



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



Evaluación de la longitud telomérica en pacientes Long-COVID con dolor musculoesquelético crónico.

Telomere length assessment in Long- COVID patients with chronic musculoskeletal pain.

Autor/a:

**D. Manuel Alvar Freyre De
Andrade Villa**

Tutor/es:

D^a.Raquel Almansa Mora D^a. Laura Barrero Santiago

TÍTULO: Evaluación de la longitud telomérica en pacientes Long-COVID con dolor musculoesquelético crónico

AUTOR/A: Manuel Alvar Freyre De Andrade Villa

TUTOR/ES: D^a.Raquel Almansa Mora, D^a. Laura Barrero Santiago

DEPARTAMENTO: Departamento de Biología celular, Genética, Histología y Farmacología

TRIBUNAL

PRESIDENTE: D^a Marta Hernández Pérez (Dpto. Anatomía Patológica, Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública, Medicina Legal y Forense)

SECRETARIO: D. Jaime Santo-Domingo (Dpto. Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología)

VOCAL: D^a. Raquel Almansa Mora (Dpto. Biología celular, Genética, Histología y Farmacología)

SUPLENTE 1: D^a. Marita Hernández Garrido (Dpto. Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología)

SUPLENTE 2: D^a. Teresa Nieto Miguel (Dpto. Biología celular, Genética, Histología y Farmacología)

FECHA:

CALIFICACIÓN:

RESUMEN

El Long-COVID se define como un conjunto de síntomas que persisten más de cuatro semanas tras la infección por SARS-CoV-2, sin causa alternativa identificable. En general, este síndrome es más frecuente en mujeres de mediana edad, incluso tras cuadros de infección leve. Uno de los síntomas más frecuentes y debilitantes es el dolor musculoesquelético crónico. La fisiopatología del Long-COVID parece relacionarse con un estado inflamatorio sostenido, estrés oxidativo y alteraciones inmunológicas, factores que pueden contribuir al acortamiento telomérico. Esto sugiere un posible vínculo entre el Long-COVID y un envejecimiento celular acelerado.

El presente trabajo fin de grado tuvo como objetivo evaluar si las pacientes con Long-COVID presentan una longitud telomérica más corta en comparación con controles sin síntomas persistentes, explorando también la relación entre dicho acortamiento y el dolor crónico. Para ello se llevo a cabo un estudio de casos y controles con 40 mujeres diagnosticadas de Long-COVID con dolor musculoesquelético crónico, y 25 controles post-COVID sin síntomas persistentes. Se recogieron variables clínicas, sociodemográficas y psicosociales, y se midió la longitud telomérica relativa en leucocitos mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Los resultados revelaron telómeros significativamente más cortos en las mujeres con Long-COVID, sugiriendo un posible vínculo entre el envejecimiento celular acelerado y esta patología. Estas pacientes también mostraron dolor generalizado, mayor intensidad dolorosa, peor calidad de vida y mayores niveles de ansiedad y depresión. Estos hallazgos abren nuevas líneas de investigación sobre los mecanismos moleculares implicados en el Long-COVID y sus secuelas a largo plazo.

Palabras clave

Long-COVID, telómeros, dolor crónico, qPCR, envejecimiento celular

ABSTRACT

Long-COVID is defined as a set of symptoms that persist for more than four weeks after SARS-CoV-2 infection, with no identifiable alternative cause. In general, this syndrome is more frequent in middle-aged women, even after mild infection. One of the most frequent and debilitating symptoms is chronic musculoskeletal pain. The pathophysiology of Long-COVID seems to be related to a sustained inflammatory state, oxidative stress and immunological alterations, factors

that may contribute to telomeric shortening. This suggests a possible link between Long-COVID and accelerated cellular aging.

The aim of the present work was to evaluate whether patients with Long-COVID have a shorter telomere length compared to controls without persistent symptoms, and to explore the relationship between telomere shortening and chronic pain. A case-control study was carried out with 40 women diagnosed with Long-COVID with chronic musculoskeletal pain, and 25 post-COVID controls without persistent symptoms. Clinical, sociodemographic and psychosocial variables were collected, and relative telomere length was measured in leukocytes by quantitative real-time PCR.

The results revealed significantly shorter telomeres in women with Long-COVID, suggesting a possible link between accelerated cellular aging and this pathology. These patients also showed generalized pain, greater pain intensity, poorer quality of life and higher levels of anxiety and depression. These findings open new lines of research into the molecular mechanisms involved in Long-COVID and its long-term sequelae.

Keywords

Long-COVID, telomere attrition, chronic pain, qPCR, cellular aging

AGRADECIMIENTOS

No podría haber realizado este trabajo de Fin de Grado sin el apoyo y los aprendizajes que me han brindado mis tutoras Raquel y Laura, y sin la ayuda de Edu, todos ellos se han esforzado al máximo y han puesto todo de su parte para que este proyecto saliera adelante, tuvieron que aguantarme incluso cuando yo no quería seguir y por eso estoy muy agradecido con todo lo que me han enseñado durante estos meses y esta ha sido una experiencia que sé que no voy a olvidar.

Quiero especialmente dar las gracias a mi novia Natalia, ya que sin su amor y comprensión no habría podido acabar la carrera, también dar las gracias a mi familia por motivarme e impulsarme siempre en todos mis proyectos y mis locuras, y sobretodo quiero agradecer a mi madre, por traerme al mundo, alimentar mi curiosidad y por inspirarme siempre a seguir mi corazón, y a buscar más allá de lo que se vé, gracias mamá.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido

RESUMEN.....	I
Palabras clave.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	III
Índice De Figuras y Tablas	IV
1. Introducción.....	1
2. Hipótesis y objetivos	4
3. Materiales y métodos.....	5
3.1 Diseño del estudio:	5
3.2 Selección de casos y controles.....	5
3.3 Variables clínicas y sociodemográficas.....	6
3.4 Extracción, purificación y cuantificación del ADN.....	6
3.5 Cuantificación de la longitud telomérica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.	7
Fundamento de la técnica.....	7
Puesta a punto de la qPCR	9
Cuantificación de la longitud de los telómeros en los participantes.	11
3.6 Estadística:.....	12
4. Resultados.....	13
4.1 Caracterización clínica, sociodemográfica, psicosocial y del dolor en pacientes con Long-COVID.....	13
4.2 Pruebas de eficiencia y puesta a punto de la qPCR para la cuantificación de la longitud telomérica relativa.	15
4.3 Cuantificación Relativa de la Longitud Telomérica en pacientes y controles sanos.	16
5. Discusión	18
6. Conclusiones.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21
APÉNDICE	24
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	24
CÓDIGO	24
ANEXOS	25
Anexo 1. Documento de Consentimiento informado.....	25
Anexo 2. Variables recogidas en el estudio:	28
Anexo 3. Protocolo utilizado en la purificación del ADN	30
Anexo 4. Resultados de eficiencias.....	34

