómeros puede considerarse un biomarcador del envejecimiento.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

Curiosamente, los individuos ubicados en el tertil más bajo en cuanto a la longitud de sus telómeros durante el seguimiento presentaron un mayor riesgo de mortalidad en comparación con aquellos en el tertil más alto, independientemente de la edad, el tabaquismo acumulado y la función pulmonar. Diferentes estudios han informado resultados contradictorios sobre la posible relación entre longitud telomérica y mortalidad (**Bendix et al., 2014; Rode et al., 2015; Wang et al., 2018**), y pocos de ellos se han realizado en pacientes con EPOC. Nuestros hallazgos están de acuerdo con Lee y colaboradores (**Lee et al., 2012**), quienes encontraron que la longitud de los telómeros en leucocitos estaba relacionada con la mortalidad por todas las causas y por cáncer en pacientes con EPOC seguidos de media durante 7,5 años.

Fortalezas y limitaciones

Este estudio longitudinal tiene varias fortalezas. Las más importantes son: la naturaleza prospectiva de una cohorte observacional controlada por un equipo multidisciplinar especializado en neumología y con experiencia en técnicas de biología molecular, y la muy buena caracterización de la cohorte de pacientes reclutados en la práctica clínica (los pacientes con EPOC de estudios poblacionales pueden alejarse de la realidad clínica). Todo esto permite una amplia y rigurosa recogida de variables clínicas, de función pulmonar, comorbilidades, exacerbaciones, hospitalizaciones, mortalidad y de resultados relacionados con los pacientes. Además, el aspecto más relevante y diferencial con otros grupos de investigación es el tiempo de seguimiento de la cohorte durante 20 años con controles anuales de los pacientes. Esto es lo que posteriormente permite tener una muestra suficiente de pacientes que posibilita un análisis de parámetros biológicos basados en muestras repetidas en el tiempo durante largos periodos de seguimiento.

75

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

Nuestro estudio presenta ciertas limitaciones: en primer lugar, la longitud de los telómeros se midió en leucocitos circulantes y, por lo tanto, nuestros hallazgos pueden no reflejar exactamente el proceso que ocurre en el pulmón. Sin embargo, existen estudios que apoyan el uso de la medida de longitud de los telómeros en los leucocitos en sangre en grandes cohortes de individuos como la nuestra, debido a su accesibilidad y por ser representativa de lo que ocurre en diferentes tejidos (**Saferali et al., 2014**). En segundo lugar, el dato de longitud telomérica obtenido de cada paciente es un promedio de las diferentes longitudes teloméricas de las distintas poblaciones leucocitarias presentes en la sangre en el momento de la extracción (**Daniali et al., 2013**). Por lo tanto, el posible sesgo en la representación del grupo celular más representado entre los leucocitos fue solventado realizando medidas de la longitud telomérica solo si tras observar los hemogramas de los pacientes, estos presentaban valores de todas las subpoblaciones leucocitarias dentro de los rangos de normalidad establecidos.

En tercer lugar, la longitud telomérica de cada muestra individual es un valor medio de los telómeros de todos los cromosomas, por lo que no se determinó la carga de telómeros críticamente cortos, que se postularon como mediadores de la senescencia impulsada por los telómeros (**Bendix et al., 2010**), y está determinada por factores ambientales y genéticos, existiendo una gran variabilidad interindividual entre personas de la misma edad, lo que dificulta las comparaciones transversales.

En cuarto lugar, en cuanto a la metodología, trabajamos con medidas relativas de longitud telomérica obtenidas mediante qPCR en lugar de medidas absolutas que pueden no ser tan precisas, no obstante, los resultados de qPCR se correlacionaron fuertemente con los obtenidos con la técnica gold standard de transferencia o Southern. (**Cawthon, 2009**)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Discusión

En quinto lugar, en relación con la cohorte del estudio, observamos que los individuos fumadores sin la enfermedad incluidos como controles presentaron un historial de exposición al tabaco más bajo (dada por paquetes/año) que el grupo de pacientes con EPOC. A pesar de ello, el análisis entre fumadores actuales y exfumadores en ambas sub-cohortes no mostró diferencias significativas. Así mismo, los pacientes no fumadores con limitación del flujo aéreo tuvieron un grado de obstrucción más leve que los pacientes con EPOC, lo que limitó la relación entre la gravedad de la obstrucción de las vías respiratorias y el desgaste de los telómeros.

Finalmente, el tamaño de muestral no nos permitió contrastar la asociación entre el acortamiento telomérico con causas específicas de mortalidad, pero si hubo un número suficiente de muertes para analizar el impacto con la mortalidad general.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

VI.- CONCLUSIONES

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Conclusiones

1. Este es el primer estudio que confirma la existencia de un acortamiento acelerado de los telómeros en pacientes con EPOC en comparación con controles fumadores sanos.
2. La velocidad de acortamiento de los telómeros en los pacientes con EPOC se correlaciona inversamente con la longitud telomérica.
3. Los pacientes no fumadores con obstrucción crónica del flujo aéreo presentan un acortamiento telomérico similar a los fumadores con EPOC, y superior a los controles sanos de la misma edad, sugiriendo una influencia importante de la obstrucción de las vías respiratorias sobre la longitud telomérica.
4. Este estudio aporta los primeros resultados longitudinales, a lo largo de 10 años de seguimiento, que evidencian que un mayor acortamiento de los telómeros se asocia con un peor intercambio gaseoso alveolar, mayor hiperinsuflación pulmonar y afectación extrapulmonar en pacientes con EPOC.
5. Este es el primer estudio longitudinal que predice que desarrollar telómeros cortos o disminuir significativamente la longitud de estos a lo largo del tiempo, aumenta el riesgo de mortalidad en los pacientes con EPOC.

80

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

CONCLUSIONS

1. This is the first study to confirm the existence of accelerated telomere shortening in COPD patients compared to healthy smoking controls.
2. The speed of telomere shortening in COPD patients is inversely correlated with telomere length.
3. Non-smoking patients with chronic airflow obstruction present telomere shortening similar to smokers with COPD, and superior to healthy controls of the same age, suggesting a significant influence of airway obstruction on telomere length.
4. This study provides the first longitudinal results, over a 10-year follow-up, which show that greater telomere shortening is associated with worse alveolar gas exchange, greater pulmonary hyperinflation, and extrapulmonary involvement in patients with COPD.
5. This is the first longitudinal study to predict that developing short telomeres or significantly decreasing their length over time increases the risk of mortality in COPD patients.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

VII. BIBLIOGRAFÍA

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Agarwal, R., Chakrabarti, A., Denning, D. W., Chakrabarti, A., Triest, F. J. J., Studnicka, M., Franssen, F. M. E., Vollmer, W. M., Lamprecht, B., Wouters, E. F. M., Burney, P. G. J., Vanfleteren, L. E. G. W., Strategy, G., Obstructive, C., Disease, P., Scholars, B., Access, B. O., Commons, C., Agarwal, R., ... Denning, D. W. (2013). Gold 2020. COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 8(5), 1463–1474. <https://doi.org/10.1080/15412555.2019.1614550>

Agustí, A., & Celli, B. (2017). Natural history of COPD: gaps and opportunities. ERJ Open Research, 3(4), 117–2017. <https://doi.org/10.1183/23120541.00117-2017>

Albrecht, E., Sillanpää, E., Karrasch, S., Alves, A. C., Codd, V., Hovatta, I., Buxton, J. L., Nelson, C. P., Broer, L., Hägg, S., Mangino, M., Willemsen, G., Surakka, I., Ferreira, M. A. R., Amin, N., Oostra, B. A., Bäckmand, H. M., Peltonen, M., Sarna, S., ... Schulz, H. (2014). Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. European Respiratory Journal, 43(4), 983–992. <https://doi.org/10.1183/09031936.00046213>

Alfageme, I., de Lucas, P., Ancochea, J., Miravittles, M., Soler-Cataluña, J. J., García-Río, F., Casanova, C., Rodríguez González-Moro, J. M., Cosío, B. G., Sánchez, G., & Soriano, J. B. (2019). Nuevo estudio sobre la prevalencia de la EPOC en España: resumen del protocolo EPISCAN II, 10 años después de EPISCAN. Archivos de Bronconeumología, 55(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2018.05.011>

American Thoracic Society. (2002). ATS Statement: Guidelines for the Six-Minute Walk Test. 166, 111–117. <https://doi.org/10.1164/rccm.166/1/111>

Amsellem, V., Gary-Bobo, G., Marcos, E., Maitre, B., Chaar, V., Validire, P., Stern, J. B., Noureddine, H., Sapin, E., Rideau, D., Hue, S., Le Corvoisier, P., Le Gouvello, S., Dubois-Randé, J. L., Boczkowski, J., & Adnot, S. (2011). Telomere dysfunction causes

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(12), 1358–1366.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201105-0802OC>

Andujar, P., Courbon, D., Bizard, E., Marcos, E., Adnot, S., Boyer, L., Demoly, P., Jarvis, D., Neukirch, C., Pin, I., Thabut, G., Boczkowski, J., & Leynaert, B. (2018). Smoking, telomere length and lung function decline: a longitudinal population-based study. *Thorax*, 73(3), 283–285. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210294>

Armanios, M. (2013). Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 996–1002.
<https://doi.org/10.1172/JCI66370>

Armanios, M., & Blackburn, E. H. (2012). The telomere syndromes. *Nature Reviews Genetics*, 13(10), 693–704. <https://doi.org/10.1038/nrg3246>

Barnes, P. J., & Celli, B. R. (2009). Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal*, 33(5), 1165–1185.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00128008>

Barzilai, N., Huffman, D. M., Muzumdar, R. H., & Bartke, A. (2012). The Critical Role of Metabolic Pathways in Aging. *Diabetes*, 61(6), 1315–1322. <https://doi.org/10.2337/db11-1300>

Belsky, D. W., Shalev, I., Sears, M. R., Hancox, R. J., Lee Harrington, H., Houts, R., Moffitt, T. E., Sugden, K., Williams, B., Poulton, R., & Caspi, A. (2014). Is chronic asthma associated with shorter leukocyte telomere length at midlife? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(4), 384–391.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201402-0370OC>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Bendix, L., Horn, P. B., Jensen, U. B., Rubelj, I., & Kolvraa, S. (2010). The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells. *Aging Cell*, 9(3), 383–397. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00568.x>

Bendix, L., Thinggaard, M., Fenger, M., Kolvraa, S., Avlund, K., Linneberg, A., & Osler, M. (2014). Longitudinal Changes in Leukocyte Telomere Length and Mortality in Humans. *The Journals of Gerontology: Series A*, 69A(2), 231–239. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt153>

Birch, J., Victorelli, S., Rahmatika, D., Anderson, R. K., Jiwa, K., Moisey, E., Ward, C., Fisher, A. J., De Soyza, A., & Passos, J. F. (2016). Telomere dysfunction and senescence-associated pathways in bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193(8), 929–932. <https://doi.org/10.1164/rccm.201510-2035LE>

Blackburn, E. H., Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature Medicine*, 12(10), 1133–1138. <https://doi.org/10.1038/nm1006-1133>

Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, 350(6265), 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>

Blasco, M. A., Serrano, M., & Fernandez-Capetillo, O. (2011). Genomic instability in iPS: time for a break. *The EMBO Journal*, 30(6), 991–993. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/emboj.2011.50>

Cabrera de León, A., Rodríguez Pérez, M. del C., Almeida González, D., Domínguez Coello, S., Aguirre Jaime, A., Brito Díaz, B., González Hernández, A., & Pérez Méndez,

86

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

L. I. (2008). Presentación de la cohorte “CDC de Canarias”: objetivos, diseño y resultados preliminares. *Revista Española de Salud Pública*, 82(5), 519–534.
<https://doi.org/10.1590/S1135-57272008000500007>

Cavalcante, A. G. de M., & Bruin, P. F. C. de. (2009). O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35, 1227–1237.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132009001200011&nrm=iso

Cawthon, R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), e21–e21.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn1027>

Celli, B. R., Cote, C. G., Marin, J. M., Casanova, C., Montes de Oca, M., Mendez, R. A., Pinto Plata, V., & Cabral, H. J. (2004). The Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*, 350(10), 1005–1012.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa021322>

Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L., & MacKenzie, C. R. (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *Journal of Chronic Diseases*, 40(5), 373–383.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8)

Chong, W. F., Ong, K. C., Soh, C., Tan, S. P., Earnest, A., Heng, B. H., & Cheah, J. (2004). The Body-Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnea, and Exercise Capacity Index in predicting hospitalization for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chest*, 126(4), 841S. https://doi.org/10.1378/chest.126.4_meetingabstracts.841s-a

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Cronkhite, J. T., Xing, C., Raghu, G., Chin, K. M., Torres, F., Rosenblatt, R. L., & Garcia, C. K. (2008). Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(7), 729–737. <https://doi.org/10.1164/rccm.200804-550OC>

Daniali, L., Benetos, A., Susser, E., Kark, J. D., Labat, C., Kimura, M., Desai, K. K., Granick, M., & Aviv, A. (2013). Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nature Communications*, 4(1), 1597. <https://doi.org/10.1038/ncomms2602>

Díez, J. D. M., García, T. G., & Serrano, F. P. (2009). La EPOC, hacia una nueva visión de la enfermedad en el siglo XXI. *Revista de Patología Respiratoria*, 12(SUPPL.2), 183–189. [https://doi.org/10.1016/S1576-9895\(09\)70052-9](https://doi.org/10.1016/S1576-9895(09)70052-9)

Divo, M. J., Celli, B. R., Poblador-Plou, B., Calderón-Larrañaga, A., de-Torres, J. P., Gimeno-Feliu, L. A., Bertó, J., Zulueta, J. J., Casanova, C., Pinto-Plata, V. M., Cabrera-Lopez, C., Polverino, F., Pírez, J. C., Prados-Torres, A., & Marin, J. M. (2018). Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) as a disease of early aging: Evidence from the EpiChron Cohort. *PLoS ONE*, 13(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193143>

Ehrlebenbach, S., Willeit, P., Kiechl, S., Willeit, J., Reindl, M., Schanda, K., Kronenberg, F., & Brandstätter, A. (2009). Influences on the reduction of relative telomere length over 10 years in the population-based Bruneck Study: introduction of a well-controlled high-throughput assay. *International Journal of Epidemiology*, 38(6), 1725–1734. <https://doi.org/10.1093/ije/dyp273>

Epel, E. S. (2009). Psychological and metabolic stress: A recipe for accelerated cellular aging? *Hormones*, 8(1), 7–22. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1217>

Faner, R., Rojas, M., MacNee, W., & Agustí, A. (2012). Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of*

88

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Respiratory and Critical Care Medicine, 186(4), 306–313.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0282PP>

Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending Healthy Life Span From Yeast to Humans. *Science*, 328(5976), 321–326.
<https://doi.org/10.1126/science.1172539>

Fuchs, O., Bahmer, T., Rabe, K. F., & von Mutius, E. (2017). Asthma transition from childhood into adulthood. *The Lancet Respiratory Medicine*, 5(3), 224–234.
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30187-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30187-4)

Giardini, M. A., Segatto, M., da Silva, M. S., Nunes, V. S., & Cano, M. I. N. (2014). Chapter One - Telomere and Telomerase Biology. In R. T. B. T.-P. in M. B. and T. S. Calado (Ed.), *Telomeres in Health and Disease* (Vol. 125, pp. 1–40). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3>

GOLD 2020. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2021 report. 2020. <https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2020/11/GOLD-REPORT-2021-v1.1-25Nov20-WMV.pdf>

Gomez E., D., Armando G., R., Farina G., H., Menna Lorenzano, P., Cerrudo S., C., Ghiringhelli Daniel, P., & Alonso F., D. (2012). Telomere structure and telomerase in health and disease (Review). *Int J Oncol*, 41(5), 1561–1569.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1611>

Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the Autophagy Inflammation Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science*, 333(6046), 1109–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*, 43(2 PART 1), 405–413. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9)

Guerra, S. (2014). New asthma biomarkers: Shorter telomeres, longer disease? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(4), 356–358. <https://doi.org/10.1164/rccm.201407-1248ED>

Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F. D. M., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J., & Passos, J. F. (2012). Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nature Communications*, 3, 708. <https://doi.org/10.1038/ncomms1708>

Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>

Houben, J. M. J., Giltay, E. J., Rius-Ottenheim, N., Hageman, G. J., & Kromhout, D. (2011). Telomere Length and Mortality in Elderly Men: The Zutphen Elderly Study. *The Journals of Gerontology: Series A*, 66A(1), 38–44. <https://doi.org/10.1093/gerona/glq164>

Houben, J. M. J., Mercken, E. M., Ketelslegers, H. B., Bast, A., Wouters, E. F., Hageman, G. J., & Schols, A. M. W. J. (2009). Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine*, 103(2), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2008.09.003>

Houben, J. M. J., Moonen, H. J. J., van Schooten, F. J., & Hageman, G. J. (2008). Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radical Biology and Medicine*, 44(3), 235–246. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.001>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Jaskelioff, M., Muller, F. L., Paik, J.-H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A. C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., Horner, J. W., Maratos-Flier, E., & DePinho, R. A. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*, 469(7328), 102–106. <https://doi.org/10.1038/nature09603>

Jin, M., Lee, E. C., Ra, S. W., Fishbane, N., Tam, S., Criner, G. J., Woodruff, P. G., Lazarus, S. C., Albert, R., Connett, J. E., Han, M. K., Martinez, F. J., Aaron, S. D., Reed, R. M., Man, S. F. P., Leung, J. M., & Sin, D. D. (2018). Relationship of Absolute Telomere Length With Quality of Life, Exacerbations, and Mortality in COPD. *CHEST*, 154(2), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.05.022>

Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504–512. <https://doi.org/10.1038/nature08980>

Kirkwood, T. B. L. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120(4), 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.027>

Koga, H., Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Research Reviews*, 10(2), 205–215. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.02.001>

Kyoh, S., Venkatesan, N., Poon, A. H., Nishioka, M., Lin, T.-Y., Bagloli, C. J., Eidelman, D. H., & Hamid, Q. (2013). Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(2), 480-482.e2. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.010>

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*, 149(2), 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Lange, P., Celli, B., Agustí, A., Boje Jensen, G., Divo, M., Faner, R., Guerra, S., Marott, J. L., Martinez, F. D., Martinez-Camblor, P., Meek, P., Owen, C. A., Petersen, H., Pinto-Plata, V., Schnohr, P., Sood, A., Soriano, J. B., Tesfaigzi, Y., & Vestbo, J. (2015). Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*, 373(2), 111–122. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1411532>

Lara, B. (2010). EPOC y déficit de alfa-1-antitripsina. *Archivos de Bronconeumología*, 46, 2–8. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(10\)70026-0](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(10)70026-0)

Lee, J., Sandford, A. J., Connett, J. E., Yan, J., Mui, T., Li, Y., Daley, D., Anthonisen, N. R., Brooks-Wilson, A., Man, S. F. P., & Sin, D. D. (2012). The Relationship between Telomere Length and Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *PLOS ONE*, 7(4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035567>

Lin, Y., Damjanovic, A., Metter, E. J., Nguyen, H., Truong, T., Najarro, K., Morris, C., Longo, D. L., Zhan, M., Ferrucci, L., Hodes, R. J., & Weng, N. (2014). Age-associated telomere attrition of lymphocytes in vivo is co-ordinated with changes in telomerase activity, composition of lymphocyte subsets and health conditions. *Clinical Science*, 128(6), 367–377. <https://doi.org/10.1042/CS20140481>

López-Campos, J. L., Soler-Cataluña, J. J., & Miravittles, M. (2020). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2019 Report: Future Challenges. *Archivos de Bronconeumología*, 56(2), 65–67. <https://doi.org/10.1016/j.arbr.2019.06.014>

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

Lord, C. J., & Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), 287–294. <https://doi.org/10.1038/nature10760>

92

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Maca-Meyer, N., Villar, J., Pérez-Méndez, L., De León, A. C., & Flores, C. (2004). A Tale of Aborigines, Conquerors and Slaves: Alu Insertion Polymorphisms and the Peopling of Canary Islands. *Annals of Human Genetics*, 68(6), 600–605. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2003.00125.x>

MacNee, W. (2016). Is chronic obstructive pulmonary disease an accelerated aging disease? *Annals of the American Thoracic Society*, 13, S429–S437. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201602-124AW>

Martínez, P., & Blasco, M. A. (2017). Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *Journal of Cell Biology*, 216(4), 875–887. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610111>

Mather, K. A., Jorm, A. F., Parslow, R. A., & Christensen, H. (2011). Is Telomere Length a Biomarker of Aging? A Review. *The Journals of Gerontology: Series A*, 66A(2), 202–213. <https://doi.org/10.1093/gerona/glq180>

Miller, A. (1991). Medical Section of the American Lung Association Lung Function Testing: Selection of Reference Values and. *Am Rev Respir Dis*, 144(5), 1202–1218.

Miravittles, M., Soler-Cataluña, J. J., Calle, M., Molina, J., Almagro, P., Quintano, J. A., Trigueros, J. A., Cosío, B. G., Casanova, C., Antonio Riesco, J., Simonet, P., Rigau, D., Soriano, J. B., & Ancochea, J. (2017). Spanish Guidelines for Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GesEPOC) 2017. Pharmacological Treatment of Stable Phase. *Archivos de Bronconeumología*, 53(6), 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.03.018>

Morlá, M., Busquets, X., Pons, J., Sauleda, J., MacNee, W., & Agustí, A. G. N. (2006). Telomere shortening in smokers with and without COPD. *European Respiratory Journal*, 27(3), 525 LP – 528. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00087005>

93

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Mui, T. S. Y., Man, J. M., McElhaney, J. E., Sandford, A. J., Coxson, H. O., Birmingham, C. L., Li, Y., Man, S. F. P., & Sin, D. D. (2009). TELOMERE LENGTH AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE: EVIDENCE OF ACCELERATED AGING. *Journal of the American Geriatrics Society*, 57(12), 2372–2374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2009.02589.x>

Palm, W., & de Lange, T. (2008). How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 301–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350>

Patel, B. D., Loo, W. J., Tasker, A. D., Screaton, N. J., Burrows, N. P., Silverman, E. K., & Lomas, D. A. (2006). Smoking related COPD and facial wrinkling: is there a common susceptibility? *Thorax*, 61(7), 568–671. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.053827>

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36–e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>

Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 959–991. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>

Rando, T. A., & Chang, H. Y. (2012). Aging, Rejuvenation, and Epigenetic Reprogramming: Resetting the Aging Clock. *Cell*, 148(1), 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.003>

Rode, L., Bojesen, S. E., Weischer, M., Vestbo, J., & Nordestgaard, B. G. (2013). Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46 396 individuals. *Thorax*, 68(5), 429–435. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202544>

94

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Rode, L., Nordestgaard, B. G., & Bojesen, S. E. (2015). Peripheral Blood Leukocyte Telomere Length and Mortality Among 64 637 Individuals From the General Population. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv074>

Russell, S. J., & Kahn, C. R. (2007). Endocrine regulation of ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 681–691. <https://doi.org/10.1038/nrm2234>

Rutten, E. P. A., Gopal, P., Wouters, E. F. M., Franssen, F. M. E., Hageman, G. J., Vanfleteren, L. E., Spruit, M. A., & Reynaert, N. L. (2016). Various Mechanistic Pathways Representing the Aging Process Are Altered in COPD. *CHEST*, 149(1), 53–61. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0645>

Saferali, A., Lee, J., Sin, D. D., Rouhani, F. N., Brantly, M. L., & Sandford, A. J. (2014). Longer telomere length in COPD patients with α 1-antitrypsin deficiency independent of lung function. *PloS One*, 9(4), e95600–e95600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095600>

Salvi, S. S., & Barnes, P. J. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet*, 374(9691), 733–743. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61303-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61303-9)

Savale, L., Chaouat, A., Bastuji-Garin, S., Marcos, E., Boyer, L., Maitre, B., Sarni, M., Housset, B., Weitzenblum, E., Matrat, M., Le Corvoisier, P., Rideau, D., Boczkowski, J., Dubois-Randé, J.-L., Chouaid, C., & Adnot, S. (2009). Shortened Telomeres in Circulating Leukocytes of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 179(7), 566–571. <https://doi.org/10.1164/rccm.200809-1398OC>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>

Slagboom, P. E., Droog, S., & Boomsma, D. I. (1994). Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *American Journal of Human Genetics*, 55(5), 876–882. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7977349>

Soriano, J. B., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abera, S. F., Agrawal, A., Ahmed, M. B., Aichour, A. N., Aichour, I., Eddine Aichour, M. T., Alam, K., Alam, N., Alkaabi, J. M., Al-Maskari, F., Alvis-Guzman, N., Amberbir, A., Amoako, Y. A., Ansha, M. G., Antó, J. M., Asayesh, H., ... Vos, T. (2017). Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Respiratory Medicine*, 5(9), 691–706. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(17\)30293-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(17)30293-X)

Soriano, J. B., Alfageme, I., Miravittles, M., de Lucas, P., Soler-Cataluña, J. J., García-Río, F., Casanova, C., Rodríguez González-Moro, J. M., Cosío, B. G., Sánchez, G., & Ancochea, J. (2021). 2021. "Prevalence and Determinants of COPD in Spain: EPISCAN II." *Archivos de Bronconeumología* 57(1): 61–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arbres.2020.07.024>.

Talens, R. P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H. E. D., Slagboom, P. E., Boomsma, D. I., & Heijmans, B. T. (2012). Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell*, 11(4), 694–703. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00835.x>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Bibliografía

Vestbo, J., Hurd, S. S., Agustí, A. G., Jones, P. W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P. J., Fabbri, L. M., Martínez, F. J., Nishimura, M., Stockley, R. A., Sin, D. D., & Rodríguez-Roisin, R. (2013). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(4), 347–365. <https://doi.org/10.1164/rccm.201204-0596PP>

Wang, Q., Zhan, Y., Pedersen, N. L., Fang, F., & Hägg, S. (2018). Telomere Length and All-Cause Mortality: A Meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 48, 11–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.09.002>

Zeng, G., SUN, B., & ZHONG, N. (2012). Non-smoking-related chronic obstructive pulmonary disease: A neglected entity? *Respirology*, 17(6), 908–912. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02152.x>

Zhang, G., Li, J., Purkayastha, S., Tang, Y., Zhang, H., Yin, Y., Li, B., Liu, G., & Cai, D. (2013). Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature*, 497(7448), 211–216. <https://doi.org/10.1038/nature12143>

Zheng, X., Ding, H., Jiang, L., Chen, S., Zheng, J., Qiu, M., Zhou, Y., Chen, Q., & Guan, W. (2015). Association between Air Pollutants and Asthma Emergency Room Visits and Hospital Admissions in Time Series Studies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 10(9), e0138146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138146>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

VIII. ANEXOS

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ANEXO I

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Anexo I

8.1.- Artículo 1

“Acortamiento telomérico y envejecimiento acelerado en EPOC: hallazgos en la cohorte BODE”

Autores: Córdoba-Lanús E¹, Cazorla-Rivero S², Espinoza-Jiménez A², de-Torres JP³, Pajares MJ⁴, Aguirre-Jaime A², Celli B⁵, Casanova C^{2,6}

Información de los autores:

¹Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Ctra. del Rosario 145, 38010, Santa Cruz de Tenerife, España. elizabeth-cordoba@hotmail.com

²Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Ctra. del Rosario 145, 38010, Santa Cruz de Tenerife, España.

³Departamento Neumología, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, España.

⁴Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), UNAV, Pamplona, España.

⁵Pulmonary and Critical Care Department, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

DOI: 10.1186/s12931-017-0547-4.

Revista: Respiratory Research

Fecha publicación: abril de 2017

Factor de Impacto (IF): 3,751

Cuartil: Q1

102

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Anexo I

8.2.- Resumen

Antecedentes: la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) puede estar asociada con un envejecimiento acelerado. El acortamiento de los telómeros es un biomarcador de envejecimiento. Los estudios transversales describen telómeros más cortos en la EPOC en comparación con controles apareados por edad. Ningún estudio ha descrito la trayectoria de la longitud de los telómeros y su relación con la progresión de la EPOC.

Investigamos el acortamiento de los telómeros a lo largo del tiempo y su relación con los parámetros clínicos y de función pulmonar en una cohorte de pacientes con EPOC y en controles fumadores sin EPOC.

Métodos: la longitud de los telómeros se midió en los leucocitos circulantes mediante qPCR en 121 muestras de fumadores con EPOC y 121 fumadores sin EPOC pareados por edad (T/S₀). Las mediciones se repitieron en 70 de esos pacientes con EPOC y 73 fumadores sin la enfermedad después de 3 años de seguimiento (T/S₃).

Resultados: En el análisis inicial, se determinaron telómeros más cortos en pacientes con EPOC en comparación con los controles fumadores (T/S₀ = 0,68 ± 0,25 vs. 0,88 ± 0,52, p = 0,003), independientemente de la edad y el sexo. Durante el período de seguimiento, observamos un acortamiento acelerado de los telómeros en individuos con EPOC en contraste con los controles fumadores (T/S₀ = 0,66 ± 0,21 vs. T/S₃ = 0,46 ± 0,16, p < 0,001, para los pacientes con EPOC y T/S₀ = 0,83 ± 0,56 vs. T/S₃ = 0,74 ± 0,52, p = 0,023 para los controles; GLIM, p = 0,001). Este acortamiento se vio inversamente relacionado con la longitud de los telómeros basales (r = -0,49, p < 0,001). No se encontró una relación significativa entre la tasa de cambio en la longitud de los telómeros y el cambio en la función pulmonar en los pacientes con EPOC (p > 0,05).

103

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Anexo I

Conclusiones: los pacientes con EPOC experimentan un acortamiento acelerado de los telómeros en comparación con fumadores sin la enfermedad, y esta tasa de cambio depende de la longitud inicial de sus telómeros. Además, la longitud de los telómeros y su tasa de acortamiento no pareció relacionarse con cambios en los parámetros clínicos y de la función pulmonar durante 3 años de seguimiento.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

RESEARCH

Open Access



Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort

Córdoba-Lanús Elizabeth^{1*}, Cazorla-Rivero Sara¹, Espinoza-Jiménez Adriana¹, Juan P. de-Torres³, Pajares María-José⁴, Aguirre-Jaime Armando¹, Celli Bartolomé⁵ and Casanova Ciro^{1,2}

Abstract

Background: Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) may be associated with accelerated aging. Telomere shortening is a biomarker of aging. Cross-sectional studies describe shorter telomeres in COPD compared with matched controls. No studies have described telomere length trajectory and its relationship with COPD progression. We investigated telomere shortening over time and its relationship to clinical and lung function parameters in a COPD cohort and smoker controls without COPD.

Methods: At baseline leukocyte telomere length was measured by qPCR in 121 smokers with COPD and 121 without COPD matched by age (T/S₀). The measurements were repeated in 70 of those patients with COPD and 73 non-COPD smokers after 3 years of follow up (T/S₃).

Results: At initial measurement, telomeres were shorter in COPD patients when compared to smoker controls (T/S = 0.68 ± 0.25 vs. 0.88 ± 0.52, $p = 0.003$) independent from age and sex. During the follow-up period, we observed an accelerated telomere shortening in individuals with COPD in contrast to smoker controls (T/S₀ = 0.66 ± 0.21 vs. T/S₃ = 0.46 ± 0.16, $p < 0.001$, for the patients with COPD and T/S₀ = 0.83 ± 0.56 vs. T/S₃ = 0.74 ± 0.52, $p = 0.023$ for controls; GLIM, $p = 0.001$). This shortening was inversely related to the baseline telomere length ($r = -0.49$, $p < 0.001$). No significant relationship was found between the rate of change in telomere length and change in lung function in the patients with COPD ($p > 0.05$).

Conclusions: Compared with smokers, patients with COPD have accelerated telomere shortening and this rate of attrition depends on baseline telomere length. Furthermore, the telomere length and its rate of shortening did not relate to clinical and lung function parameters changes over 3 years of follow-up.

Keywords: COPD, Telomeres, Aging

Background

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a major cause of morbidity and mortality throughout the world, is thought to result from the interaction of environmental agents such as tobacco smoking or exposure to biomass fuel and inherited genetic factors [1]. COPD is a multidimensional disease that frequently coexists with other age-related co-morbidities such as osteoporosis, cardiovascular disease, lung cancer, depression and diabetes [2, 3].

It has been suggested that COPD is a disease of accelerated aging [4, 5] and telomere length has been proposed as a biomarker of aging [6, 7]. Telomeres consist of stretches of repetitive hexanucleotides (5'-TTAGGG-3') that protect the end of chromosomes from being recognized as double-strand breaks and avoid truncation. Because the DNA cannot be duplicated at the end of the chromosome, each duplication results in its shortening. Thus, telomeres get progressively shorter as cells divide, an event that is known as the end-replication process. Other mechanisms may also account for the accelerated loss of telomeres, such as the DNA damage induced by oxidative stress [8].

There is no uniform acceptance of the interaction between telomere length and COPD. However, some studies

* Correspondence: elizabeth-cordoba@hotmail.com

¹Research Unit, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Ctra. del Rosario 145, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

have shown that patients with COPD exhibit shorter telomeres in circulating leukocytes compared to age matched smokers without COPD [9, 10]. Some authors have proposed that telomere shortening might be accelerated in patients with COPD and serve as a biomarker of disease progression [11], a theory that has some clinical support because the telomere length in peripheral leukocytes of patients with COPD has been related to important health outcomes such as all-cause and cancer mortality [12].

The unanswered question fueling the debate about the meaning of telomere shortening in patients with COPD is that all of the studies performed have been cross-sectional in design, not informing whether there are changes in length over time and whether there is any relationship between those changes and outcomes. That this is possible in COPD is highlighted by a recent study that analyzed leukocyte telomere trajectory in a cohort of individuals with coronary artery disease and found that this is powerfully influenced by baseline telomere length in a pattern suggestive of negative feedback regulation [13].

The aim of the present study was to investigate if telomere shortening occurs over time in patients with COPD and if this shortening is related to clinical and lung function parameters.

Methods

Subjects

A total of 422 subjects were screened for this study at the Hospital Universitario La Candelaria, Tenerife and the Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain. From these, the control group of 165 smokers without COPD had a smoking history of > 15 pack-years and normal lung function ($FEV_1 > 80\%$; $FEV_1/FVC \geq 0.70$). There were 257 smokers with COPD followed annually as part of the BODE study [14]. Inclusion criteria: age > 40 years, smoking history >15 pack-years and post-bronchodilator FEV_1/FVC ratio < 0.70 measured 20 min after administration of 400 mg of albuterol. Pulmonary function test, spirometry lung volumes and exercise capacity were measured according to ATS-ERS guidelines [15–17] using the European Community for Steel and Coal as reference values [18]. Dyspnea was evaluated by mMRC scale [19]. The BODE Index was calculated as previously described [14]. Co-morbidity was quantified using the Charlson index [20]. Patients were clinically stable (no exacerbation for at least 6 weeks) at the time of evaluation. Repeated determinations of the complete blood count revealed similar values at all visits. Exclusion criteria: uncontrolled co-morbidities such as malignancy at baseline, asthma or other pulmonary conditions than COPD. From the screened group, 121 patients with COPD were matched with 121 smokers without COPD and were included in the present study for baseline

comparison (Fig. 1). From these subjects, 70 patients with COPD age-matched with 73 control smokers returned for all follow-up evaluations over 3-years and were analyzed in the longitudinal study. The individuals included in the final analysis did not have any relevant clinical difference with the ones that did not complete the 3-year study (see Additional files 1 and 2). The study was approved by the institutional review board at both hospitals. All participants provided written informed consent.

Telomere length measurement

Venous blood was obtained at baseline and at the third-year post enrollment. DNA was extracted from leukocytes using the QIAamp DNA Mini Kit (GE Healthcare). Telomere length was measured using a qPCR based protocol previously published [21, 22]. Briefly, DNA samples were quantified using the Nanodrop lite spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Telomere length measurement was performed in triplicate using 20 ng of DNA. Intra-plate coefficients of variance (CV) were calculated between the replicates and samples with $CV > 5\%$ were excluded from further analysis. As a reference DNA sample with shorter telomeres we used the DNA from MCF-7 cells. For longer telomeres, we assayed a DNA from a young control individual. These calibrator samples were assayed in triplicate on each PCR plate to control for variation between plates. Inter-assay variability was controlled by measuring two control DNA samples per run as a normalizing factor. Inter-plate CV for the calibrator sample was calculated to be <9%. Standard curves were derived from serially diluted reference DNA. Albumin, being a single copy gene, was used as a reference gene. The primer sequences and cycling conditions for the measurement of telomere length were the same used by others [22]. qPCR reactions were performed in 20 μ L reactions for each individual: 10 μ L SYBRGreen PCR Master Mix (BioRad), 0.9 μ M of Telg and Telc and 0.6 μ M of Albu and Alb. All the reactions were performed on triplicates of the telomere and reference gene assays on the iQ Cycler Real-Time PCR Instrument (BioRad).