Índice De Figuras y Tablas

Figuras

Figura 1. Esquema de los diferentes síntomas del Long-COVID -----	2
Figura 2. Explicación general del acortamiento de los telómeros en células sanas -----	3
Figura 3. Resumen del procedimiento experimental llevado a cabo -----	5
Figura 4. Protocolo de extracción del ADN. -----	7
Figura 5. Esquema representativo del cálculo del ciclo umbral (Ct) -----	8
Figura 6. Lugares de anillado de los <i>primers</i> teloméricos (tel 1 y tel 2) utilizados en la qPCR-----	8
Figura 7. Esquema representativo del programa del termociclador para la cuantificación de telómeros mediante PCR a tiempo real cuantitativa relativa-----	9
Figura 8. Gel de electroforesis realizado para comprobar el tamaño de los amplicones-----	16
Figura 9. Ejemplo de las curvas de melting de la amplificación de los telómeros (izquierda y del gen 36B4 de 16 muestras de pacientes LONG-COVID (derecha). -----	16
Figura 10. Diagrama de cajas que representa las diferencias en la rTL entre controles sano y pacientes Long-COVID. -----	17
Figura 11. Diagramas de cajas en los que se representan la intensidad del dolor a las 4 semanas (izquierda) dolor generalizado (derecha) frente a la rTL -----	17

Tablas

Tabla 1. Secuencia de bases de los <i>primers</i> utilizados en la qPCR. -----	9
Tabla 2. Cantidades relativas de cada uno de los componentes de la reacción en función del fragmento de ADN a amplificar -----	11
Tabla 3. Características sociodemográficas de la muestra -----	13
Tabla 4. Distribución de las variables relacionadas con el dolor y psicosociales en la muestra ---	14
Tabla 5: Características clínicas de la muestra. -----	14
Tabla 6. Distribución de las variables relacionadas con el dolor en los casos. -----	15

1. Introducción

El Long-COVID hace referencia a un conjunto de síntomas que persisten o aparecen después de 4 semanas de la infección por SARS-CoV-2, en ausencia de un diagnóstico etiológico alternativo (1). Esta definición temporal de 4 semanas marca el límite a partir del cual se considera que los síntomas ya no forman parte de la fase aguda de la enfermedad (2). Esta condición recibe diversos nombres en la literatura científica y médica, incluyendo: COVID prolongado, COVID persistente, síndrome post-COVID-19, condición post-COVID (PCC, por sus siglas en inglés), y secuelas post-agudas de SARS-CoV-2 (PASC) (3). La diversidad terminológica refleja la evolución del conocimiento sobre esta condición desde el inicio de la pandemia, siendo actualmente el término más usado el Long-COVID.

La prevalencia del Long-COVID varía según los estudios y las definiciones utilizadas, pero los datos disponibles sugieren cifras significativas. Aproximadamente 1 de cada 5 personas presenta algún síntoma tras 5 semanas de la infección inicial, y cerca de 1 de cada 10 personas continúa con síntomas después de 12 semanas (4). Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 6 de cada 100 personas que contraen la COVID-19 acaban padeciendo esta afección. Es importante señalar que la probabilidad de presentar Long-COVID actualmente es menor que al inicio de la pandemia, posiblemente debido a factores como la vacunación (5), variantes virales menos severas (6), o mejores tratamientos para la fase aguda (7). Sin embargo, dado que el virus SARS-CoV-2 continúa circulando ampliamente, cada nueva infección conlleva un riesgo de desarrollar esta condición (8).

El Long-COVID puede presentarse en personas de todas las edades y grados de severidad durante la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, la mayor proporción de diagnósticos se observa en el grupo de 36 a 50 años, siendo predominantes los casos en pacientes no hospitalizados con síntomas agudos leves, ya que este grupo constituye la mayoría de los contagios globales de COVID-19 (9).

La sintomatología del Long-COVID es muy diversa, llegándose a describir hasta 203 síntomas diferentes. Esto ha supuesto todo un reto a la hora de establecer con certeza el síndrome, las manifestaciones clínicas y los factores patogénicos de la enfermedad. Los síntomas más comunes y representativos de esta patología incluyen fatiga o debilidad muscular, malestar, disnea, cefalea, mareos o «niebla mental», y muchos otros trastornos neurológicos, cardíacos, digestivos, respiratorios, reproductivos o dermatológicos (10).

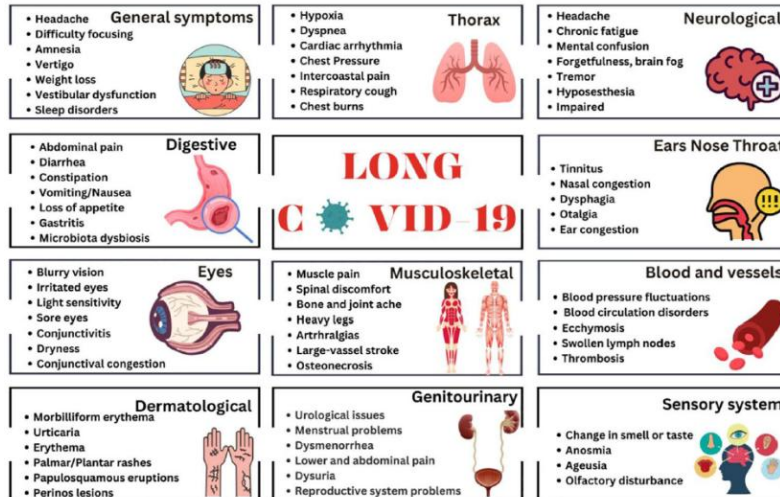


Figura 1. Síntomas y manifestaciones que puede producir el Long-COVID en cada sistema. (tomado de Gheorghita et al. 2024).