Telomere length was calculated as a ratio of telomere to albumin as previously described [22]. The T/S ratio for an experimental DNA sample is T, the number of nanograms of the Standard DNA that matches the experimental sample for copy number of the telomere template, divided by S, the number of nanograms of the standard DNA that matches the experimental sample for copy number of the albumin single copy gene. The telomere length standardized to the reference single copy gene (T/S) was calculated using the “ $\Delta\Delta C_p$ with efficiency correction” calculation method [23].

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

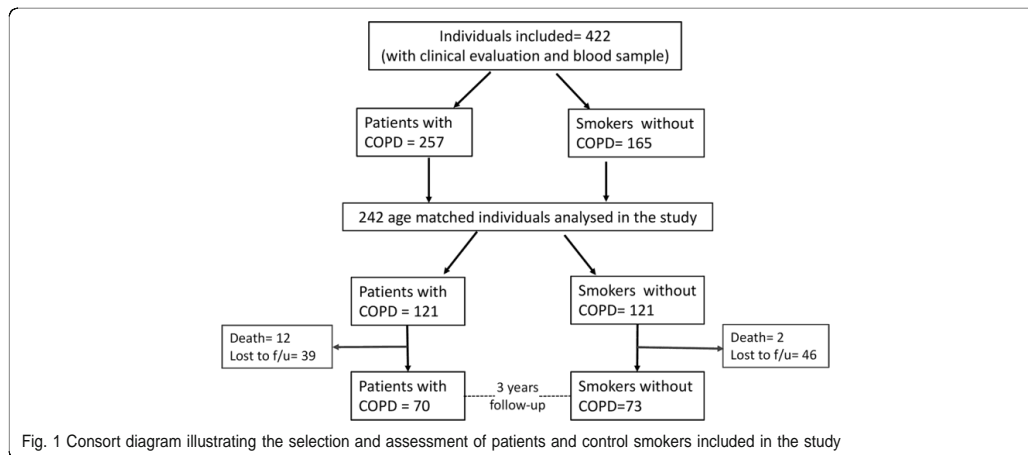


Fig. 1 Consort diagram illustrating the selection and assessment of patients and control smokers included in the study

Statistical analysis

For the cross-sectional analysis, patients with COPD were categorized in three groups by telomere length ratio (T/S) tertiles at baseline: shorter, medium or longer telomeres.

For the longitudinal analysis, telomere length changes were calculated as the difference between baseline (T/S₀) and the third year (T/S₃) of the telomere length measure. Individuals analyzed for follow-up were categorized as follows: subjects showing a steeper rate of telomere shortening in contrast to subjects with a lower telomere shortening rate, maintenance or lengthen of their telomeres (defined by the median telomere length change).

A t-Student, ANOVA, Chi² and Paired Sample T test were used to test differences in means and proportions of baseline and follow-up characteristics between groups. The association between baseline telomere length (T/S) or telomere length change with clinical and/or pulmonary function variables was explored using Pearson's correlation coefficients. A multiple logistic regression was performed to test the association of telomere length with COPD susceptibility adjusting for age, sex and pack years. By using a general linear modelling for repeated measures (GLIM) we tested the telomere dynamics difference between patients with COPD and smokers without COPD, or within these groups between current and former smokers. We also conducted a longitudinal analysis to evaluate the progression of the disease of clinical and pulmonary function variables using change in telomere length as comparative factor (GLIM). SPSS 20.0 IBM Co software was used for all statistical analyses and two-tailed *p*-values < 0.05 were considered significant.

Results

Baseline findings

The clinical characteristics and lung function data of the 121 COPD patients and 121 controls at baseline, are summarized in Table 1. The range of airflow obstruction distributed by GOLD stages in COPD was as follows: 1 (19.8%), 2 (43%), 3 (28.9%) and 4 (8.3%). As expected, patients with COPD had worse lung function and a higher BODE index than controls. However, the two groups were similar in age, sex, BMI and Charlson co-morbidity score. Although the total pack years smoking was higher in COPD patients, there were more current smokers in the control group. Telomere length measured by the T/S ratio inversely correlated with age in COPD ($r = -0.21$; $p = 0.02$) and in smoker controls ($r = -0.19$; $p = 0.02$). Given this relationship, all subsequent analyses were adjusted by age.

COPD patients had significant shorter telomeres than smokers without COPD (T/S = 0.68 ± 0.25 vs. 0.88 ± 0.52 , $p < 0.0001$) even after adjusting for age, sex and pack-years (95% CI: 0.11–0.64, $p = 0.003$), (Table 1 and Fig. 2). There were no significant differences between males (0.68 ± 0.28) and females (0.66 ± 0.20) within the COPD group or in the smokers (0.82 ± 0.53 vs. 0.96 ± 0.49 for males and females, respectively).

There was no relationship between telomere length and the clinical and lung function parameters (Table 2) or between patients with less and more severe COPD (GOLD 1–2 vs. GOLD 3–4 or BODE ≤ 2 vs. BODE > 2) ($p > 0.05$). In addition, no significant associations were found between comorbidities such as cardiovascular events, diabetes, hypertension or cancer and relative telomere length in patients with COPD.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 19/04/2021 12:16:31

Aída Elizabeth Córdoba Lanús
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 15:06:49

Ciro Casanova Macario
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 17:06:05

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

10/05/2021 10:12:30

Table 1 Baseline characteristics of COPD patients and smokers without COPD included in the study

Variable	COPD cases (N= 121)	Smokers (N= 121)	p-value
Sex (male%)	66	62	N.S.
Age (years) ^a	57 ± 8	57 ± 8	N.S.
BMI (Kg/m ²) ^a	27 ± 5	28 ± 4	N.S.
Smoking habit ^c (pack-yrs) ^{bc}	60 ± 25	44 ± 22	<0.0001
Active smoking (%)	50	64	0.027
T/S ratio ^a	0.68 ± 0.25	0.88 ± 0.52	<0.0001
FEV ₁ (L) ^a	1.66 ± 0.7	2.9 ± 0.7	<0.0001
FEV ₁ (% pred) ^a	59 ± 21	101 ± 14	<0.0001
FVC (% pred) ^a	89 ± 22	108 ± 15	<0.0001
FEV ₁ / FVC (%) ^a	53 ± 12	76 ± 5	<0.0001
PaO ₂ (mmHg) ^a	72.3 ± 14.3	78.7 ± 10	<0.001
K _{CO} (%)	79.6 ± 25.1	97.3 ± 21.3	0.001
IC/TLC (%)	36 ± 9	45 ± 8	<0.001
6MWD (m) ^a	523 ± 89	551 ± 76	0.03
mMRC dyspnea ^b	1 (0–2)	0 (0–0)	0.006
BODE index ^b	1 (0–3)	0 (0–1)	<0.001
Charlson index ^b	0 (0–1)	0 (0–0)	N.S.

Data are presented as ^amean ± SD and ^bmedian (25th–75thpc) and compared by Student's *t*-test or Chi₂ test. ^cNumber of packs of cigarettes smoked per day x number of years smoking. Percentage BMI body mass index, T/S ratio relative telomere length, FEV₁ forced expiratory volume in one second, FVC forced vital capacity, % pred per cent predicted. PaO₂ partial oxygen tension, K_{CO} diffusion capacity of carbon monoxide, IC/TLC inspiratory to total lung capacity ratio, 6MWD six-min walk distance test. N.S non-significant

Telomere length dynamics

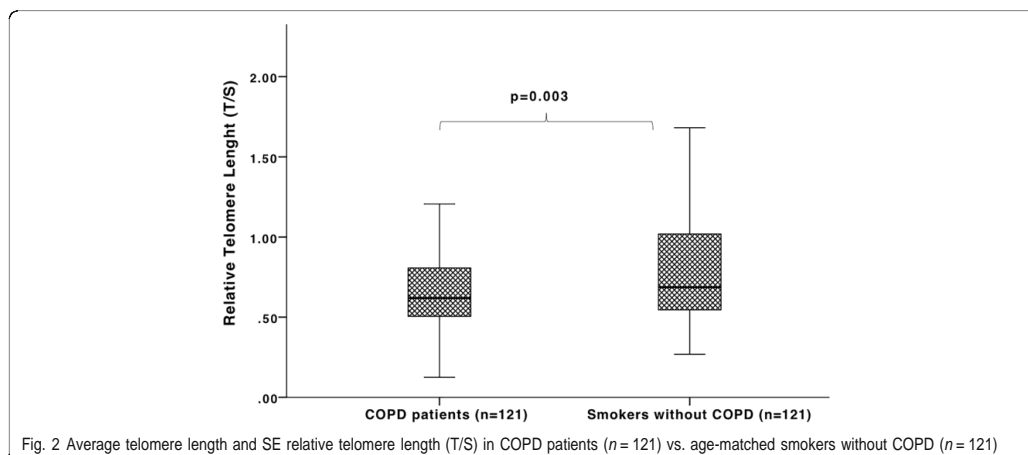
This difference in telomere length remained significant after 3 years between the 70 patients with COPD age matched with 73 smoker controls that presented the follow-up (T/S₃ = 0.46 ± 0.16 vs. 0.74 ± 0.52, *p* < 0.001); even after adjusting for age, sex and smoking habit in a logistic regression analysis (95% CI: 0.12–0.90), *p* = 0.03).

The telomere length ratio in the control group of smokers without COPD, decreased significantly (T/S₀ = 0.83 ± 0.56 vs. T/S₃ = 0.74 ± 0.52, *p* = 0.002) after the follow-up period. The same occurred in the group of patients with COPD (T/S₀ = 0.66 ± 0.21 vs. T/S₃ = 0.46 ± 0.16, *p* < 0.001). However, when we compared the telomere trajectory between these groups over the follow-up period, we observed an accelerated telomere shortening in individuals with COPD in contrast to the control group (GLIM, general lineal model for repetitive measures, *p* = 0.001) (Fig. 3).

Relation of telomere length change and clinical variables
 We found a strong relationship between baseline telomere length and change in telomere length (*r* = -0.49, *p* < 0.001; adjusted by age) (Fig. 4).

Compared with COPD patients that did not change, lengthened or had a low rate of telomere shortening, those patients with a more rapid shortening of their telomeres had similar lung function characteristics (Table 3).

By using correlation matrices, we were not able to find any significant relationship between the rate of change in telomere length and change in lung function in the patients with COPD (see Additional file 3). This lack of association was seen whether we compared current vs. former smokers, number of comorbidities or mortality (Chi₂, *p* > 0.05).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Table 2 Pulmonary function characteristics of the three groups of patients with COPD defined by their baseline telomere length

Variable	Short T/S ^a (n = 40)	Medium T/S ^a (n = 41)	Long T/S ^a (n = 40)	p-value
T/S ratio ^b	0.44 ± 0.09	0.66 ± 0.07	1.09 ± 0.21	<0.001
Sex (male%)	65	66	67	N.S.
Age (years) ^b	59 ± 7	58 ± 8	55 ± 9	N.S.
BMI (Kg/m ²) ^b	28 ± 6	27 ± 5	27 ± 5	N.S.
Smoking habit ^d (pack-yrs) ^{bd}	62 ± 28	63 ± 24	57 ± 23	N.S.
Active smoking (%)	42	56	52	N.S.
FEV ₁ (L) ^b	1.70 ± 0.71	1.64 ± 0.67	1.66 ± 0.74	N.S.
FEV ₁ (% pred) ^b	61 ± 23	59 ± 21	58 ± 21	N.S.
FVC (% pred) ^b	89 ± 24	92 ± 22	87 ± 21	N.S.
FEV ₁ / FVC (%) ^b	55 ± 12	51 ± 13	53 ± 12	N.S.
PaO ₂ (mmHg) ^b	71.1 ± 15.7	71.9 ± 15.8	73.5 ± 11.5	N.S.
K _{co} (%)	74.1 ± 25.6	75.5 ± 24.1	75.2 ± 21.1	N.S.
IC/TLC (%)	37 ± 6	36 ± 8	35 ± 10	N.S.
6MWD (m) ^b	517 ± 77	537 ± 95	513 ± 92	N.S.
mMRC dyspnea ^c	1 (0–2)	1 (0–2)	1 (0–2)	N.S.
BODE index ^c	1 (0–2)	1 (0–3)	1 (0–3)	N.S.
Charlson index ^c	0 (0–1)	0 (0–1)	0 (0–1)	N.S.

^aGroups defined by telomere length (T/S) tertiles: <0.54, 0.54–0.73 and >0.73. Data are presented as ^bmean ± SD and ^cmedian (25th–75thpc) and compared by ANOVA test or Chi₂ test. ^dNumber of packs of cigarettes smoked per day x number of years smoking. BMI body mass index, T/S ratio relative telomere length, FEV₁ forced expiratory volume in one second, FVC forced vital capacity, % pred per cent predicted. PaO₂ partial oxygen tension, K_{co} diffusion capacity of carbon monoxide, IC/TLC inspiratory to total lung capacity ratio, 6MWD six-min walk distance test. N.S non-significant

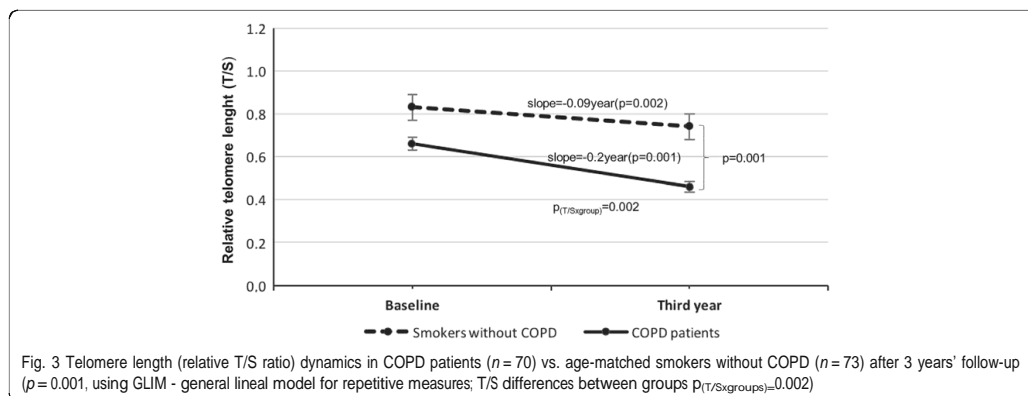
Discussion

This longitudinal study shows that COPD patients experience an accelerated telomere shortening process compared with smokers without COPD and this telomere attrition occurs in close relation to baseline telomere length. The study also confirms that patients

with COPD have shorter telomeres than smokers who do not have COPD. However, there were no associations between telomere length and clinical and lung function parameters at baseline or between changes in telomere length and change in those parameters overtime. To our knowledge, this is the first study reporting the course of telomere length change in a well-characterized cohort of patients with COPD and smoker controls.

Telomere length and change over time

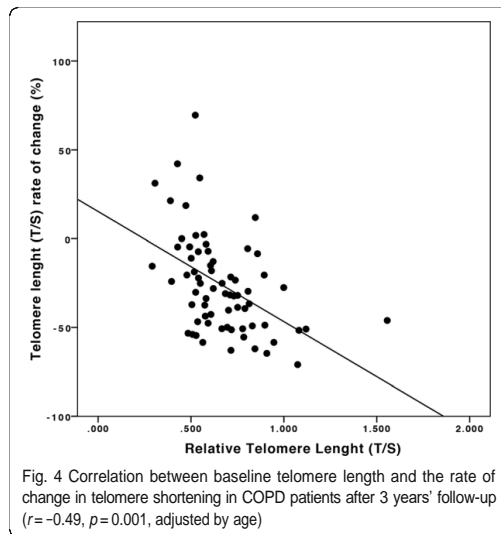
In our study, at baseline, telomere length was shorter with older age, both in the COPD patients and the smokers without COPD. However, COPD patients presented shorter telomeres than the control group independent of age and sex. Other studies evaluating the relation between telomere length and COPD have shown discordant results. Morla et al. [24] failed to find a difference in telomere length between COPD patients and smokers, whereas some other studies have reported shorter telomeres in subjects with COPD compared to smokers and healthy individuals [8, 10]. These discordant results may have been due to differences in sample size in the studies or by technical bias or defects in study design, some of which lacked of appropriate controls. We found no relationship between telomere length and clinical or lung function parameters in our COPD cohort in the cross-sectional analysis. This is in agreement with the results of Savale et al. [9] who described a borderline correlation between PaO₂ and PaCO₂ and telomere length but strangely not to lung function parameters. However, Rode et al. [25] in a study of more than 45.000 individuals in a Danish population reported a modest correlation between telomere length and the lung function expressed by the FEV₁. More recently, Rutten et al. studying several markers of aging in patients with COPD, found telomere length to be the only one associated with lung function [26]. All these studies



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguilar Aguilar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Fazareh et al. [13] analyzed leukocyte telomere trajectory over 5 years in a cohort of individuals with coronary artery disease and found, as we have, that telomere shortening rate is powerfully influenced by baseline telomere length. Our results support a pattern suggestive of negative feedback regulation in the telomere shortening dynamics, as has been proposed by others [29]. It may be that once a critical telomere length has been reached, activation of certain mechanisms in the cells occur to prevent telomere shortening over years accounting for less attrition per replication or maintenance of viable telomere lengths in subjects with shorter telomeres.

The exact reason why telomeres shorten faster in patients with COPD was beyond the scope of this study. However, oxidative stress and inflammation are the most important factors thought to be responsible for the loss of telomeric DNA [8], which in turn may favor the development of structural tissue damage [30]. Studies on mouse models of accelerated aging and lung dysfunction, suggested that this process might enhance susceptibility to COPD [5].

were cross-sectional in design and in consequence not adequate to evaluate the possible relationship between telomere length and COPD progression. In addition, the only lung function parameter evaluated was FEV₁ and patients with comorbidities were excluded.

The current report is the first one to document that COPD patients have an accelerated rate of telomere shortening in contrast to smoker controls, and this difference was more marked in those individuals with longer baseline telomeres. In our study, 85% of the COPD patients showed telomere length shortening after 3 years of follow-up, a proportion that is similar to that observed in general population studies [27–29], however, the rate of decline is significantly lower in those normal individuals. It is important to compare our findings with that of other populations including different pathologies.

Telomere length and clinical variables

Previous cross-sectional studies have concentrated primarily on the relationship between telomere length and the FEV₁. We expanded on those studies relating not only FEV₁, but also lung hyperinflation (IC/TLC), diffusion capacity (K_{CO}) and gas exchange to telomere length. Disappointingly, we were unable to document any association between telomere length in COPD patients with any clinical or functional expression of the disease or presence of any comorbidities at baseline. This is in general agreement with most of the published studies that have reported poor associations, if any, between the actual telomere length and the FEV₁. Of interest, the studies that have described an association between telomere shortening and lower FEV₁ have included larger sample size, thus facilitating a statistical significance to those

Table 3 Pulmonary function variables over time and telomere length rate of change in COPD patients

Variable	High rate of shortening ^b (n = 35)			Low rate of shortening maintenance or lengthening ^c (n = 35)		
	Baseline	3-years	p-value	Baseline	3-years	p-value
FEV ₁ (L)	1.66 ± 0.72	1.59 ± 0.68	0.04	1.60 ± 0.5	1.52 ± 0.5	0.15
FEV ₁ (%pred)	59 ± 20	58 ± 20	0.63	59 ± 19	58 ± 19	0.54
FVC (L)	3.01 ± 0.99	2.95 ± 0.98	0.35	3.15 ± 0.94	3.01 ± 0.97	0.12
FEV ₁ /FVC	54 ± 10	53 ± 11	0.21	52 ± 12	52 ± 13	0.77
PaO ₂ (mmHg)	73.5 ± 7.9	70.9 ± 9.6	0.04	72.1 ± 12.9	68.8 ± 11.6	0.09
K _{CO} (%) ^a	77.3 ± 23.7	74.9 ± 23.4	0.21	74.4 ± 19.1	70.6 ± 20.4	0.16
IC/TLC (%)	35 ± 9	31 ± 10	0.03	36 ± 8	32 ± 8	0.02

Data are presented as mean ± SD and were compared by Paired Sample T-Test. FEV₁ forced expiratory volume in one second, FVC forced vital capacity, % pred per cent predicted, PaO₂ partial oxygen tension, K_{CO} diffusion capacity of carbon monoxide, IC/TLC inspiratory to total lung capacity ratio. ^aSubjects consider to analysis in each group (n = 17). ^bBelow the median of telomere length rate of change. ^cUpper the median telomere length rate of change

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 19/04/2021 12:16:31

Aída Elizabeth Córdoba Lanús
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 15:06:49

Ciro Casanova Macario
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 17:06:05

María de las Maravillas Aguilar Aguilar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

10/05/2021 10:12:30

findings. This is important when attempting to relate statistical associations to practical the clinical application of those findings.

Because the value of a biomarker resides primarily in its capacity to reflect association to prognosis or to change in disease progression, we followed patients and controls over 3 years. We observed no correlation between the rate of shortening of telomeres and the change in lung function, or for that matter with any other clinical variable, rendering those findings difficult to interpret or to apply clinically. Perhaps, a longer period of observation or a larger sample may be necessary to evaluate these clinical and physiological variables or other patient related outcomes such as exacerbations, cardiovascular events and all-cause mortality. On the other hand, these findings suggest that the rate of telomere shortening may not be a viable surrogate marker of disease progression of major clinical utility.

This study has several limitations. Telomere length was measured on circulating leukocytes and therefore our findings may not reflect the process occurring in the whole lung. Interestingly, telomere length in blood correlates well with telomere length in lung tissue of COPD [31] and rates of telomere shortening are similar in different tissues [32]. We used qPCR relative telomere length measures rather than absolute ones which may result in a loss of precision, however qPCR results were reported to be strongly correlated those obtained with southern blot technique [22]. Leukocyte telomere length is also considered a marker of oxidative stress and inflammation, and both contribute to COPD development. Telomere length is determined by environmental as well as genetic factors. There is a large inter-individual variability in telomere length in humans of the same age that makes difficult any cross-sectional comparisons. Our control smokers presented a shorter tobacco exposure history than the cohort of patients with COPD. However, analysis between current vs. former smokers in both cohorts did not show significant differences. Another limitation is that the sample size or duration of observation (3 years) may not have been large or long enough to find significant associations between telomere shortening and lung function parameters. In this context, we cannot discard that our findings may be affected by regression towards the mean. Further studies with a larger follow-up period with many time points of measurements are needed to validate these findings. However, for implementation of precision medicine, biomarkers need to have clinical applicability in small numbers, if not in individuals. Lastly, we did not investigate other markers of aging; however, other authors who have done so, and have found telomere length to be the most relevant of all [26].

Conclusions

In summary, in this longitudinal observational study we found that compared with smoker controls, an accelerated telomere shortening occurs in patients with COPD, even if they had shorter telomeres at baseline. Interestingly, the speed of shortening relates inversely to baseline telomere length. However, the telomere length and its rate of shortening did not relate to clinical and lung function parameters and their change over time, making telomere length change an unlikely useful biomarker of COPD progression.

Additional files

Additional file 1: Baseline characteristics of COPD patients with and without three-year follow-up included in the study. (DOCX 14 kb)
 Additional file 2: Baseline characteristics of smokers without COPD with and without three-year follow-up included in the study. (DOCX 75 kb)
 Additional file 3: Correlations between the rate of change in telomere length and the change in pulmonary function variables in patients with COPD after three years of follow-up. (DOCX 68 kb)

Abbreviations

6MWD: 6-min walk distance; BMI: Body mass index; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁: Forced expiratory volume in one second; FVC: Forced vital capacity; GLIM: General linear modelling for repeated measures test; GOLD: Global initiative for chronic obstructive lung disease; IC/TLC: Inspiratory to total lung capacity ratio; K_{CO}: Diffusion capacity of carbon monoxide; N.S.: Non-significant; PaO₂: Partial oxygen tension; pPCR: Quantitative real time polymerase chain reaction; SD: Standard deviation; T/S: Relative telomere length ratio; T/S₀: Relative telomere length ratio at baseline; T/S₃: Relative telomere length ratio at the third year of follow-up

Acknowledgments

We will like to thank Angela Montejo-de-Garcini, Hilaria González Acosta and Delia Mayato for their excellent technical assistance. We are also thankful to Antonio Gonzalez Biorganic Institute (Tenerife, Spain) for their kindly donation of the MCF-7 cells line.

Funding

The study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI 12/00355); European Regional Development Funds, ERDF, and Spanish Respiratory Society, SEPAR (PI 13/007).

Availability of data and materials

Any requests for data and material should be directed to the corresponding author.

Authors' contributions

E.C.L. and C.C. participated in conception and design; analysis and interpretation and drafting the manuscript for important intellectual content. S.C.R., A.E.J. and A.A.J. participated in analysis and interpretation. B.C. participated in the interpretation of the results and helped draft the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval was obtained from Hospital Universitario La Candelaria, Tenerife and the Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain. Written informed consent was obtained from all participants.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Research Unit, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Ctra. del Rosario 145, 38010 Santa Cruz de Tenerife, Spain. ²Pulmonary Division, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain. ³Pulmonary Division, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain. ⁴Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), UNAV, Pamplona, Spain. ⁵Pulmonary and Critical Care Department, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

Received: 3 February 2017 Accepted: 7 April 2017
 Published online: 13 April 2017

References

- Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:347–65.
- Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Resp J*. 2009;33:1165–85.
- Divo M, Cote C, de Torres JP, et al. Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:155–61.
- Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest*. 2009;135:173–80.
- Maciewicz RA, Warburton D, Rennard SI. Can increased understanding of the role of lung development and aging drive new advances in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6:614–7.
- Mather KA, Jorm AF, Parslow RA, et al. Is telomere length a biomarker of aging? A review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66(2):202–13.
- Armanios M. Telomeres and age-related disease: how telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest*. 2013;123:996–1002.
- Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, et al. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med*. 2008;44:235–46.
- Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:566–71.
- Mui TS, Man JM, McElhaney JE, et al. Telomere length and chronic obstructive pulmonary disease: evidence of accelerated aging. *J Am Geriatr Soc*. 2009;57:2372–4.
- Houben JM, Mercken EM, Ketelslegers HB, et al. Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2009;103:230–6.
- Lee J, Sandford AJ, Connett JE, et al. The relationship between telomere length and mortality in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *PLoS One*. 2012;7, e35567.
- Farzaneh-Far R, Lin J, Epel E, et al. Telomere length trajectory and its determinants in persons with coronary artery disease: longitudinal findings from the heart and soul study. *PLoS One*. 2010;5, e8612.
- Celli BR, Cote C, Marin JM, Casanova C, et al. The body mass index, airflow obstruction, dyspnea, exercise performance (BODE) index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:1005–12.
- American Thoracic Society Statement. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:1202–18.
- Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, et al. Standardization of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J*. 2005;26:720–35.
- Statement ATS. Guidelines for the six-minute walk test. *Am J Resp Crit Care Med*. 2002;166:111–7.
- Quanjer PH. Standardized lung function testing. Report of the working party for the European community for steel and coal. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1983;5:22e7.
- Mahler D, Wells C. Evaluation of clinical methods for rating dyspnea. *Chest*. 1988;93:580e6.
- Charlson M, Szatrowski T, Peterson J, et al. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol*. 1994;47:1245e51.
- Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30, e47.
- Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009;37, e21.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29, e45.
- Morlá M, Busquets X, Pons J, et al. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J*. 2006;27:525–8.
- Rode L, Bojesen SE, Weischer M, et al. Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46,396 individuals. *Thorax*. 2013;68:429–35.
- Rutten EP, Gopal P, Wouters EF, Franssen FM, Hageman GJ, Vanfleteren LE, Spruit MA, Reynaert NL. Various mechanistic pathways representing the aging process are altered in COPD. *Chest*. 2016;149:53–61.
- Gardner JP, Li S, Srinivasan S, et al. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation*. 2005;111:2171–7.
- Masi S, D'Alto F, Martin-Ruiz C, et al. Rate of telomere shortening and cardiovascular damage: a longitudinal study in the 1946 British Birth Cohort. *Eur Heart J*. 2014;35:3296–303.
- Epel ES, Merkin SS, Cawthon R, et al. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men. *Aging (Albany NY)*. 2008;1:81–8.
- Lee MS, Yaar M, Eller MS, et al. Telomeric DNA induces p53-dependent reactive oxygen species and protects against oxidative damage. *J Dermatol Sci*. 2009;56:154–62.
- Saferali A, Lee J, Sin DD, et al. Longer telomere length in COPD patients with α 1-antitrypsin deficiency independent of lung function. *PLoS One*. 2014;9, e95600.
- Daniaili L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, Desai K, Granick M, Aviv A. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun*. 2013;4:1597.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ANEXO II

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Anexo II

9.1.- Artículo 2

“Telómeros más cortos en pacientes no fumadores con limitación de la vía aérea”

Autores: Córdoba-Lanús E^{a,e}, Cabrera-López C^b, Cazorla-Rivero S^{a,e}, Rodríguez-Pérez MC^a, Aguirre-Jaime A^a, Celli B^c, Casanova C^{a,d,e}.

Información de los autores:

^aUnidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España

^bDepartamento de Neumología, Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Gran Canaria, España

^cPulmonary and Critical Care Department, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA

^dDepartamento de Neumología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España.

^eUniversidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España.

DOI: 10.1016/j.rmed.2018.04.002

Revista: Respiratory Medicine

Fecha publicación: mayo de 2018

Factor de Impacto (IF): 3,237

Cuartil: Q2

114

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Anexo II

9.2.- Resumen

Antecedentes: estudios transversales y longitudinales describen telómeros más cortos en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en comparación con controles no fumadores apareados por edad, pero la relación es confusa debido al consumo de tabaco. Proponemos que la longitud de los telómeros podría ser similar entre los no fumadores con limitación del flujo de aire y los fumadores con EPOC, pero menor que en individuos sanos.

Métodos: la longitud de los telómeros (T/S) se midió por qPCR en leucocitos sanguíneos de 80 pacientes no fumadores y 80 fumadores con limitación del flujo de aire de la misma edad. Cuarenta individuos sanos no fumadores sirvieron como controles. Antropometría, función pulmonar, comorbilidades actuales y anteriores se registraron en todos los individuos.

Se exploró la relación entre la longitud de los telómeros y las variables clínicas y de función pulmonar en los tres grupos.

Resultados: la longitud de los telómeros fue similar en los no fumadores y en los fumadores con limitación del flujo de aire ($T/S = 0,61 \pm 0,19$ vs. $0,60 \pm 0,23$, $p > 0,05$, respectivamente). Esta medida fue significativamente más corta en ambos grupos en comparación con los controles sanos ($T/S 0,79 \pm 0,40$; $p = 0,01$) independientemente de la edad y el sexo. No se encontró asociación significativa entre la longitud de los telómeros y los parámetros clínicos o de función pulmonar.

Conclusiones: el acortamiento de los telómeros se asocia con una limitación del flujo de aire independiente del tabaquismo. El envejecimiento prematuro o poseer telómeros más cortos determinados biológicamente podrían ser responsables de este hallazgo, aunque aún por determinar.

115

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/rmed



Shorter telomeres in non-smoking patients with airflow limitation



Elizabeth Córdoba-Lanús^{a,e,*}, Carlos Cabrera-López^b, Sara Cazorla-Rivero^{a,e},
M. Cristo Rodríguez-Pérez^a, Armando Aguirre-Jaime^a, Bartolomé Celli^c, Ciro Casanova^{a,d,e}

^a Research Unit, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^b Pulmonary Division, Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Gran Canaria, Spain

^c Pulmonary and Critical Care Department, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA

^d Pulmonary Division, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

^e Universidad de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

COPD
Telomeres
Ageing
Asthma
Non-tobacco smoking

ABSTRACT

Background: Cross-sectional and longitudinal studies describe shorter telomeres in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) compared to matched non-COPD controls, but the relationship is confounded by tobacco consumption. We hypothesized that telomere shortening would be similar between non-smoking and smoking individuals with airflow limitation and shorter than non-obstructed controls.

Methods: Telomere length (T/S) was measured by qPCR in blood leukocytes of 80 non-smoking patients and 80 age-matched smokers with airflow limitation. Forty non-smoker healthy individuals served as controls. Anthropometrics, lung function, previous and current comorbidities were recorded in all individuals. Relationship between telomere length and clinical and functional variables were explored in the three groups.

Results: Telomeres length was similar in non-smokers and smoker individuals with airflow limitation (T/S = 0.61 ± 0.19 vs. 0.60 ± 0.23, p > 0.05) respectively. Telomere length was significantly shorter in both groups compared to healthy controls (T/S 0.79 ± 0.40; p = 0.01) independent from age and sex. No significant association was found between the telomere length and clinical or lung function parameters.

Conclusions: Telomere shortening is associated with airflow limitation independent of smoking status. Weather premature ageing or biologically determined shorter telomeres are responsible for this finding remain to be determined.

1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a major cause of morbidity and mortality throughout the world, is thought to result from the interaction of environmental agents such as tobacco smoking or exposure to biomass fuel and inherited genetic factors [1]. COPD is characterized by the presence of airflow limitation that frequently co-exists with other age-related co-morbidities such as osteoporosis, cardiovascular disease, lung cancer, depression and diabetes [2,3].

Tobacco smoking has been considered the most important risk factor for developing COPD. However, close to 20% of patients with poorly reversible airflow limitation, similar to COPD have never smoked. Other factors such as chronic asthma, outdoor air pollution, biomass and coal smoke, environmental smoke exposure (ETS), occupational exposure, diet, tuberculosis sequelae, repeated lower

respiratory-tract in early childhood, intrauterine growth retardation, poor nourishment, and poor socioeconomic status, have been reported to be related to airflow obstruction similar to COPD in non-smokers [1,4,5].

Furthermore, it has been suggested that COPD is a disease related to accelerated ageing [6–8]. Telomere length is a biomarker of biological age [9–11], and its length has been related to mortality and poor outcomes in COPD patients [12]. Telomeres consist of stretches of repetitive hexanucleotides (5'-TTAGGG-3') that get progressively shorter as cells divide, as a consequence of the known end-replication process. When telomeres reach a critical length, their ability to protect the DNA decreases, resulting in cell cycle arrest and eventually leading to cellular senescence or cell death by apoptosis [11,13].

Shorter telomeres have been described in circulating leukocytes of patients with COPD when compared to smokers without COPD [14–16].

Abbreviations: COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease; T/S, Relative Telomere length ratio; qPCR, Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction; FEV₁, Forced Expiratory Volume in one second; FVC, Forced Vital Capacity; BMI, Body Mass Index; GOLD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; PaO₂, Partial Oxygen Tension; K_{CO}, Diffusion Capacity of Carbon Monoxide; IC/TLC, Inspiratory to Total Lung Capacity Ratio; 6MWD, 6-min walk distance; SD, Standard deviation

* Corresponding author. Research Unit, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Ctra. del Rosario 145, 38010, Santa Cruz de Tenerife, Spain.

E-mail address: elizabeth-cordoba@hotmail.com (E. Córdoba-Lanús).

<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.04.002>

Received 5 January 2018; Received in revised form 19 March 2018; Accepted 1 April 2018

Available online 20 April 2018

0954-6811/2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 19/04/2021 12:16:31

Aída Elizabeth Córdoba Lanús
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 15:06:49

Ciro Casanova Macario
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 17:06:05

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

10/05/2021 10:12:30

However, no studies regarding telomere shortening in non-smoking patients with airflow limitation similar to COPD have been conducted before.

We hypothesized that telomere shortening is a feature of individuals with airflow limitation independent of smoking. To test this hypothesis, we explored the interaction between telomere attrition and clinical and lung function parameters, as well as outcomes in a very well characterized cohort of non-tobacco smoking individuals with airflow limitation similar to COPD. Smoking individuals with COPD and non-smoking individuals without airflow limitation served as controls.