Es más, la persistencia de estos síntomas contribuye en gran medida a una disminución de la calidad de vida de los pacientes con Long-COVID, favoreciendo a la aparición de ansiedad y depresión (11). Este hecho también impacta en la productividad de las personas con Long-COVID. En España, solo el 50% de las personas pudo volver al trabajo después de presentar durante más de un año síntomas de Long-COVID (11). Esta situación crea un círculo vicioso en la vida de los trabajadores, donde la pérdida de ingresos agrava el estrés financiero, empeorando síntomas como la fatiga y la niebla mental.

El dolor crónico es el tercer síntoma más prevalente después de la fatiga y la disnea, en especial la mialgia y el dolor articular (12). Los pacientes tienden a experimentar un patrón heterogéneo de dolor, en su mayoría de distribución generalizada, que se asemeja al de otras afecciones como la fibromialgia o la encefalomiелitis miálgica/síndrome de fatiga crónica (13).

Actualmente no se conoce con exactitud la causa de estos síntomas (9), aunque en diferentes estudios se barajan hipótesis acerca del mecanismo patológico detrás del Long-COVID, como por ejemplo: la persistencia de fragmentos y reservorios del virus (14), la aparición de una respuesta inflamatoria exagerada con un perfil de citoquinas proinflamatorias elevado (tormenta de citoquinas) (15) o la reactivación de virus latentes debido al estrés inmunológico (16).

La sintomatología del Long-COVID también se ha asociado con un desequilibrio redox celular, evidenciando un estado de estrés oxidativo persistente. Varios mecanismos moleculares descritos en pacientes con Long-COVID indican una disrupción de la homeostasis oxidativa, causada principalmente por la disfunción mitocondrial, la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediada por NADPH oxidasa (NOX) y la inhibición del factor de transcripción antioxidante Nrf2. Esta combinación de factores impide la correcta resolución de la inflamación y favorece un ciclo autoamplificable de daño tisular (17).

Numerosos estudios han demostrado que factores como la inflamación crónica y el estrés oxidativo contribuyen al acortamiento de los telómeros, promoviendo la disfunción telomérica, la senescencia celular y, en consecuencia, una aceleración del proceso de envejecimiento (18,19).

Los telómeros son regiones especializadas localizadas en los extremos de los cromosomas, compuestas por secuencias repetitivas de ADN (ácido desoxirribonucleico). Estas estructuras cumplen una función protectora fundamental: evitan que los extremos cromosómicos se desgasten o se entrelacen entre sí durante la división celular. Esta protección es esencial para mantener la integridad genómica de las células. Cada vez que una célula experimenta división, los telómeros sufren un acortamiento progresivo. Este proceso natural ocurre debido a la incapacidad de la ADN polimerasa para replicar completamente los extremos de los cromosomas, un fenómeno conocido como "el problema de la replicación terminal". Con el tiempo, los telómeros se acortan hasta un punto crítico en el que la célula ya no puede dividirse correctamente, lo que conduce a la senescencia celular o muerte programada (20).

Sin embargo, tal y como se indicó anteriormente, el acortamiento de los telómeros no solo ocurre de forma natural por división celular, también puede acelerarse significativamente debido a factores como, el estrés oxidativo que daña directamente el ADN telomérico (21), procesos inflamatorios crónicos (22) e infecciones virales que alteran la homeostasis celular (23). Es por ello que el acortamiento telomérico es hoy por hoy uno de los sellos distintivos del envejecimiento celular y se ha documentado en múltiples patologías crónicas, desde enfermedades cardiovasculares hasta procesos inflamatorios de larga evolución y cáncer.

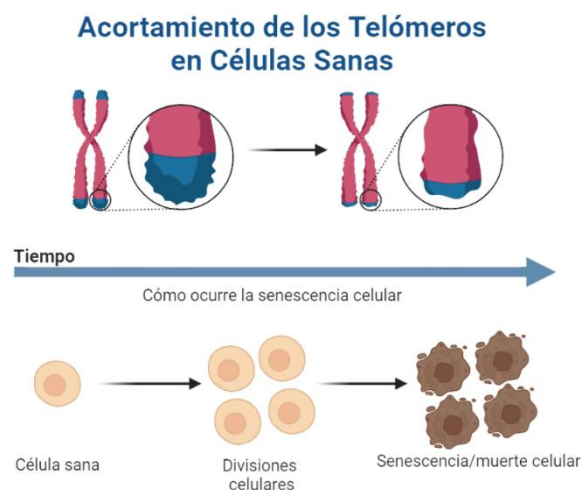


Figura 2. Explicación general del acortamiento de los telómeros en células sanas. Elaboración propia. Creada con Biorrender.

Existen diversas publicaciones que establecen una clara asociación entre la infección aguda por el

virus SARS-Cov-2 y el acortamiento acelerado de los telómeros, demostrando que los pacientes con COVID-19 grave presentan telómeros significativamente más cortos en comparación con cohortes control. También se ha observado que el acortamiento telomérico se asocia con un mayor riesgo de enfermedad crítica, definida como ingreso en UCI o muerte sin ingreso en UCI (23).

A pesar de la evidencia que relaciona la infección aguda por SARS-CoV-2 con el acortamiento de los telómeros, actualmente existen escasos estudios que analicen de forma específica la posible asociación entre el Long-COVID y la disfunción telomérica. Esta falta de investigación es especialmente relevante si se tiene en cuenta que muchos de los factores que aceleran el acortamiento telomérico —como la inflamación crónica, el estrés oxidativo o la alteración del equilibrio inmunológico— están ampliamente descritos en el contexto del Long-COVID. Además, no se ha estudiado en profundidad si esta disfunción telomérica podría estar relacionada con algunos de los síntomas más frecuentes y limitantes, como el dolor musculoesquelético crónico en estos pacientes. Por ello, resulta de especial interés explorar esta posible conexión, ya que podría aportar información valiosa sobre los mecanismos moleculares subyacentes al Long-COVID y abrir nuevas líneas de investigación para su diagnóstico y tratamiento.