2. Methods

2.1. Study individuals

Patients: 370 individuals suspected of COPD were included in this study which were patients of the two main hospitals in the Canary Islands: the Hospital Universitario de Gran Canaria, Doctor Negrín and Hospital Universitario N/S de Candelaria, Tenerife, Spain. From these individuals, 80 were non-tobacco users with post-bronchodilator airflow limitation that were age-matched with a control group of 80 tobacco-smokers with COPD (smoking history of > 15 pack-year) (Fig. 1). Inclusion criteria: age > 40 years, and post-bronchodilator FEV₁/FVC ratio < 0.70 measured 20 min after administration of 400 mg of albuterol. All patients were clinically stable (no exacerbation for at least 6 weeks) at the time of evaluation. Spirometry lung volumes, pulmonary function test, and exercise capacity were measured according to ATS-ERS guidelines [17–19] and severity was graded by the Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) [20]. Dyspnoea was evaluated by mMRC scale [21] and the BODE Index was calculated as previously described [22]. Co-morbidities were quantified using the Charlson index [23]. Exclusion criteria included uncontrolled co-morbidities such as malignancy at baseline. Asthma was defined by physician diagnosis. Controls: based on the availability of healthy controls with blood sample and > 44 years old from general population (CDC project) [24], only forty non-smoker healthy individuals were included in a second analysis to contrast them with age-matched patients within the two airflow obstruction groups (Fig. 1). All participants were informed of study purposes and provided written informed consent. The study was approved by the ethical committee board at both hospitals.

2.2. Telomere length measurement

DNA from venous blood was obtained at baseline from leucocytes

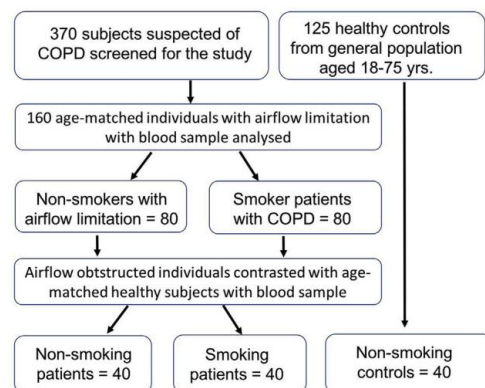


Fig. 1. Consort diagram representing the assessment of patients and healthy control individuals considered to analysis in the present study.

using the QIAamp DNA Mini Kit (GE Healthcare). Telomere length was measured using a qPCR based protocol as already published [16,25,26]. The primer sequences and cycling conditions for the measurement of telomere length were the same used by others [26] and albumin was used as a reference gene. qPCR reactions were performed in 20 µL reactions for each individual: 10 µL SYBRGreen PCR Master Mix (BioRad), 0.9 µM of telomere primers and 0.6 µM of albumin primers. All the reactions were performed on triplicates on the iQ Cycler Real-Time PCR Instrument (BioRad).

Telomere length was calculated as a ratio of telomere (T) to albumin (S) as previously described [26]. The telomere length standardized to the reference single copy gene (T/S) was calculated using the “ $\Delta\Delta C_p$ with efficiency correction” calculation method [27].

2.3. Statistical analysis

For the cross-sectional analysis, non-tobacco smoking patients with airflow limitation were categorized in three groups by telomere length ratio (T/S) tertiles: shorter, medium or longer telomeres.

A t-Student, ANOVA, Chi², Fisher Exact, Kruskal-Wallis test were used to test differences in means and proportions of clinical and lung function characteristics between non-smokers and smoker patients with COPD. The association between baseline telomere length (T/S) with clinical and/or pulmonary function variables was explored using Pearson’s correlation coefficients. A multiple logistic regression was performed to test the association of telomere length with COPD adjusting for age, sex and pack years. SPSS 21.0 IBM Co software was used for all statistical analyses and two-tailed p-values < 0.05 were considered significant.

3. Results

Table 1 shows the clinical and lung function data of the patients

Table 1
 Baseline characteristics of non-smoking patients with airflow obstruction versus smokers with COPD included in the study.

Variable	Non-smokers with airflow obstruction (N = 80)	Smokers with COPD (N = 80)	p-value
Sex (male %)	45	57	0.261
Age (years) ^a	64 ± 9	64 ± 9	1.000
BMI (Kg/m ²) ^a	29 ± 5	28 ± 6	0.089
Smoking habit (pack-yrs) ^{a,c}	0	63 ± 30	-
Active smoking (%)	0	55	-
T/S ratio ^a	0.61 ± 0.19	0.60 ± 0.23	0.768
FEV ₁ (L) ^a	1.69 ± 0.78	1.46 ± 0.62	0.045
FEV ₁ (% pred) ^a	66 ± 19	60 ± 23	0.064
FVC (% pred) ^a	93 ± 21	90 ± 25	0.337
FEV ₁ /FVC (% ^a)	58 ± 8	53 ± 12	0.004
IC/TLC (%)	39 ± 10	34 ± 9	0.009
6MWD (m) ^a	518 ± 108	470 ± 85	0.004
mMRC dyspnoea ^b	1 (0–2)	1 (0–2)	0.275
Exacerbations ^b	1 (0–2)	0 (0–1)	0.381
Charlson index ^b	0 (0–1)	0 (0–1)	0.150
Inhaled b ₂ -agonist (%)	73	80	0.354
Inhaled anticholinergic (%)	83	45	0.001
Inhaled corticosteroid (%)	54	79	0.003

BMI: body mass index; T/S ratio: relative telomere length; FEV₁: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; % pred: percent predicted; IC/TLC: inspiratory to total lung capacity ratio; 6MWD: six-min walk distance test.

^a Data are presented as mean ± SD.

^b Data are presented as median (25th–75thpc).

^c Number of packs of cigarettes smoked per day x number of years smoking.

analysed in the first stage: 80 non-tobacco smoking patients with airflow limitation and 80 smokers with COPD. The range of airflow obstruction distributed by GOLD stages in smoker COPD patients was as follows: 1 (21%), 2 (48%), 3 (20%) and 4 (11%). Smoking patients with COPD presented a slightly worse lung function measured by FEV₁ and the FEV₁/FVC than non-smokers with airflow obstruction. Smoking COPD patients presented a median BODE index of 1, while 33% of them scored a BODE index ≥ 2 . The two groups were similar in sex, BMI and Charlson co-morbidity score. More than 50% of the patients in the tobacco-smoking group with COPD were current smokers. Seventy-five percent of non-smoking patients with poorly responsive airflow limitation were diagnosed as having persistent asthma, 15% had bronchiectasis and 10% had a diagnosis of treated tuberculosis.

Telomere length measured by the T/S ratio inversely correlated with age ($r = -0.202$; $p = 0.05$). All subsequent analyses were adjusted by age.

Telomere length in non-smoker patients with airflow limitation was similar to age-matched tobacco smokers with COPD ($T/S = 0.61 \pm 0.19$ vs. 0.60 ± 0.23) (Table 1).

In further analysis, it was found that non-smoking patients with airflow limitation had shorter telomere length compared to age-matched (57 ± 7 yrs) non-smoking healthy controls, independent of age and sex (0.63 ± 0.20 vs. 0.79 ± 0.40 ; 95% CI: 0.03–0.79; $p = 0.01$), (Fig. 2). There were no significant differences in telomere length between females and males (0.60 ± 0.16 vs. 0.63 ± 0.22 , $p = 0.44$) within the non-tobacco smoking individuals with airflow limitation or in the healthy controls group (0.86 ± 0.48 vs. 0.71 ± 0.27 , $p = 0.21$; for females and males, respectively) (Supplementary table 1).

Telomere length grouped by tertiles (shorter, medium and longer) showed no association with any clinical and lung function variables. No significant differences was detected between patients with less and more severe airflow obstruction, history of exacerbations, asthma, bronchiectasis and tuberculosis (Table 2) (Supplementary table 2).

Asthmatic patients within the non-smokers group with airflow limitation were similar in telomere length than the rest of non-smokers. (Table 3).

Table 2
 Clinical and pulmonary function characteristics of non-smoker patients with airflow obstruction defined by shorter, medium or longer T/S ratio.

Variable	Shorter T/S (n = 27)	Medium T/S (n = 27)	Longer T/S (n = 26)	p-value
T/S ratio ^a	0.42 \pm 0.07	0.60 \pm 0.06	0.83 \pm 0.10	< 0.001
Sex (male %)	44	30	58	0.120
Age (years) ^a	65 \pm 9	67 \pm 9	60 \pm 10	0.028
BMI (Kg/m ²) ^a	29 \pm 5	29 \pm 6	30 \pm 4	0.658
BMI > 30 (Kg/m ² %)	41	37	38	0.961
FEV ₁ (L) ^a	1.59 \pm 0.67	1.60 \pm 0.68	1.90 \pm 0.94	0.272
FEV ₁ (% pred) ^a	65 \pm 20	69 \pm 16	65 \pm 19	0.683
FVC (% pred) ^a	89 \pm 26	97 \pm 18	94 \pm 19	0.400
FEV ₁ /FVC (%) ^a	59 \pm 7	58 \pm 8	56 \pm 10	0.509
IC/TLC (%) ^a	37 \pm 10	37 \pm 10	42 \pm 10	0.172
6MWD (m) ^a	510 \pm 121	512 \pm 94	542 \pm 113	0.555
mMRC dyspnoea ^b	1 (0-2)	1 (0-1)	1 (0-2)	0.735
Tuberculosis (%)	11	11	8	0.913
Asthma (%)	78	70	77	0.693
Bronchiectasis (%)	26	15	16	0.523
Exacerbations ^b	0 (0-1)	0 (0-2)	1 (0-2)	0.767
Charlson index ^b	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0.385

T/S ratio: relative telomere length ratio; BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; % pred: per cent predicted; IC/TLC: inspiratory to total lung capacity ratio; 6MWD: six-min walk distance test.

Groups defined by telomere length: ≤ 0.494 , 0.495–0.717 and > 0.718 .

^a Data are presented as mean \pm SD.

^b Data are presented as median (25th–75thpc).

4. Discussion

This study shows for the first time and to the best of our knowledge that telomere length shortening is similar between non-smoker and smoker individuals with airflow limitation. Both groups presented shorter telomere length than non-smoking healthy controls. Moreover, these findings were independent of age and sex.

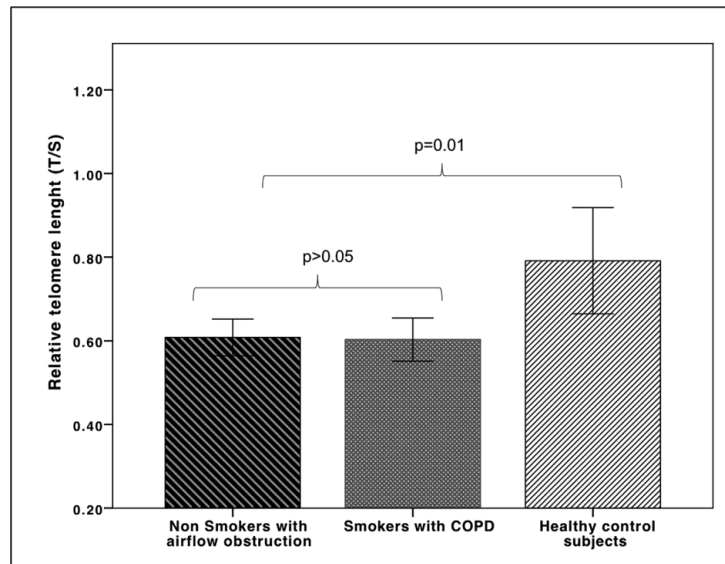


Fig. 2. Telomere length (T/S) in non-smoking patients with airflow obstruction, compared to smokers with COPD and Healthy controls.

Table 3
 Baseline characteristics of non-smoking patients with airflow obstruction included in the study.

Variable	Asthmatic (n = 60)	Other (n = 20)	p-value
Sex (male %)	58	50	0.606
Age (years) ^a	64 ± 9	65 ± 9	0.587
BMI (Kg/m ²) ^a	29 ± 5	29 ± 6	0.876
T/S ratio ^a	0.61 ± 0.19	0.61 ± 0.18	0.927
FEV ₁ (L) ^a	1.69 ± 0.70	1.70 ± 0.99	0.943
FEV ₁ (% pred) ^a	67 ± 16	64 ± 26	0.645
FVC (% pred) ^a	95 ± 19	87 ± 28	0.230
FEV ₁ /FVC (% ^a)	57 ± 8	58 ± 10	0.633
IC/TLC (% ^a)	39 ± 9	37 ± 12	0.367
DL _{CO} (% ^a)	87 ± 19	71 ± 23	0.003
6MWD (m) ^a	531 ± 113	490 ± 96	0.188
mMRC dyspnoea ^b	1 (0-2)	1 (1-2)	0.492

T/S ratio: relative telomere length; BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; % pred: per cent predicted; IC/TLC: inspiratory to total lung capacity ratio; DL_{CO}: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; 6MWD: six-min walk distance test.

^a Data are presented as mean ± SD.

^b Data are presented as median (25th–75thpc).

Some cross-sectional studies have reported shorter telomeres in smoking individuals with COPD, compared to smokers without COPD and healthy individuals [11,14,15]. Recently, longitudinal data from our group demonstrated telomere shortening over time in patients with COPD in contrast to control smokers whose telomeres did not decrease to the same degree over the 3 years of the study [16].

Cigarette smoke may worsen ageing related events in the lung or may accelerate the ageing process in this organ due to the reduction in anti-ageing molecules or by stimulating pro-ageing ones [8]. Furthermore, it has been difficult to establish whether the shorter telomeres of patients with smoking related COPD is due to the disease itself or to the effect of smoking. We hypothesized that if there was a relation between poorly reversible airflow limitation similar to COPD itself and telomere shortening, this would be seen in individuals with spirometric airflow limitation and no history of smoking. In this study, we observed telomere shortening in a non-smoking cohort of patients with airflow limitation, similar to COPD that was equal in magnitude to that seen in COPD due to cigarette smoking, and shorter for both group than the telomere length of age-matched healthy individuals from a similar population.

It is interesting to note that 75% of the non-smokers with airflow limitation had a history of persistent asthma. This is in accordance to previous studies which have reported that patients with severe asthma appear to have shorter telomeres than control individuals [28,29]. In contrast, the results differ from those of a meta-analysis that included 13 studies, where a weak but negative association was observed between asthma and telomere length, particularly in the female sub-sample [30]. However, the meta-analysis failed to control for smoking or any other covariates. Patients with asthma in adulthood present a significant increase in comorbidities associated with accelerated ageing such as COPD, cardiovascular disease and cancer [31]. Guerra et al. suggested that accelerated ageing processes may increase the risk of patients with persistent asthma to develop COPD [32]. These processes may have their own origins in a genetic predisposition, early childhood events or attenuated lung development in the first stages of life. Indeed, population studies indicate that exposure to environmental pollutants may thus be one important trigger in the shift from Asthma to COPD [33].

Another important factor suggesting a relationship between exposure to pollutants and COPD relates to chronic inflammation with subsequent oxidative stress, cellular and immunosenescence and associated telomere shortening [4,34,35]. That chronic inflammation may be one responsible aetiological mechanism is supported by the history

of bronchiectasis or old treated tuberculosis in the non-smoking individuals with airflow limitation who did not report asthma in their past history. The only studies exploring this relationship, showed shorter telomeres and altered expression of markers of cell cycle inhibitors and senescence in patients with severe bronchiectasis [36] but no association between telomere length and tuberculosis [37].

Telomeres are highly susceptible to damage by oxidative stress because of their high content of guanidine residues. Oxidative DNA damage to telomeres regions can induce a persistent DNA damage response (DDR) that gives rise to a cell replicative senescence irrespective to telomere length [38]. Moreover, evidence for increased TAF (telomere DNA damage associated foci) was found in small airway epithelial cells in lung tissue from COPD patients [39]. Unfortunately measure of TAF in lung tissue sample of the analysed populations was not possible. Thus, we cannot discard possible differences between non-dependent telomere length DNA damage in our patients.

Our results showing a lack of association between telomere length and pulmonary function impairment in the non-smoking cohort of patients with airflow obstruction are in line with other studies in smokers with COPD [11,14,15]. These results differ from reports that have shown a modest correlation between telomere shortening and the FEV₁ [30,40,41]. Our previous longitudinal study on telomere attrition and COPD did not reveal any correlation between telomere length and clinical, lung function parameters or the presence of any comorbidities, or even between the rate of shortening of telomeres and the change in lung function in patients followed over 3 years [16]. There is no easy explanation for the differences amongst studies, but it would seem that if present, the association between telomere length and degree of lung function impairment is weak at best. However, it cannot be discarded that discrepancies may be due to different factors such as inter-laboratory variation, sample size, or selection and characterization of the study cohort.

This study has several limitations. Telomere length was measured on circulating leukocytes and not in lung cells. However, studies support the use of telomere length in blood leukocytes as surrogates of telomere length in different tissues [42]. Moreover, in our study a mean value for the telomeres of all chromosomes in each individual sample was measured. So, we were not able to determine the load of critically short telomeres, which were postulated as common mediators of telomere-driven senescence [43]. Further analysis addressing this issue should be considered. Our non-smoking patients with airflow limitation had milder degree of obstruction thereby limiting the relationship between the severity of airway obstruction and telomere attrition. A larger sample may be necessary to evaluate these clinical and physiological variables. However, the strength of our study is the well characterized clinical cohort of patients with airflow obstruction that included variables heretofore never evaluated such as lung hyperinflation (IC/TLC), diffusion capacity (K_{CO}), the BODE index and/or comorbidities.

In conclusion, shorter telomeres were observed in never smoker individuals with persistent airflow limitation similar to COPD compared with age-matched controls. The degree of telomere attrition was similar to that observed in tobacco-smoking patients with COPD. Our data suggest an important influence of the airway obstruction in telomere shortening and the ageing process in non-smokers with COPD.

Conflicts of interest

No authors had financial or personal conflict of interests.

Funding/support

The study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI 12/00355) with European Regional Development Funds-ERDF, and Spanish Respiratory Society-SEPAR (PI 13/007).

E. Córdoba-Lanús et al.

Respirometry: Active (S3008) L23-L23

Availability of data and material

Any requests for data and material should be directed to the corresponding author.

Authors' contributions

E.C.L., C.C.L., C.C. and B.C. participated in conception and design; analysis and interpretation and drafting the manuscript for important intellectual content. S.C.R., M.C.R. and A.A.J. participated in analysis and interpretation.

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval was obtained from Hospital Universitario La Candelaria, Tenerife and the Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín, Gran Canaria, Spain. Written informed consent was obtained from all participants.