2. Hipótesis y objetivos

La hipótesis de este Trabajo Fin de Grado es que los pacientes diagnosticados con Long-COVID y dolor musculoesquelético crónico, muestran una longitud telomérica significativamente reducida en comparación con individuos sanos sin dicha condición. En consecuencia, el objetivo principal de este estudio es comparar la longitud telomérica entre pacientes con Long-COVID e individuos sanos y explorar la relación existente entre dicha longitud y el dolor crónico que manifiestan los pacientes. Para abordar este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el tipo, localización e intensidad del dolor musculoesquelético en una cohorte de pacientes con diagnóstico de Long-COVID, así como el impacto de dicho dolor en su calidad de vida.
- Optimizar la técnica de cuantificación de longitud telomérica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).
- Comparar la longitud telomérica promedio de pacientes con Long-COVID y dolor musculoesquelético crónico frente a la de un grupo control de personas sanas recuperadas de la COVID-19 sin síntomas persistentes.
- Analizar la relación entre la longitud de los telómeros y la expansión e intensidad del dolor musculoesquelético crónico presente en los pacientes con Long-COVID.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño del estudio:

Para llevar a cabo este Trabajo de Fin de Grado, el Laboratorio de Genómica Médica del Instituto de Investigación Biomédica y Terapias avanzadas (IBGM), en colaboración con la Unidad de Estrategias de Afrontamiento Activo del dolor crónico en Atención Primaria, ha desarrollado una línea de investigación centrada en la caracterización clínica y biológica de los pacientes Long-COVID con dolor musculoesquelético crónico, financiada por la Gerencia Regional de Salud y el Colegio profesional de Fisioterapeutas de Castilla y León. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de Investigación con Seres Humanos, bajo los códigos PI-GR-21-2393 y 22-PI040. Los estudios se llevaron a cabo siguiendo las directrices STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) (24).

El grupo de investigación disponía de una colección de muestras biológicas y datos clínicos de pacientes con diagnóstico de Long-COVID, procedentes de los centros de Atención primaria y de los dos hospitales públicos de Valladolid. También se recogieron datos y muestras de un grupo de voluntarios sanos de edades similares. Todos los participantes fueron reclutados entre mayo de 2022 y noviembre de 2023 mediante un proceso de participación voluntaria y no remunerada. Antes de la recogida de datos clínicos y muestras, todos los participantes firmaron un consentimiento informado (Anexo 1). A cada participante, se le extrajo una muestra de sangre periférica en un tubo con EDTA, la cual fue codificada, congelada y almacenada inmediatamente a -20ª en el IBGM.

3.2 Selección de casos y controles.

Para el desarrollo de este TFG se seleccionó una muestra de 40 mujeres diagnosticadas de Long-COVID, que presentaban dolor musculoesquelético crónico, junto con 25 mujeres sanas de edad comparable (Figura 3). Los criterios de inclusión y exclusión se detallan a continuación.

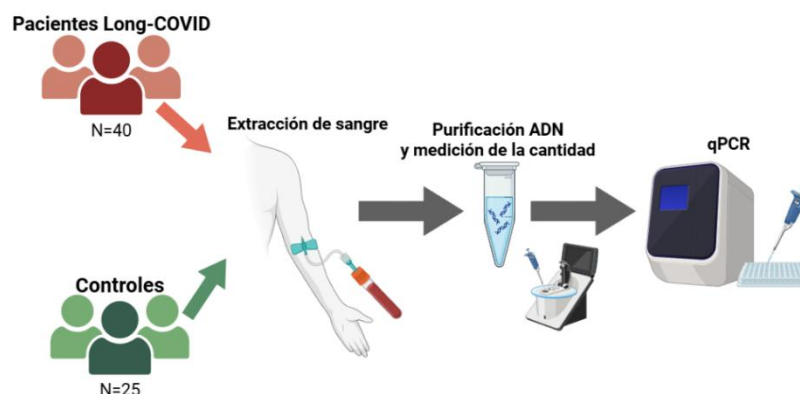


Figura 3. Resumen del procedimiento experimental llevado a cabo. Elaboración propia, creada con Biorrender.

Criterios de inclusión: las participantes debían ser mujeres de entre 18 y 70 años, que se hubieran infectado por el virus SARS-CoV-2 y que constara en su historial médico de atención primaria una prueba confirmatoria positiva (test de antígenos o reacción en cadena de la polimerasa, PCR). En el caso específico de las pacientes con Long-COVID, debían presentar dolor musculoesquelético persistente durante más de 12 semanas desde el inicio de la infección, el cual debía seguir presente al momento de la evaluación. Por el contrario, las participantes del grupo control no debían presentar ningún síntoma compatible con Long-COVID.

Criterios de exclusión: se excluyeron del estudio aquellas personas con antecedentes de dolor musculoesquelético crónico anterior a la COVID-19, siempre que este hubiera persistido por más de 12 semanas. También se excluyeron participantes con diagnóstico de trastorno depresivo mayor, fibromialgia, dolor oncológico, fractura vertebral o cirugía de columna en el último año, embarazo, incontinencia urinaria o fecal, anestesia en silla de montar, trastornos genéticos o enfermedades autoinmunes previas. Estos criterios de exclusión se aplicaron de forma uniforme a ambos grupos.

3.3 Variables clínicas y sociodemográficas.

La recogida de datos y valoración de los participantes, se realizó en la Unidad de Estrategias de Afrontamiento Activo para el Dolor en Atención Primaria de Valladolid. Se recogieron datos sociodemográficos, variables relacionadas con la infección por el virus SARS-CoV-2, comorbilidades, además de cuestionarios relacionados con la calidad de vida mediante la escala EuroQoL-5D (25), la ansiedad mediante el cuestionario de “*Anxiety Beck Inventory*” (26), depresión mediante el cuestionario “*Beck Depression Inventory*” (27) y variables relacionadas con el dolor, como la duración, la gravedad y la expansión del mismo (28–30). Todas las variables y escalas utilizadas se detallan en el anexo 2.

3.4 Extracción, purificación y cuantificación del ADN.

El ADN genómico fue extraído y purificado a partir de las muestras de sangre periférica congeladas, mediante el kit “*High Pure PCR Template Preparation Kit*” de Roche (método de columnas de sílice), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 4). El protocolo de extracción detallado se puede consultar en el anexo 3.

Una vez obtenido el ADN de cada muestra, se midió la concentración de ADN (ng/μl) utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop ONE thermo scientific*. Para evitar diferencias en los resultados debidas a la concentración de ADN de partida de cada muestra, se estandarizó la concentración de ADN de las muestras, por medio de una dilución con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración de 2 ng/μl en cada muestra.

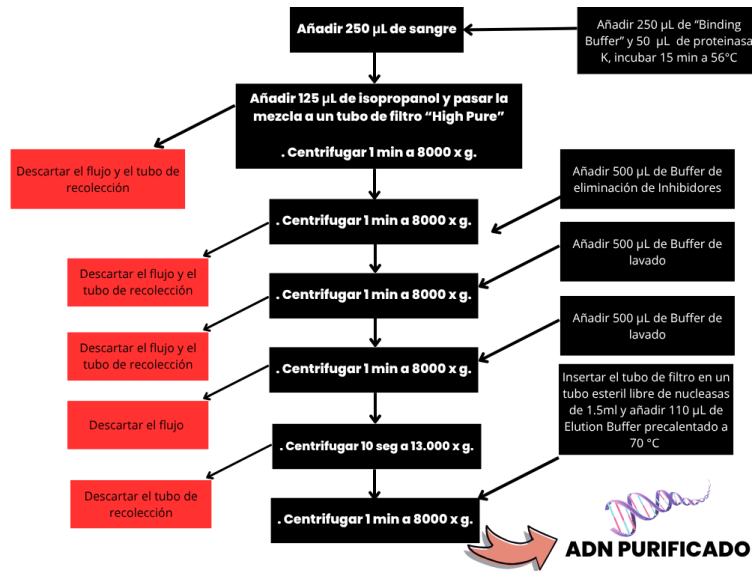


Figura 4. Protocolo de extracción del ADN. Elaboración Propia.

3.5 Cuantificación de la longitud telomérica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

La longitud telomérica de las 65 participantes incluidas en el estudio fue medida mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR), siguiendo una adaptación del protocolo original descrito por Richard M. Cawthon en 2002 (31).

Fundamento de la técnica

Esta técnica permite cuantificar con alta sensibilidad y reproducibilidad la cantidad de ADN en una muestra. Consiste en ciclos repetidos de desnaturalización del ADN, anillamiento de cebadores específicos (*primers*) y extensión por una ADN polimerasa termoestable, lo que permite la amplificación exponencial de la secuencia objetivo. La amplificación del ADN se monitorea en tiempo real mediante un fluoróforo. Como agente fluoróforo se utilizó el *SYBR Green* incluido en la mezcla comercial *SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. El *SYBR Green* se une con gran afinidad al ADN bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces, de manera que el *SYBR Green* unido al ADN, emite una señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de producto amplificado en cada ciclo. El punto de cuantificación en la qPCR es el ciclo umbral (CT), definido como el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia supere un umbral de detección preestablecido. Dado que el ADN amplificado se duplica aproximadamente cada ciclo durante la fase exponencial de la PCR, diferencias en el CT entre muestras reflejan diferencias en la cantidad inicial de ADN objetivo. Así, la qPCR permite realizar cuantificaciones relativas o

absolutas (32).

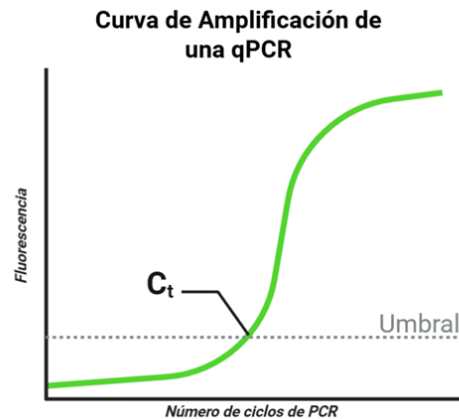


Figura 5. Esquema representativo del cálculo del ciclo umbral (Ct). Elaboración propia. Creada con Biorrender.

En este estudio, se optó por la cuantificación relativa debido a su simplicidad y bajo coste técnico (33), ya que no requiere estándares absolutos ni curvas externas (34). La qPCR relativa, permite conocer la longitud telomérica en una determinada muestra de ADN mediante su comparación con un ADN de referencia. Por tanto, no se obtiene una medida absoluta de la longitud telomérica en kilobases, sino que se obtiene una medida de **longitud telomérica relativa (rTL)**.

En el método utilizado por Richard. M Cawthon (31), la rTL se determina al comparar la amplificación de la secuencia repetitiva telomérica con la de un gen de referencia de copia única en la misma muestra, ya que, el gen de copia única, al presentar una expresión estable, compensa posibles variaciones en la cantidad y calidad del ADN entre muestras, lo que permite realizar mediciones más precisas de la longitud telomérica. El gen de referencia empleado fue el 36B4 (RPLP0) (33).

La secuencia de los *primers*, tanto para la región telomérica como para la región del gen 36B4 se detalla a continuación.

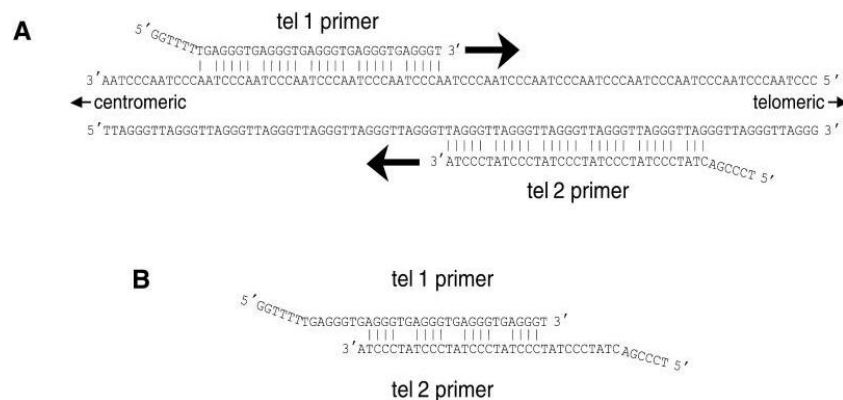


Figura 6. Lugares de anillado de los primers teloméricos utilizados en la qPCR. (tomado de Cawthon et al. 2002).