Conflicts of interest

The authors have the following interests: C.C. has received fees for lectures and/or scientific consultancy from AstraZeneca, Boehringer-Ingelheim, Gebro Pharma, GSK, Laboratorios Esteve, Menarini, Novartis, and Rovi in the last three years. B.C. has received support and/or honoraria as a consultant from Glaxo-Smith-Kline, Boehringer Ingelheim, Astra Zeneca, Novartis, Innovia, Chiesi, Menarini and Pulmonx and grants from Astra Zeneca unrelated to the submitted work. There are no patents, products in development or marketed products to declare. Never received fund from tobacco companies.

Acknowledgments

We will like to thank Angela Montejo and Delia Mayato for their excellent technical assistance. We are grateful to Dr. Jacob Lorenzo-Morales for his help revising the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2018.04.002>.

References

- [1] J. Vestbo, S.S. Hurd, A.G. Agustí, P.W. Jones, C. Vogelmeier, A. Anzueto, P.J. Barnes, L.M. Fabbri, F.J. Martinez, M. Nishimura, R.A. Stockley, D.D. Sin, R. Rodriguez-Roisin, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187 (2013) 347–365.
- [2] P.J. Barnes, B.R. Celli, Systemic manifestations and comorbidities of COPD, *Eur. Respir. J.* 33 (2009) 1165–1185.
- [3] M. Divo, C. Cote, J.P. de Torres, C. Casanova, J.M. Marin, V. Pinto-Plata, J. Zulueta, C. Cabrera, J. Zagaceta, G. Humminghake, B. Celli/BODE Collaborative Group, Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186 (2012) 155–161.
- [4] G. Zeng, B. Sun, N. Zhong, Non-smoking-related chronic obstructive pulmonary disease: a neglected entity? *Respirology* 17 (2012) 908–912.
- [5] S.S. Salvi, P.J. Barnes, Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers, *Lancet* 374 (2009) 733–743.
- [6] K. Ito, P.J. Barnes, COPD as a disease of accelerated lung aging, *Chest* 135 (2009) 173–180.
- [7] R.A. Maciewicz, D. Warburton, S.I. Rennard, Can increased understanding of the role of lung development and aging drive new advances in chronic obstructive pulmonary disease? *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6 (2009) 614–617.
- [8] W. MacNee, Is chronic obstructive pulmonary disease an accelerated aging disease? *Ann. Am. Thorac. Soc.* 13 (2016) S429–S437.
- [9] K.A. Mather, A.F. Jorm, R.A. Parslow, H. Christensen, Is telomere length a biomarker of aging? A review, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 66 (2011) 202–213.
- [10] M. Armanios, Telomeres and age related disease: how telomere biology informs clinical paradigms, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 996–1002.
- [11] J.M. Houben, H.J. Moonen, F.J. van Schooten, G.J. Hageman, Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 235–246.
- [12] J. Lee, A.J. Sandford, J.E. Connett, J. Yan, T. Mui, Y. Li, D. Daley, N.R. Anthonisen, A. Brooks-Wilson, S.F. Man, D.D. Sin, The relationship between telomere length and mortality in chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *PLoS One* 7 (2012) e35567.
- [13] G. Aubert, P.M. Lansdorp, Telomeres and aging, *Physiol. Rev.* 88 (2) (2008) 557–579.
- [14] L. Savale, A. Chaouat, S. Bastuji-Garin, E. Marcos, L. Boyer, B. Maitre, M. Sarni, B. Housset, E. Weitzenblum, M. Matrat, P. Le Corvoisier, D. Rideau, J. Boczkowski, J.L. Dubois-Randé, C. Chouaid, S. Adnot, Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 (2009) 566–571.
- [15] T.S. Mui, J.M. Man, J.E. McElhane, A.J. Sandford, H.O. Coxson, C.L. Birmingham, Y. Li, S.F. Man, D.D. Sin, Telomere length and chronic obstructive pulmonary disease: evidence of accelerated aging, *J. Am. Geriatr. Soc.* 57 (2009) 2372–2374.
- [16] E. Córdoba-Lanús, S. Cazorla-Rivero, A. Espinoza-Jiménez, J.P. de-Torres, M.J. Pajares, A. Aguirre-Jaime, B. Celli, C. Casanova, Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort, *Respir. Res.* 18 (2017) 113.
- [17] American Thoracic Society Statement, Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies, *Am. Rev. Respir. Dis.* 144 (1991) 1202–1218.
- [18] N. Macintyre, R.O. Crapo, G. Viegi, D.C. Johnson, C.P. van der Grinten, V. Brusasco, F. Burgos, R. Casaburi, A. Coates, P. Enright, P. Gustafsson, J. Hankinson, R. Jensen, R. McKay, M.R. Miller, D. Navajas, O.F. Pedersen, R. Pellegrino, J. Wanger, Standardization of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung, *Eur. Respir. J.* 26 (2005) 720–735.
- [19] ATS Statement, Guidelines for the six-minute walk test, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) 111–117.
- [20] K.F. Rabe, S. Hurd, A. Anzueto, P.J. Barnes, A.S. Buist, P. Calverley, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. van Wel, J. Zielinski, Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, NHLBI/WHO Global Initiative for chronic obstructive pulmonary disease (GOLD), Workshop summary, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176 (2007) 532–555 Update 2009.
- [21] D. Mahler, C. Wells, Evaluation of clinical methods for rating dyspnea, *Chest* 93 (1988) 580e6.
- [22] B.R. Celli, C. Cote, J.M. Marin, C. Casanova, M. Montes de Oca, R.A. Mendez, V. Pinto Plata, H.J. Cabral, The body mass index, airflow obstruction, dyspnea, exercise performance (BODE) index in chronic obstructive pulmonary disease, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 1005–1012.
- [23] M. Charlson, T. Szatrowski, J. Peterson, J. Gold, Validation of a combined comorbidity index, *J. Clin. Epidemiol.* 47 (1994) 1245e51.
- [24] A. Cabrera-de-León, M.C. Rodríguez-Pérez, D. Almeida-González, S. Domínguez-Coello, A. Aguirre-Jaime, B. Brito-Díaz, A. González-Hernández, L.I. Pérez-Méndezgrupo CDC, Presentation of the “CDC de Canarias” cohort: objectives, design and preliminary results, *Rev. Esp. Salud Pública* 82 (2008) 519–534.
- [25] R.M. Cawthon, Telomere measurement by quantitative PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e47.
- [26] R.M. Cawthon, Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) e21.
- [27] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [28] S. Kyoh, N. Venkatesan, A.H. Poon, M. Nishioka, T.Y. Lin, C.J. Baglole, D.H. Eidelman, Q. Hamid, Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 132 (2013) 480–482.
- [29] D.W. Belsky, I. Shalev, M.R. Sears, R.J. Hancox, H. Lee Harrington, R. Houts, T.E. Moffitt, K. Sugden, B. Williams, R. Poulton, A. Caspi, Is chronic asthma associated with shorter leukocyte telomere length at midlife? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (2014) 384–391.
- [30] E. Albrecht, E. Sillanpää, S. Karrasch, A.C. Alves, V. Codd, I. Hovatta, J.L. Buxton, C.P. Nelson, L. Broer, S. Hägg, M. Mangino, G. Willemsen, I. Surakka, M.A. Ferreira, N. Amin, B.A. Oostra, H.M. Bäckmand, M. Peltonen, S. Sarna, T. Rantanen, S. Sipilä, T. Korhonen, P.A. Madden, C. Gieger, R.A. Jörres, J. Heinrich, J. Behr, R.M. Huber, A. Peters, K. Strauch, H.E. Wichmann, M. Waldenberger, A.I. Blakemore, E.J. de Geus, D.R. Nyholt, A.K. Henders, P.L. Piirila, A. Rissanen, P.K. Magnusson, A. Viñuela, K.H. Pietiläinen, N.G. Martin, N.L. Pedersen, D.I. Boomsma, T.D. Spector, C.M. van Duijn, J. Kaprio, N.J. Samani, M.R. Jarvelin, H. Schulz, Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease, *Eur. Respir. J.* 43 (2014) 983–992.
- [31] O. Fuchs, T. Bahmer, K.F. Rabe, E. von Mutius, Asthma transition from childhood into adulthood, *Lancet Respir. Med* 5 (2017) 224–234.
- [32] S. Guerra, New asthma biomarkers: shorter telomeres, longer disease? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (2014) 356–358.
- [33] X.Y. Zheng, H. Ding, L.N. Jiang, S.W. Chen, J.P. Zheng, M. Qiu, Y.X. Zhou, Q. Chen, W.J. Guan, Association between air pollutants and asthma emergency room visits and hospital admissions in time series studies: a systematic review and meta-analysis, *PLoS One* 10 (2015) e0138146.
- [34] R. Faner, M. Rojas, W. MacNee, A. Agusti, Abnormal lung aging in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186 (2012) 306–313.
- [35] V. Amsellem, G. Gary-Bobo, E. Marcos, B. Maitre, V. Chara, P. Validire, J.B. Stern, H. Noureddine, E. Sapin, D. Rideau, S. Hue, P. Le Corvoisier, S. Le Gouvello, J.L. Dubois-Randé, J. Boczkowski, S. Adnot, Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (2011) 1358–1366.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 19/04/2021 12:16:31

Aída Elizabeth Córdoba Lanús
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 15:06:49

Ciro Casanova Macario
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 17:06:05

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

10/05/2021 10:12:30

E. Córdoba-Lanús et al.

Respiratory Medicine 183(2021) 123-128

- [36] J. Birch, S. Victorelli, D. Rahmatika, R.K. Anderson, K. Jiwa, E. Moisey, C. Ward, A.J. Fisher, A. De Soya, J.F. Passos, Telomere dysfunction and senescence-associated pathways in bronchiectasis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193 (2016) 929–932.
- [37] E. Auld, J. Lin, E. Chang, P. Byanyima, I. Ayakaka, E. Musisi, W. Worodria, J.L. Davis, M. Segal, E. Blackburn, L. Huang, HIV infection is associated with shortened telomere length in ugandans with suspected tuberculosis, *PLoS One* 11 (2016) e0163153.
- [38] G. Hewitt, D. Jurk, F.D. Marques, C. Correia-Melo, T. Hardy, A. Gackowska, R. Anderson, M. Taschuk, J. Mann, J.F. Passos, Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence, *Nat. Commun.* 3 (2012) 708.
- [39] J. Birch, R.K. Anderson, C. Correia-Melo, D. Jurk, G. Hewitt, F.M. Marques, N.J. Green, E. Moisey, M.A. Birrell, M.G. Belvisi, F. Black, J.J. Taylor, A.J. Fisher, A. De Soya, J.F. Passos, DNA damage response at telomeres contributes to lung aging and chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 309 (2015) L1124–L1137.
- [40] L. Rode, S.E. Bojesen, M. Weischer, J. Vestbo, B.G. Nordestgaard, Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46,396 individuals, *Thorax* 68 (2013) 429–435.
- [41] E.P. Rutten, P. Gopal, E.F. Wouters, F.M. Franssen, G.J. Hageman, L.E. Vanfleteren, M.A. Spruit, N.L. Reynaert, Various mechanistic pathways representing the aging process are altered in COPD, *Chest* 149 (2016) 53–61.
- [42] L. Daniali, A. Benetos, E. Susser, J.D. Kark, C. Labat, M. Kimura, K. Desai, M. Granick, A. Aviv, Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1597.
- [43] L. Bendix, P.B. Horn, U.B. Jensen, I. Rubelj, S. Kolvraa, The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells, *Aging Cell* 9 (2010) 383–397.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

ANEXO III

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Anexo III

10.1.- Artículo 3

“Dinámica de la longitud de los telómeros durante 10 años y resultados relacionados en pacientes con EPOC”

Autores: Córdoba-Lanús E^{1,3*‡}, Cazorla-Rivero S^{1,3*}, García-Bello MA¹, Mayato D¹, Gonzalvo-Hernández F², Ayra-Plasencia J^{1,3}, Celli B⁴, Casanova C^{1,2,3}.

Información de los autores:

¹Unidad de Investigación, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España.

²Departamento de Neumología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España.

³Universidad de La Laguna, San Cristobal de La Laguna, Tenerife, España.

⁴Pulmonary and Critical Care Department, Brigham and Women’s Hospital, Boston, MA, USA.

* Ambos contribuyen como primer autor.

DOI: 10.1186/s12931-021-01616-z

Revista: Respiratory Research

Fecha publicación: 2021

Factor de Impacto (IF): 3.829

Cuartil: Q1

123

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Anexo III

10.2.- Resumen

Antecedentes: la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se ha propuesto como una enfermedad de envejecimiento acelerado. Muchos estudios han tratado de caracterizar la relación entre la longitud de los telómeros (TL), un marcador del envejecimiento biológico y los procesos derivados con la EPOC. Se desconoce si el acortamiento acelerado de los telómeros con el tiempo se relaciona con peores resultados en pacientes con EPOC.

Métodos: la longitud relativa de los telómeros (T/S) se determinó mediante qPCR en muestras de ADN de sangre periférica en 263 pacientes al inicio del estudio y hasta 10 años después de la inscripción. Se incluyeron en el análisis los datos clínicos y de función pulmonar anuales de 134 pacientes con al menos dos medidas de T/S durante este tiempo.

Resultados: al inicio del estudio, la T/S se correlacionó inversamente con la edad ($r = -0,236$; $p < 0,001$), pero no hubo relación entre la T/S y las variables clínicas y de función pulmonar ($p > 0,05$). Durante 10 años de observación, hubo un acortamiento medio de la TL de 183 pb / año para los pacientes con EPOC. Después de ajustar por edad, sexo, tabaquismo activo y la media de T/S, los pacientes que acortaron más sus telómeros con el tiempo, tuvieron peor intercambio gaseoso, más hiperinsuflación y peor afección pulmonar y extrapulmonar durante el seguimiento, (PaO₂ $p < 0,0001$; KCO $p = 0,042$; IC / TLC $p < 0,0001$; 6MWD $p = 0,004$ e índice BODE $p = 0,009$). Los pacientes en el tercil más bajo de T/S durante el período de seguimiento tuvieron un mayor riesgo de muerte [HR = 5,48, (1,23–24,42) $p = 0,026$].

Conclusiones: este estudio prospectivo muestra una asociación entre el acortamiento acelerado de los telómeros y el empeoramiento progresivo del intercambio gaseoso pulmonar, la hiperinsuflación pulmonar y la afección extrapulmonar en pacientes con

124

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Anexo III

EPOC. Además, los telómeros persistentemente más cortos durante este tiempo de observación aumentan el riesgo de mortalidad por todas las causas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

RESEARCH

Open Access

Telomere length dynamics over 10-years and related outcomes in patients with COPD



E. Córdoba-Lanús^{1,3,4†}, S. Cazorla-Rivero^{1,3†}, M. A. García-Bello¹, D. Mayato¹, F. Gonzalvo², J. Ayra-Plasencia^{1,3}, B. Celli⁵ and C. Casanova^{1,2,3}

Abstract

Background: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has been proposed as a disease of accelerated aging. Several cross-sectional studies have related a shorter telomere length (TL), a marker of biological aging, with COPD outcomes. Whether accelerated telomere shortening over time relates to worse outcomes in COPD patients, is not known.

Methods: Relative telomere length (T/S) was determined by qPCR in DNA samples from peripheral blood in 263 patients at baseline and up to 10 years post enrolment. Yearly clinical and lung function data of 134 patients with at least two-time measures of T/S over this time were included in the analysis.

Results: At baseline, T/S inversely correlated with age ($r = -0.236$; $p < 0.001$), but there was no relationship between T/S and clinical and lung function variables ($p > 0.05$). Over 10 years of observation, there was a median shortening of TL of 183 bp/year for COPD patients. After adjusting for age, gender, active smoking and mean T/S, patients that shortened their telomeres the most over time, had worse gas exchange, more lung hyperinflation and extrapulmonary affection during the follow-up, (PaO_2 $p < 0.0001$; K_{CO} $p = 0.042$; IC/TLC $p < 0.0001$; 6MWD $p = 0.004$ and BODE index $p = 0.009$). Patients in the lowest tertile of T/S through the follow-up period had an increased risk of death [HR = 5.48, (1.23-24.42) $p = 0.026$].

Conclusions: This prospective study shows an association between accelerated telomere shortening and progressive worsening of pulmonary gas exchange, lung hyperinflation and extrapulmonary affection in COPD patients. Moreover, persistently shorter telomeres over this observation time increase the risk for all-cause mortality.

Keywords: Aging, COPD, Lung-function, Mortality, Telomeres

Background

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide, is a disease characterized by a persistent reduction of air-flow that frequently progresses over time [1, 2]. In addition, patients with COPD develop 10 or 20 years earlier,

comorbid diseases characteristically seen in elderly subjects without COPD [3, 4].

COPD has been described as a disease of accelerated aging and shorter telomere length as a surrogate marker of biological aging [5, 6]. In humans, telomeres consist of a repeating sequence of TTAGGG hexanucleotide located at the ends of chromosomes and have an important role in maintaining chromosome integrity and cell proliferation [7]. Telomeres shorten 30–100 base pairs during each cell division due to the end-replication problem of the DNA polymerase [8, 9]. Telomere shortening and telomere dysfunction may heavily influence the aging human lung [10]. It has been shown that patients with

*Correspondence: elizabeth-cordoba@hotmail.com

†E. Córdoba-Lanús and S. Cazorla-Rivero contributed as first authors

¹ Research Unit, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

COPD exhibit shorter leucocyte telomeres when compared with smokers without COPD and healthy subjects [11–13]. Importantly, we have also shown that COPD patients experience accelerated telomere shortening over time when compared to smoking controls [13].

Shortening of telomere length may be a risk factor for all-cause or cause-specific mortality [14, 15]. The same appears to be true for patients with COPD, as shorter telomere length has been associated with worse lung function [16, 17], exacerbations and risk of death [18, 19]. However, these studies suggesting an association between telomere length and respiratory health were cross sectional in design. There is one recent study in the general population relating telomere length with longitudinal assessment of clinical data, but the study had only one measure of telomere length at baseline. In that study, smokers with short telomeres at baseline had accelerated lung function decline over time [20]. No long-term study of patients with COPD, has measured telomere length over time and explored the association between changes in telomere length and clinical and physiological variables of importance to those patients.