Tabla 1. Secuencia de bases de los primers utilizados en la qPCR.

Primer	Dirección	Secuencia (5'→3')
tel1	Forward	GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT
tel2	Reverse	TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA
36B4	Forward	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
36B4	Reverse	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

Todas las reacciones se llevaron a cabo en placas de qPCR utilizando el termociclador a tiempo real *Applied Biosystems QuantStudio 1* y siendo el programa de amplificación utilizado el que se expone en la figura 7.

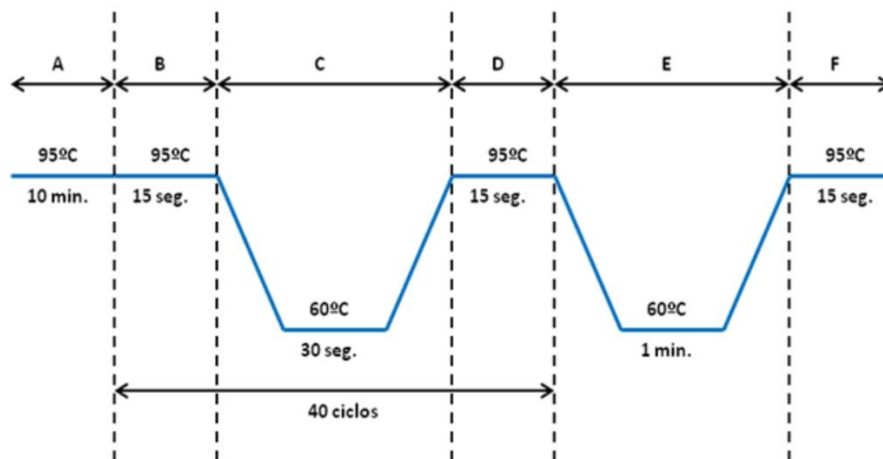


Figura 7. Esquema representativo del programa del termociclador para la cuantificación de telómeros mediante PCR a tiempo real cuantitativa relativa.

Puesta a punto de la qPCR

La eficiencia de la reacción de qPCR condiciona directamente la precisión y la reproducibilidad de la cuantificación, ya que pequeñas desviaciones respecto a la duplicación ideal en cada ciclo introducen sesgos en los cálculos relativos. En la qPCR, una eficiencia del 100% significa que, en cada ciclo de amplificación, la cantidad de ADN se duplica teóricamente (factor de amplificación = 2). Aunque a menudo se asume la eficiencia ideal (100%) para simplificar el análisis, pequeñas desviaciones (por ejemplo, de 2.00 a 1.97) pueden introducir errores significativos en la cuantificación relativa, por lo que es esencial poner a punto la técnica y establecer condiciones experimentales que garanticen una eficiencia cercana al 100% (35).

Por lo tanto, con el objetivo de optimizar el protocolo de qPCR para la cuantificación de la longitud telomérica relativa (rTL), se llevaron a cabo distintas pruebas dirigidas a ajustar las condiciones de

amplificación, evaluar la eficiencia de la reacción y verificar la especificidad de los productos obtenidos. La estandarización de estos parámetros fue esencial para asegurar la precisión, reproducibilidad y sensibilidad del método.

Optimización de concentraciones de *primers* para la región telomérica.

Dada la diversidad encontrada en la literatura respecto a la concentración de *primers* específicos de la región telomérica y con el fin de valorar si dichas concentraciones podrían afectar a la eficiencia de la PCR, se probaron tres combinaciones de concentraciones de cebadores para los telómeros. Todas las concentraciones de *primers* se probaron por duplicado para asegurar la validez interna del experimento. Las concentraciones probadas fueron:

- 270 nM (*forward*) y 900 nM (*reverse*), según la metodología descrita por Richard M. Cawthon (31).
- 250 nM (*forward*) y 580 nM (*reverse*), según la tesis de Pérez Rivera (36).
- 500 nM (*forward y reverse*), siendo esta la concentración estándar empleada en el laboratorio.

Para la prueba se utilizaron 5 ng totales de ADN que procedían de un pool de ADN generado a partir del ADN de todos los pacientes y controles incluidos en el estudio, en un volumen final de reacción de 10 µl. El resto de los reactivos utilizados en cada reacción de amplificación fueron: 5 µl de *SYBR Green® Master Mix* y 1,5 µl de agua libre de nucleasas. Los datos de fluorescencia de cada pocillo de reacción fueron exportados y posteriormente analizados con el programa *LinRegPCR*. Este software permite calcular la eficiencia individual de cada pocillo mediante un análisis lineal de la fase exponencial de la amplificación, generando valores precisos de eficiencia para cada curva de amplificación. Una vez realizada la prueba se escogió la concentración de *primers* para la cual la eficiencia de la reacción era más próxima al 100%.

Evaluación del efecto de la concentración de ADN.

Para determinar el rango óptimo de trabajo se realizó una dilución seriada (1:5) a partir del mismo pool de ADN, partiendo de una concentración inicial de 4 ng/µl, hasta alcanzar una concentración de 0.03 ng/µl, con un total de 8 puntos de dilución. Al igual que en la prueba anterior, cada reacción de amplificación, una para la secuencia de telómeros y otra para el gen *36B3*, se hizo por duplicado, y constó de un volumen final de reacción de 10 µl: 5 µl de *SYBR Green® Master Mix*, 1 µl de la mezcla del primer *forward y reverse* (500nM), 1,5 µl de agua libre de nucleasas y 2,5 µl del ADN a diferentes concentraciones.

Los datos de fluorescencia de cada pocillo de reacción fueron exportados y posteriormente analizados con el programa *LinRegPCR*. Estas diluciones permitieron evaluar la eficiencia de la qPCR en función del ADN presente en la reacción, lo que resultó determinante para establecer una concentración de trabajo uniforme, escogiendo finalmente la concentración de ADN para la cual la eficiencia de la reacción era más próxima al 100%.

Confirmación de la especificidad de los amplicones.

Para comprobar que la amplificación era específica y no existían productos inespecíficos ni dímeros de *primers*, se realizaron dos estrategias complementarias: una **electroforesis en gel de agarosa** para comprobar si los *primers* específicos de la región telomérica y del 36B4 tenían el tamaño esperado y un **análisis de curvas de disociación (*melting curves*)** para excluir la presencia de contaminantes o productos secundarios de amplificación.

Cuantificación de la longitud de los telómeros en los participantes.

Una vez optimizadas las condiciones de la PCR, cada muestra de cada paciente y control fue analizada mediante dos reacciones independientes en pocillos separados: una para la amplificación de secuencias teloméricas y otra para la del gen de referencia 36B4. Para cada una de estas reacciones se realizaron tres réplicas técnicas, lo que permitió evaluar la consistencia de los resultados y minimizar el impacto de posibles errores de pipeteo u otras fuentes de variación técnica dentro del mismo experimento. También se introdujeron en las placas, controles negativos en los que se incluían todos los componentes de la reacción a excepción del ADN, asegurando así la ausencia de contaminación en las reacciones de amplificación. Cada reacción de amplificación constó de un volumen final de 10 µl y estuvo compuesta por los siguientes elementos (tabla 2):

Tabla 2. Cantidades relativas de cada uno de los componentes de la reacción en función del fragmento de ADN a amplificar.

Reactivos	Amplificación telomérica	Amplificación de 36b4
<i>SYBR Green® Master Mix</i>	5 µl	5 µl
<i>Primers forward + reverse</i> (5 µM)	1 µl	1 µl
Agua libre de nucleasas	1.5 µl	1.5 µl
ADN (2 ng/µl)	2.5 µl (5 ng)	2.5 µl (5 ng)

El resultado final la longitud telomérica se calculó mediante el Método “E”, que permite calcular la **rTL** de cada muestra teniendo en cuenta la eficiencia individual de la reacción de amplificación de dicha muestra. Los pasos para obtener la rTL se detallan a continuación:

1º) Obtención de los Ciclos Umrales para cada diana en cada muestra: tras hacer las diferentes qPCRs para cubrir todas las muestras del estudio, se obtuvieron los Cts (ciclos umrales) de cada muestra para ambas dianas de amplificación (telómeros y 36B4) utilizando el programa informático *QuantStudio Design Analysis Software*. Este programa determinó el Ct de cada muestra a partir del promedio de los Cts de los triplicados válidos para cada muestra y cada diana. El umbral de detección se fijó a 39.000.000 unidades de fluorescencia para ambas dianas en todas las placas. Al usar un mismo nivel de fluorescencia como umbral para todas las muestras y dianas, se asegura que el ciclo umbral (Ct) se determine en la misma fase de amplificación (fase exponencial) en cada reacción. Esto evita que pequeñas variaciones en la posición del umbral introduzcan sesgos sistemáticos que afecten a la comparación entre la cantidad del gen de interés y de referencia de partida en la muestra.

2º) Cálculo de la eficiencia individual: las eficiencias de cada muestra individual se obtuvieron mediante el programa *LinRegPCR*.

3º) Cálculo del ratio T/S (Telómeros/*Single copy gene* = 36B4)

$$T/S(\text{muestra}) = [(E_{tel})^{Ct\ tel(\text{muestra})} / (E_{36B4})^{Ct\ 36B4(\text{muestra})}]^{-1}$$

Donde: E_{tel} es la eficiencia de la amplificación de telómeros en esa muestra y E_{36B4} es la eficiencia de la amplificación del gen 36B4 en esa muestra.

4º) Conversión a longitud telomérica relativa (rTL): el ratio T/S de cada muestra se relativiza frente a un grupo calibrador, en este caso el grupo control. Para ello: se dividió el ratio T/S de la muestra individual entre el ratio T/S de los controles.

3.6 Estadística:

Se realizó un análisis descriptivo de las variables demográficas y clínicas de las pacientes incluidas en el estudio. La normalidad de las variables cuantitativas se analizó con el test de Shapiro-Wilk. Si las variables seguían una distribución normal, se expresaron como media y desviación estándar, y se compararon mediante pruebas paramétricas t de Student. En caso contrario, se expresaron como mediana y rango intercuartílico, y se compararon mediante pruebas no paramétricas como el test U de Mann-Whitney. Las variables cualitativas se expresaron con porcentajes y sus respectivos intervalos de confianza del 95%, y se compararon mediante la prueba de chi-cuadrado.

La comparación de los valores de longitud relativa de telómeros (rTL) entre las pacientes con Long-COVID y los controles se realizó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, dado que los datos no seguían una distribución normal. Asimismo, dentro del grupo de mujeres con Long-COVID, se empleó el mismo test estadístico para comparar los valores de rTL en función de la

presencia de dolor generalizado y de su intensidad. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics (versión 30). El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Caracterización clínica, sociodemográfica, psicosocial y del dolor en pacientes con Long-COVID.

Respecto a las variables sociodemográficas (tabla 3), las pacientes diagnosticadas de Long-COVID mostraban mayores tasas de desempleo y un nivel educativo más bajo que los controles sanos.

Tabla 3. Características sociodemográficas de la muestra.

Características Sociodemográficas	Controles (n=25)	Casos (n=40)	p-valor
Edad (años)	47.08±7.45	48.55±7.045	0.426
Tiene Empleo	24 (96%)	14 (35%) *	<0.001
Nivel educativo			
Sin estudios o primaria	0 (0%)	4 (10%) *	<0.001
Secundaria o formación técnica	3 (12%)	21 (52.5%) *	
Educación superior	22 (88%)	15 (37.5%) *	
Estado civil			
Soltera	2 (8%)	22(8%)	0.741
Casada	20 (80%)	18 (72%)	
Separada	3 (12%)	4 (16%)	
Viuda	0 (0%)	1 (4%)	
Vive sola	1 (4%)	2 (8%)	0.522

Los valores se expresan como n (%) y mediana [rango intercuartílico]. La edad se expresa como media±DE. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo control. #La severidad de COVID-19 se clasificó según los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

Respecto a la infección aguda por el virus SARS-Cov2 (tabla 4), se detectó una mayor incidencia de casos de Long-COVID en las tres primeras olas con respecto a la cuarta en adelante. Además, los casos también presentaban una mayor severidad de la infección aguda inicial y se observaron diferencias en las dosis de vacunación, siendo las mujeres del grupo control las que cuentan con un mayor número de dosis recibidas. No se ha encontrado una relación significativa entre el número de reinfecciones y el Long-COVID.