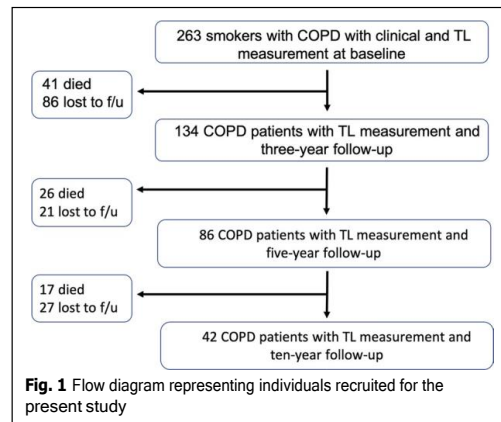
The aim of the present study was to test the hypothesis that telomere length shortening over time in patients with COPD is associated to clinical, lung function, and patient-related outcomes in 10 years of follow-up.

Methods

Subjects

A total of 263 were smokers with COPD diagnosis were screened for this study at the Hospital Universitario La Candelaria, Tenerife, Spain (Tenerife-cohort) that were followed annually as part of the BODE cohort [21, 22]. Inclusion criteria: age > 40 years, smoking history > 15 pack-years and post-bronchodilator FEV₁/FVC ratio < 0.70 clinically stable for at least 6 weeks at the time of evaluation. Spirometry, lung volumes and exercise capacity were measured according to ATS-ERS guidelines [23, 24]. Dyspnea, evaluated by mMRC scale [25], BODE Index [21] and Charlson index for comorbidities [26] were registered at every visit. Exclusion criteria: uncontrolled co-morbidities such as malignancy at baseline, asthma or other pulmonary conditions than COPD. Exacerbations were defined as a worsening of respiratory symptoms (dyspnea, cough or sputum) that required the use of antibiotics, systemic corticosteroids, or both or necessitated emergency room visit or hospital admission. All-cause mortality was recorded using information obtained from the family and then confirmed by reviewing medical records (Fig. 1).

Longitudinal study: included 134 patients from the overall cohort that were monitored through the 10 years of follow-up (413 observations). These patients presented



at least two-time longitudinal measures of telomere length and a mean follow-up of 6 years. From these 42 reached 10 years of observation. As show in Additional file 1: Table S1, the clinical characteristics of these 42 patients were similar to that of the cohort as a whole, except for being slightly younger, presenting higher K_{co} and able to walk more on the 6MWD test.

In each annual visit of the recruited participants peripheral blood sample was taken and all the clinical and functional parameters were recorded.

The study was approved by the institutional review board of HUNSC (PI14/12). All participants provided written informed consent.

Telomere length measurement

DNA was extracted from whole blood obtained at baseline, the 3rd-year, the 5th-year and at the 10th-year post enrolment. The QIAamp DNA Mini Kit (GE Healthcare) was used for this purpose and the resulting DNA samples were quantified using the Nanodrop lite spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Telomere length was measured in triplicate in each sample (20 ng of DNA) using a qPCR-based protocol as described in a previous publication of our group [13]. Also, calibrator samples were assayed in triplicate on each PCR plate to control for variation between plates. Intra-plate coefficients of variance (CV) were calculated between the replicates and samples with CV > 5% were excluded from further analysis. Two control DNA samples were assay per run as a normalizing factor. Inter-plate CV for the calibrator sample was calculated to be < 8.5%. Albumin, a single copy gene, was used as a reference gene.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 19/04/2021 12:16:31

Aída Elizabeth Córdoba Lanús
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 15:06:49

Ciro Casanova Macario
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

20/04/2021 17:06:05

María de las Maravillas Aguiar Aguiar
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

10/05/2021 10:12:30

Telomere length was calculated as a ratio of telomere to albumin where the T/S ratio for an experimental DNA sample is T, the number of nanograms of the standard DNA that matches the experimental sample for copy number of the telomere template, divided by S, the number of nanograms of the standard DNA that matches the experimental sample for copy number of the albumin single copy gene [27]. T/S was calculated using the “ $\Delta\Delta C_p$ with efficiency correction” calculation method [28].

TRF southern blot analysis

Telomere restriction fragment analysis [29] was performed by southern blot using the TeloTAGGG Telomere Length Assay Kit (Roche) according to the manufacturer instructions. The mean telomere length was calculated using the following: $TRF = \frac{\sum(OD_i)}{\sum(OD_i/L_i)}$, where OD_i is the chemiluminescent signal and OD_i/L_i is the length of the TRF at position. Conversion of T/S ratio to base pair was calculated for every subject based on the equation: $y = 1114.58 + 10,373. \text{ } x$ of the correlation analysis, where x is T/S ratio (Additional file 2: Figure S1).

Statistical analysis

Baseline characteristics and outcomes

The 263 patients with COPD were categorized in three groups by relative telomere length ratio (T/S) tertiles at baseline: shorter, medium or longer telomeres. T/S was inversely correlated with age, so all subsequent analyses were adjusted by this variable. Differences in means and proportions of baseline and follow-up characteristics between groups of patients were tested using t-Student, ANOVA, χ^2 , Fisher Exact, Kruskal–Wallis.

Telomere length shortening over time and outcomes

Longitudinal analysis was performed on each individual having at least two-time T/S measures during their follow-up over 10 years. A total of 134 patients were evaluated during follow-up until time of censoring (drop-out or death). In this analysis, we considered mortality as events that occurred during follow-up within the 3 years after the last clinical evaluation ($n=43$). A linear regression mixed model for repeated measures was performed to test the association of telomere length dynamics over follow-up time and the clinical and pulmonary function variables. The effect of the change in relative telomere length through time was analysed in relation to pulmonary function variables measured during the observation time by the variable T/S_mCh: as the change in T/S with respect to its mean over time in each individual. The age, gender and the mean T/S of each individual were used as covariates.

To analyse the effect of telomere length on all-cause mortality we compared the risk of mortality across T/S

in each individual of the entire cohort over the total follow-up period by using a Cox proportional hazards ratio (HR) regression model in multivariate analysis. T/S was measured four times; at baseline, at the third, the 5th and at the 10th-year post enrolment. Because every subject included had an annual evaluation of their clinical and lung function parameters, we used the last observation carried forward (LOCF) approach to manage the T/S measures registered at the four moments (baseline, the 3rd-year, the 5th-year and at the 10th-year post enrolment). Individual T/S values were analysed using the last observation (T/S) registered, and carried forward in order to construct the different models.

Mortality risk was tested in every subject included in the study throughout its follow-up and over the subsequent 12 months from the last clinical evaluation, taking into account that they had at least two-time longitudinal T/S measures. Kaplan–Meier estimator is used to illustrate the association between this time varying covariate and mortality as a clinical outcome. In the multivariate model, the following covariates were included: age, gender, smoking status (pack-years of smoking), active smoking (current or ex-smokers), FEV₁%, BODE index and 6MWD every year of follow-up.

SPSS 25.0 IBM Co and R software were used for all statistical analyses and two-tailed p-values < 0.05 were considered significant.

Results

Baseline analysis

The clinical characteristics and lung function data of 263 COPD patients at baseline distributed by tertiles of relative telomere length are summarized in Table 1. The range of airflow obstruction distributed by GOLD stages in COPD was as follows: I (16.7%), II (43%), III (30.8%) and IV (9.5%). Individuals with shorter telomeres were older and had a higher number of pack-years smoked ($p=0.023$). There was no relationship between telomere length and clinical and lung function parameters ($p > 0.05$) cross-sectionally. Telomere length measured by the T/S ratio inversely correlated with age ($r = -0.236$; $p < 0.001$). The median TL of the patients with an average of 64 years old, was 7.8 ± 2.7 kbp. Additional file 2: Figure S1 shows that on average, telomere length was shorter as age increased.

TFR by southern blot analysis

Telomere length was measured in forty COPD patients' DNA samples using southern blot. Relative telomere length (T/S) measured by qPCR in these same samples correlated with telomere length TL in base pairs measured by southern blot ($r = 0.502$, $p = 0.001$) (Additional file 3: Figure S2).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Table 1 Baseline clinical and lung function characteristics of COPD patients grouped by relative telomere length tertiles

Variable	Short T/S ^d N = 87	Medium T/S ^d N = 88	Long T/S ^d N = 88	p-value
T/S ratio ^a	0.40 ± 0.08	0.60 ± 0.05	0.92 ± 0.22	< 0.001
TL (bp) ^a	5248 ± 855	7346 ± 535	10,757 ± 2371	< 0.001
Age ^a	66 ± 9	64 ± 9	61 ± 10	0.005
Sex (male %)	76	80	66	0.104
BMI ^a	28 ± 6	28 ± 5	26 ± 5	0.068
Smoking habit (pack-year) ^{a,c}	69 ± 30	65 ± 26	58 ± 24	0.023
Active smoking (%)	43	43	40	0.888
FEV ₁ (L) ^a	1.49 ± 0.64	1.60 ± 0.65	1.46 ± 0.66	0.326
FEV ₁ (% pred) ^a	58 ± 21	59 ± 20	55 ± 23	0.544
FVC (% pred) ^a	87 ± 21	90 ± 23	85 ± 23	0.348
FEV ₁ /FVC (% pred) ^a	52 ± 13	51 ± 11	51 ± 13	0.930
PaO ₂ ^a	71 ± 12	73 ± 11	71 ± 12	0.605
K _{CO} ^a	79 ± 27	77 ± 24	69 ± 26	0.059
ICTLC (%) ^a	35 ± 8	35 ± 8	34 ± 10	0.875
6MWD (mts) ^a	477 ± 94	486 ± 102	480 ± 105	0.824
mMRC dyspnea ^b	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	0.210
BODE index ^b	1 (0-2)	1 (0-3)	1 (0-3)	0.223
Charlson index ^b	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0.769
Exacerbations ^b	0 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-1)	0.146

T/S ratio relative telomere length, TL telomere length, BMI body mass index, FEV₁ forced expiratory volume in 1 s, FVC forced vital capacity, %pred per cent predicted, PaO₂ partial oxygen tension, K_{CO} transfer factor coefficient of the lung for carbon monoxide, which is DL_{CO}, IC/TLC inspiratory capacity to total lung capacity ratio, 6MWD 6 min walking distance test. p-values < 0.05 are shown in italics

^a Data are presented as mean ± SD

^b Data are presented as median (25th–75th pc)

^c Number of packs of cigarettes smoked per day × number of years smoking

^d Groups defined by relative telomere length (T/S) tertiles: < 0.52, 0.52–0.71 and > 0.71

Longitudinal analysis

The longitudinal study was performed in the 134 patients followed annually over 10 years that presented at least two T/S measures over that time. The clinical and pulmonary function characteristics of these patients are shown in Table 2.

Table 3 shows the clinical and pulmonary function characteristics at baseline and after 10 years of follow up in the 42 patients that completed that period of observation. They were mostly men (67%) and had a medium age of 61 ± 8 at baseline. The telomere length was 7583 ± 2328 bp when first recruited and 5755 ± 1456 bp 10 years later. The medium loss in TL observed was 183 bp/year.

Telomere length shortening and pulmonary function

The effect of the change in T/S in relation to its mean value was analysed in each of the 134 patients included in the longitudinal study throughout their follow-up period. Overall patients that shortened the most their telomeres over that time, had worse pulmonary gas exchange measure by PaO₂, K_{CO}, worse static lung hyperinflation (IC/

TLC) and extrapulmonary affection (BODE index), even after adjustment by age, gender, active smoking and the mean T/S of each subject (Table 4). Moreover, patients that died during the follow-up period had more telomere shortening in relation to the same clinical and pulmonary function variables.

Telomere length and mortality risk

During the follow-up period, 87 (33%) of the participants died (19.5% from cancer, 39.1% from a respiratory cause and 5.8% from a cardiovascular cause). Patients with COPD with shorter telomeres (T1 and T2 tertiles of T/S) showed a higher risk of all-cause mortality (Cox HR = 5.481, p = 0.026) (Table 5, Fig. 2). In the overall cohort, the individual variation of a decrement in 0.1 units of T/S over time increased the risk of mortality (HR = 1.446, p = 0.009).

Discussion

To our knowledge this is the first study to explore the relationship between telomere length change over 10 years and clinical outcomes, in a cohort of COPD

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Table 2 Baseline characterization of COPD patients who achieved 10 years of follow-up and those who died

Variable	Total patients included (n = 134)	Alive after 10 year-follow-up (n = 42) ^a	Died during 10 year-follow-up (n = 43) ^a	p-value ^a
Age	64.9	61 ± 8	69 ± 9	0.001
BMI ^a	27 ± 5	27 ± 6	28 ± 5	0.781
Smoking habit (pack-year) ^{a,c}	65 ± 26	61 ± 22	70 ± 31	0.139
Active smoking (%)	43	52	33	0.069
FEV ₁ (L) ^a	1.52 ± 0.62	1.61 ± 0.61	1.34 ± 0.56	0.038
FEV ₁ (% pred) ^a	58 ± 21	61 ± 19	51 ± 21	0.027
FVC (% pred) ^a	89 ± 24	90 ± 23	81 ± 25	0.070
FEV ₁ /FVC (% pred) ^a	51 ± 11	54 ± 10	49 ± 11	0.024
PaO ₂ ^a	72 ± 11	73 ± 10	68 ± 10	0.015
K _{CO} ^a	80 ± 26	90 ± 28	74 ± 23	0.009
IC/TLC (%) ^a	34 ± 8	35 ± 8	33 ± 8	0.143
6MWD (mts) ^a	495 ± 90	522 ± 83	474 ± 75	0.008
mMRC dyspnea ^b	1 (0-2)	1 (0-1)	1 (0-2)	0.703
BODE index ^b	1 (0-3)	1 (0-2)	1 (0-3)	0.179
Charlson index ^b	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-1)	0.740

Paired sample t test was used

BMI body mass index, FEV₁ forced expiratory volume in 1 s, FVC forced vital capacity, %pred per cent predicted, PaO₂ partial oxygen tension, K_{CO} transfer factor coefficient of the lung for carbon monoxide, which is DL_{CO}, IC/TLC inspiratory capacity to total lung capacity ratio, 6MWD 6 min walking distance test

^a p-value between compared groups

^a Data are presented as mean ± SD

^b Data are presented as median (25th–75th pc)

^c Number of packs of cigarettes smoked per day × number of years smoking

Table 3 Characterization of patients with COPD (N = 42) at baseline and at 10 years of follow-up

Variable	Baseline	10 year-follow-up	p-value
T/S ratio ^a	0.62 ± 0.22	0.45 ± 0.14	< 0.0001
TL (bp) ^a	7583 ± 2328	5755 ± 1455	< 0.0001
BMI ^a	27 ± 6	27 ± 6	0.981
Active smoking (%)	52	40	< 0.0001
FEV ₁ (L) ^a	1.61 ± 0.61	1.36 ± 0.57	< 0.0001
FEV ₁ (% pred) ^a	61 ± 19	56 ± 18	0.014
FVC (% pred) ^a	90 ± 23	86 ± 24	0.043
FEV ₁ /FVC (% pred) ^a	54 ± 10	51 ± 10	0.022
PaO ₂ ^a	73 ± 10	68 ± 10	< 0.0001
K _{CO} ^a	90 ± 28	76 ± 24	0.006
IC/TLC (%) ^a	36 ± 8	31 ± 9	0.001
6MWD (mts) ^a	520 ± 84	448 ± 125	< 0.0001
mMRC dyspnea ^b	1 (0-1)	1 (0-2)	0.209
BODE index ^b	1 (0-2)	1 (0-3)	0.003
Charlson index ^b	0 (0-1)	1 (0-1)	< 0.0001

Paired sample t test was used

T/S ratio relative telomere length, TL telomere length in base pairs, BMI body mass index, FEV₁ forced expiratory volume in 1 s, FVC forced vital capacity, %pred per cent predicted, PaO₂ partial oxygen tension, K_{CO} transfer factor coefficient of the lung for carbon monoxide, which is DL_{CO}, IC/TLC inspiratory capacity to total lung capacity ratio, 6MWD 6 min walking distance test. p-values < 0.05 are shown in italics

^a Data are presented as mean ± SD

^b Data are presented as median (25th–75th pc)

patients. Those patients that shorten their telomeres the most during the follow-up period, showed worsening of alveolar gas exchange, lung hyperinflation and clinical outcomes compared with those whose telomeres did not shorten as much. Moreover, patients within the lowest telomere length presented a higher risk of all-cause mortality.

According to previous studies completed in general populations, leucocyte telomeres shorten 40–105 base pairs per year [14, 30]. We found that the mean telomere length in this cohort of COPD patients aged 64 years-old at time of recruitment was 7.6 kbp and it decreased to 5.7 kbp after 10 years, approximately 183 bp/year. In addition, the TL observed in COPD patients in this study corresponds to that observed by others in healthy subjects of similar age but 10 years older [14]. Rutten and colleagues also suggested an anticipated telomere attrition in patients with COPD corresponding to a biological age 7 years older [17]. Other studies using clinical observations but without telomere length determination, have suggested a relationship between COPD severity, and the development of diseases characteristically seen in the elderly [31–33]. Recently, Divo and co-workers [4] using comorbidities network analysis showed that patients with COPD developed a similar prevalence of diseases frequently seen in the elderly one or two decades

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

Table 4 Longitudinal association between decreased telomere length and lung function and clinical variables during 10 year-follow-up

	Total patients (n = 134)		Deaths during follow-up (n = 43)		Alive patients (n = 91)	
	β	p-value	β	p-value	β	p-value
FEV ₁ (L)	0.13	0.022	0.17	0.112	0.11	0.104
FEV ₁ (% pred)	0.56	0.784	2.91	0.501	0.59	0.798
FEV ₁ /FVC (% pred)	0.445	0.0008	0.579	0.024	0.377	0.015
PaO ₂	0.771	< 0.0001	1.398	0.0003	0.443	0.053
IC/TLC (%)	0.006	< 0.0001	0.006	0.021	0.006	0.0009
K _{CO}	0.877	0.042	1.325	0.092	0.817	0.106
6MWD (mts)	4.655	0.004	10.53	0.007	1.769	0.299
BODE index	- 0.081	0.009	- 0.219	0.002	- 0.013	0.689

Linear regression of mixed models. β , coefficient

FEV₁ forced expiratory volume in 1 s, FVC forced vital capacity, % pred per cent predicted, PaO₂ partial oxygen tension, K_{CO} transfer factor coefficient of the lung for carbon monoxide, which is DL_{CO}/IC/TLC inspiratory capacity to total lung capacity ratio, 6MWD 6 min walking distance test. p-values < 0.05 are shown in italics

Table 5 Hazard ratio of all-cause mortality in patients with COPD grouped by tertiles of telomere length

	HR (95% CI)	p-value
Model 1		
Medium vs. long T/S ^a	4.803 (0.99-23.18)	0.051
Short vs. long T/S ^a	6.267 (1.32-29.82)	0.021
Model 2		
Short/medium vs. long T/S ^a	5.481 (1.23-24.42)	0.026
Model 3		
T/S (decrement 0.1 units) ^a	1.446 (1.10-1.91)	0.009

T/S relative telomere length ratio, CI confidence interval

^a Cox HR analysis was adjusted by age, FEV₁% and active smoking (current and former smokers) as covariates. Long T/S was used as the reference level. p-value < 0.05 are shown in italics

earlier than in patients without COPD. These observations supporting accelerated aging as a potential mechanism in patients with COPD, should be associated with accelerated shortening of telomeres if this were a marker of aging. Indeed, we have previously shown that COPD patients shorten their telomeres over time at a higher rate than healthy individuals of the same age [13].

In this prospective study, COPD patients that shortened their telomeres the most over the 10 years of observation had significantly worse oxygenation (PaO₂), lower K_{CO}, more hyperinflation (IC/TLC), lower BODE index and lower 6MWT than those patients with less telomere shortening. As shown in Table 3, these associations were stronger than that observed between telomere shortening and the change in FEV₁% predicted, suggesting that accelerated aging affects primarily the lung parenchyma over the airway tissue itself. In addition, the effects also seem to impact intensely in the extra-pulmonary components of the disease. In this way, patients with shorter

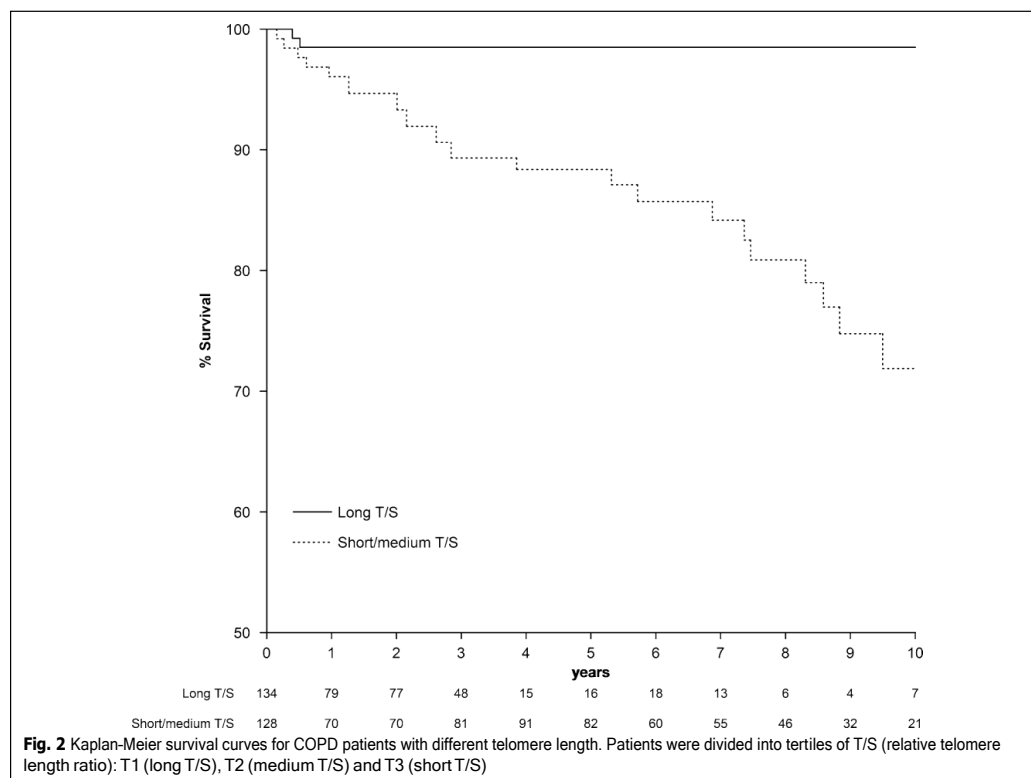
telomeres over time score worse the BODE index, a good predictor of poor outcomes, compared to the FEV₁. Previously, one other study reported a correlation between shorter telomere length and worse oxygenation but not with lung function expressed by the FEV₁ [11]. Moreover, other authors proposed that telomere attrition may act as biomarkers of COPD severity [17, 34], impaired exercise capacity [35], health status (activity score domain of the SGRQ) and exacerbations [19, 35]. We expand on these findings by demonstrating for the first time a relationship between accelerated telomere shortening and worsening of alveolar gas exchange and clinical extrapulmonary variables in patients with COPD, thus supporting the concept that telomere shortening is a surrogate marker of the aging process in vivo [36].

Interestingly, individuals in the lowest tertile of telomere length through the follow-up were at an increased risk of mortality when compared to the highest tertile of TL, independent of age, active smoking and lung function. A telomere length ratio decrement of 0.1 units had a predictive risk value for all-cause mortality. Contradictory results have been reported from studies on general population exploring the relation between TL and mortality [15, 37, 38], but very few studies have been completed in patients with COPD. Our findings are in agreement with Lee and co-workers [18] who found that leucocyte telomere length was related to all-cause and cancer mortality in COPD patients followed a median of 7.5 years. Similarly, a recent study (MACRO study of azythromycin), reported an increased all-cause mortality risk for patients that exhibited shorter telomeres (lowest quartile of TL), although this was only observed in the placebo group [19]. COPD as a disease of accelerated aging is associated with earlier mortality. However, the exact mechanism remains unknown but certainly

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30



inflammation plays a role, in consequence, some authors propose an “Inflammaging” process [39].

Interestingly, some authors have focused their research on certain molecules and existing drugs in an attempt to unravel how to control telomere attrition. SIRT1, an anti-aging protein, whose activation in mice has been reported to prevent inflammatory responses [40] and to be involved in the reduction of telomeric attrition [41]. On the other hand, telomerase activation has emerged as a potential treatment directed to cases with short telomeres and physiological aging [42]. Recently, metformin, the preferred first-line drug against type-2 diabetes is known to reduce oxidative damage accumulation, chronic inflammation, and increase overall lifespan in mice [43]. Recently, other studies have suggested that metformin use may reduce telomere shortening in adults [44, 45].

This study has several strengths. The most important is its prospective nature (first of its kind) and the excellent phenotypic characterization of the cohort and their outcomes registered annually through 10 years. It is also

noteworthy that we were able to calculate the corresponding absolute telomere length data, as supported by the high correlation found between southern blot and the qPCR technique used. However, there are also some limitations: First, telomere length was measured in leucocyte cells and not in lung tissue. However, leukocytes remain the tissue of choice for TL measurement in large cohorts of individuals, because it is accessible and representative of distant tissues [46, 47]. Also, we cannot discard that the shortening of TL differs in different blood cells may vary through time. However, the samples were taken at similar times in all patients, thereby decreasing this potential bias, and TL was measured only if the patients presented blood leukocyte and differential counts values that were within the established normal ranges. Second, although 42 patients out of 263 reached 10 years of observation, their baseline clinical and physiological characteristics were similar to the group as a whole, supporting the validity of the results in these patients as a reflection of COPD as a whole. Furthermore, there were 134 patients having at least two measures of telomere

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

length with a minimum of 6 years follow-up included in the longitudinal analysis (413 observations of clinical and physiological variables) before they were censored or died. Their results provide further support to the conclusions here presented. Also, this is a single center study. A validation cohort would be required; however, this is difficult to achieve due to the complexity of the study design and the time required for monitoring. Another limitation of this study is the absence of histological or imaging data, but this does not detract from the results obtained. Finally, our sample size did not allow us to contrast specific causes of mortality such as cancer or cardiovascular disease, however this does not invalidate the overall findings as the multidimensional nature of the different variables measured moved in the same direction.

Conclusions

In conclusion, this longitudinal observational study showed that an accelerated telomere shortening over time is associated with worse alveolar gas exchange function, worse lung hyperinflation and extrapulmonary affection in patients with COPD. Moreover, having shorter telomeres is associated with all-cause mortality risk. Studies with larger cohorts with several time points of TL measurements, are needed to validate our findings.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01616-z>.

Additional file 1: Table S1. Baseline characteristics comparisons between patients with COPD (n = 42) that reached 10 years follow-up vs. the rest of the cohort (n = 221).

Additional file 2: Figure S1. Telomere length in patients with COPD distributed by range of age at baseline as follows: ≤ 59 (n = 83), 60-69 (n = 95) and ≥ 70 (n = 85) years old (p = 0.022).

Additional file 3: Figure S2. Correlation between telomere length measure by TFR and T/S ratio.

Abbreviations

COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; T/S: Relative telomere length ratio; TL: Telomere length; qPCR: Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction; CV: Coefficients of variance; T/S_mCh: Change in T/S with respect to its mean over time; HR: Hazard ratio; GLIM: General Linear Modelling for repeated measures test; FEV1: Forced expiratory volume in 1 s; FVC: Forced vital capacity; BMI: Body Mass Index; PaO₂: Partial oxygen tension; KCO: Transfer factor coefficient of the lung for carbon monoxide, corrected by alveolar volume; IC/TLC: Inspiratory capacity to total lung capacity ratio; 6MWD: Six-minute walking distance test.

Acknowledgements

We will like to thank Hilaria González Acosta for their excellent technical assistance.

Authors' contributions

ECL, SCR and CC participated in conception and design; analysis and interpretation and drafting the manuscript for important intellectual content and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data

analysis. MAG participated in data analysis and interpretation. DM, FGH and JAP participated in data acquisition, BC participated in the interpretation of the results and helped draft the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

The study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (PI 12/00355); European Regional Development Funds, ERDF, the Spanish Respiratory Society, SEPAR (PI 13/007) and Menarini Laboratory S.A. ECL is supported by Cabildo de Tenerife, Tenerife 2030, FDCAN, MEDI, in the Agustín de Betancourt programme.

Availability of data and materials

Data are available upon reasonable request. All data relevant to the study are included in the article or uploaded as additional information.

Ethics approval and consent to participate

Written informed consent was obtained from all participants. Ethical approval was obtained from Hospital Universitario La Candelaria, Tenerife, Spain (P114/12).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

Elizabeth Córdoba-Lanús, Sara Cazorla-Rivero, Miguel-Angel García-Bello, Delia Mayato, Francisca Gonzalo-Hernández and Jessel Ayra-Plasencia declare not to have any financial or personal conflict of interests. Ciro Casanova Macario declares to have received lectures and / or scientific advice from Laboratorios Bial, Boehringer-Ingelheim, Gebro Pharma, GSK, Esteve, Menarini, Novartis and Rovi in the last 3 years. Bartolomé Celli declares to have received grants from Astra Zeneca; advisory board payments from Glaxo Smith Kline, Boehringer-Ingelheim, Astra Zeneca and Novartis, Pulmonix; and declares not to have shares or interest in any company, neither have received or had any relationship with tobacco money.

Author details

¹ Research Unit, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain. ² Pulmonary Division, Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, Spain. ³ University of La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Tenerife, Spain. ⁴ Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales Y Salud Pública de Canarias (IUNETSPC), Tenerife, Spain. ⁵ Pulmonary and Critical Care Department, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

Received: 18 November 2020 Accepted: 6 January 2021
 Published online: 15 February 2021

References

- Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):347-65.
- Lange P, Celli B, Agustí A, Jensen GB, Divo M, Faner R, et al. Lung-function trajectories leading to chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2015;373:111-22.
- Baty F, Putora PM, Isenring B, Blum T, Brutsche M. Comorbidities and burden of COPD: a population based case-control study. *PLoS ONE*. 2013;8:e63285.
- Divo MJ, Celli BR, Poblador-Plou B, Calder-Larrañaga A, de-Torres JP, Gimeno-Feliu LA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as a disease of early aging: evidence from the EpiChron Cohort. *PLoS ONE*. 2018;13(2):e0193143.
- Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest*. 2009;135:173-80.
- Lee J, Sandford A, Man P, Sin D. Is the aging process accelerated in chronic obstructive pulmonary disease? *Curr Opin Pulm Med*. 2011;17(2):90-7.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828 Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30

7. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*. 2006;12:1133-8.
8. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end replication problem and cell aging. *J Mol Biol*. 1992;225:951-60.
9. Verdun RE, Karlseder J. Replication and protection of telomeres. *Nature*. 2007;447(7147):924-31.
10. Birch J, Anderson RK, Correia-Melo C, Jurk D, Hewitt G, Madeira-Marques F, et al. DNA damage response at telomeres contributes to lung aging and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(10):L1124-37.
11. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(7):566-71.
12. Houben JM, Mercken EM, Ketelslegers HB, Bast A, Wouters EF, Hageman GJ, et al. Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2009;103(2):230-6.
13. Córdoba-Lanus E, Cazorla-Rivero S, Espinoza-Jimenez A, de-Torres JP, María J, Pajares MJ, Aguirre-Jaime A, et al. Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort. *Respir Res*. 2017;18(1):59.
14. Ehrhlichbach S, Willeit P, Kiechl S, Willeit J, Reindl M, Schanda K, et al. Influences on the reduction of relative telomere length over 10 years in the population-based Bruneck Study: introduction of a well-controlled high-throughput assay. *Int J Epidemiol*. 2009;38(6):1725-34.
15. Wang Q, Zhan Y, Pedersen NL, Fang F, Hägg S. Telomere length and all-cause mortality: a meta-analysis. *Ageing Res Rev*. 2018;48:11-20.
16. Albrecht E, Sillanpää E, Karrasch S, Couto-Alves A, Codd V, Hovatta J, et al. Telomere length in circulating leukocytes is associated with lung function and disease. *Eur Respir J*. 2014;43:983-92.
17. Rutten EP, Gopal P, Wouters EF, Franssen F, Hageman GJ, Vanfleteren LE, et al. Various mechanistic pathways representing the aging process are altered in COPD. *Chest*. 2016;149:53-61.
18. Lee J, Sandford AJ, Connell JE, Yan J, Mui T, Li Y, et al. The relationship between telomere length and mortality in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35567.
19. Jin M, Lee EC, Ra SW, Fishbane N, Tam S, Criner GJ, et al. Relationship of absolute telomere length with quality of life, exacerbations, and mortality in COPD. *Chest*. 2018;154(2):266-73.
20. Andujar P, Courbon D, Bizard E, Marcos E, Adnot S, Boyer L, et al. Smoking, telomere length and lung function decline: a longitudinal population-based study. *Thorax*. 2018;73(3):283-5.
21. Celli BR, Cote C, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, et al. The body mass index, airflow obstruction, dyspnea, exercise performance (BODE) index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:1005-12.
22. Casanova C, de Torres JP, Aguirre-Jaime A, Pinto-Plata V, Marin JM, Córdoba E, et al. The progression of chronic obstructive pulmonary disease is heterogeneous: the experience of the BODE cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(9):1015-21.
23. American Thoracic Society Statement. Lung function testing: selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:1202-18.
24. Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, Johnson DC, van der Grinten CPM, Brusasco V, et al. Standardization of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J*. 2005;26(4):720-35.
25. Mahler DA, Wells CK. Evaluation of clinical methods for rating dyspnea. *Chest*. 1988;93(3):580-6.
26. Charlson M, Sztrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol*. 1994;47(11):1245-51.
27. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(3):e21.
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
29. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA-sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human-chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:6622-6.
30. Müezzini A, Zaineddin AK, Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):509-19.
31. Sabit R, Bolton CE, Edwards PH, Pettit RJ, Evans WD, McEniery CM, et al. Arterial stiffness and osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:1259-65.
32. Divo MJ, Cote C, de Torres JP, Casanova C, Marin JM, Pinto-Plata V, et al. Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:155-61.
33. Agustí A, Noell G, Brugada J, Faner R. Lung function in early adulthood and health in later life: a transgenerational cohort analysis. *Lancet Respir Med*. 2017;5(12):935-45.
34. Rode L, Bojesen SE, Weischer M, Vestbo J, Nordestgaard BG. Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46,396 individuals. *Thorax*. 2013;68(5):429-35.
35. Wan ES, Goldstein RL, Fan VS, Nguyen HQ, Hart JE, Garshick E, et al. Telomere length in COPD: relationships with physical activity, exercise capacity, and acute exacerbations. *PLoS ONE*. 2019;14(10):e0223891.
36. von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*. 2005;5(2):197-203.
37. Bendix L, Thinggaard M, Fengler M, Kolvraa S, Avlund K, Linneberg A, et al. Longitudinal changes in leukocyte telomere length and mortality in humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69:231-9.
38. Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64,637 individuals from the general population. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(6):djv074.
39. López-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
40. Yao H, Chung S, Hwang JW, Rajendrasozhan S, Sundar IK, Dean DA, et al. SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice. *J Clin Invest*. 2012;122:2032-45.
41. De Bonis ML, Ortega S, Blasco MA. SIRT1 is necessary for proficient telomere elongation and genomic stability of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep*. 2014;2:690-706.
42. Piñeiro-Hermida S, Autilio C, Martínez P, Bosch F, Pérez-Gil J, et al. Telomerase treatment prevents lung fibrotic pathologies associated with physiological aging. *J Cell Biol*. 2020;219(10):e202002120.
43. Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*. 2013;4:2192.
44. Rosa E, Dos Santos RRC, Fernandes LFA, Neves FAR, Coelho MS, Amato AA. Leukocyte telomere length correlates with glucose control in adults with recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;135:30-6.
45. Liu J, Ge Y, Wu S, Ma D, Xu W, Zhang Y, et al. Association between anti-diabetic agents use and leukocyte telomere shortening rates in patients with type 2 diabetes. *Ageing*. 2019;11(2):741-55.
46. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun*. 2013;4:1597.
47. Kimura M, Gazit Y, Cao X, Zhao X, Lansdorp PM, Aviv A. Synchrony of telomere length among hematopoietic cells. *Exp Hematol*. 2010;38:854-9.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015. Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 3371828

Código de verificación: Lsz3bQ+z

Firmado por: Sara Estefanía Cazorla Rivero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 19/04/2021 12:16:31
Aída Elizabeth Córdoba Lanús UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 15:06:49
Ciro Casanova Macario UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	20/04/2021 17:06:05
María de las Maravillas Aguiar Aguiar UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	10/05/2021 10:12:30