Tabla 4: Variables relacionadas con la fase aguda de la infección por SARS-CoV2.

Datos de infección COVID	Controles (n=25)	Casos (n=40)	p-valor
Ola de COVID-19 en la que se			
1 ^{era} -3 ^{era} Ola	4 (16%)	27 (67.5%) *	<0.001
4 ^a Ola en adelante	21 (84%)	13 (32.5%) *	
Severidad de la COVID-19			
Leve	21 (84%)	11 (27.5%) *	<0.001
Moderada	3 (12%)	24 (60%) *	
Severa	1 (4%)	5 (12.5%) *	
Veces infectado			
1 vez	18 (72%)	23 (57.5%)	0.617
2 veces o más	7 (28%)	17 (42.5%)	
Dosis de vacunación			
No vacunado	1 (4%)	4 (10%) *	0.038
1 dosis	2 (8%)	9 (22.5%) *	
2 dosis	7 (28%)	19 (47.5%) *	
3 dosis o más	15 (60%)	8 (20%) *	

Acerca de las características clínicas, las mujeres con Long-COVID presentaban un mayor IMC, mayor número de comorbilidades, no habiendo diferencias en sus hábitos tabáquicos (tabla 5).

Tabla 5: Características clínicas de la muestra.

Datos clínicos	Controles (n=25)	Casos (n=40)	p-valor
Índice de masa Corporal	23.93 [22.4, 27.2]	27.22 [23.67, 31.63]	0.027
Hábitos de consumo de			
Tabaco	12 (48%)	25 (62.5%)	0.490
No Fumadora	2 (8%)	3 (7.5%)	
Fumadora	11 (44%)	12 (30%)	
Comorbilidades			
Sin comorbilidades	20 (80%)	20 (50%) *	0.042
Una comorbilidad	5 (20%)	11 (27.5%) *	
Múltiples Comorbilidades	0 (0%)	9 (22.5%) *	

Por otro lado, tal y como refleja la tabla 6, las pacientes presentaban una intensidad media de 55 sobre 100 en la Escala Visual Analógica (EVA) en el momento de la valoración, y de 63 sobre 100 en las últimas cuatro semanas. Atendiendo a estos valores, el 8% presentaban una intensidad del dolor leve, el 60% una intensidad moderada y el 32% una intensidad severa del dolor.

Tabla 6. Distribución de las variables relacionadas con el dolor en los casos.

Características	Casos (n=40)
Intensidad de dolor actual (EVA)	55.00[46.0, 69.5]
Intensidad de dolor de 4 semanas de evolución (EVA)	63 [48.0, 73.5]
Presencia de dolor generalizado	20 (80%)
% total de áreas con dolor	55.1 [46.5, 65.5]
Meses que llevan con dolor	18.84±1.604
Depresión (BDI-II)	25.28±9.01
Ansiedad (BAI)	25 [16.5, 31]
Calidad de vida (EQ-5D)	40 [25, 50]

Los valores se expresan como n (%) y mediana [rango intercuartílico].

Sobre la distribución del dolor, el 80% presentaba dolor generalizado, siendo las regiones más frecuentemente afectadas los muslos (43%), la región lumbar (37.9%), las manos (35.4%), el cuello (34%), los pies (32%) y los brazos (31%). En promedio, el dolor se localizaba en 16 de las 29 áreas corporales evaluadas, lo que representa más del 50% del cuerpo. La mayoría describía el dolor como punzante y constante, no relacionado con el movimiento, predominantemente diurno, y con características de adormecimiento y hormigueo. La duración media del cuadro de dolor fue de 18.84 ± 8.0 meses.

Respecto a las variables psicosociales, el 30% de las pacientes mostraban niveles de ansiedad moderados, y el 45% un nivel de ansiedad grave. Además, el 42,5% presentaban depresión moderada y el 30% depresión grave. Finalmente, las pacientes puntuaron con una mediana de 40 sobre 100 su calidad de vida auto percibida.

4.2 Pruebas de eficiencia y puesta a punto de la qPCR para la cuantificación de la longitud telomérica relativa.

Aunque inicialmente se pensó que la eficiencia de la qPCR podía depender de las concentraciones de *primers* utilizados, los resultados de la prueba de eficiencias demostraron que esta variable tenía un impacto mínimo sobre la eficiencia de amplificación (anexo 4). Es por ello que finalmente se optó por utilizar la concentración de *primers* estándar que se emplean normalmente en laboratorio: 500 nM para los *primers forward* y *reverse* de telómeros y que coinciden con las concentraciones del gen de referencia. Sin embargo, a diferencia de los cebadores, la concentración de ADN molde tuvo un efecto considerable en la eficiencia de la reacción. De esta manera se estableció una cantidad de **5 ng de ADN** totales por reacción, compatible con un rendimiento eficiente y reproducible. Con estas condiciones, la eficiencia media obtenida para la amplificación de los telómeros fue de 1.73

(73%) y de 1.82 (82%) para el gen 36B4.

Por otro lado, la electroforesis gel de agarosa permitió observar la aparición de una banda con el tamaño esperado para los telómeros y el gen de referencia, de acuerdo con el estándar fijado por Richard M. Cawthon (31).

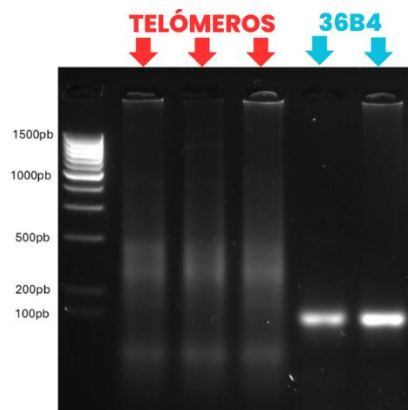


Figura 8. Gel de electroforesis realizado para comprobar el tamaño de los amplicones (el primer carril contiene el marcador de peso molecular, los carriles 2, 3 y 4 contienen a los amplicones de telómeros y los carriles 5 y 6 contienen a los amplicones del gen 36B4)

Además, en el análisis de curvas de disociación de cada una de las placas se detectó un único pico de disociación, indicando la presencia de un único amplicón específico y ausencia de contaminantes o productos secundarios, tanto en la reacción de amplificación de los telómeros como en la del gen de referencia 36B4 (Figura 9).

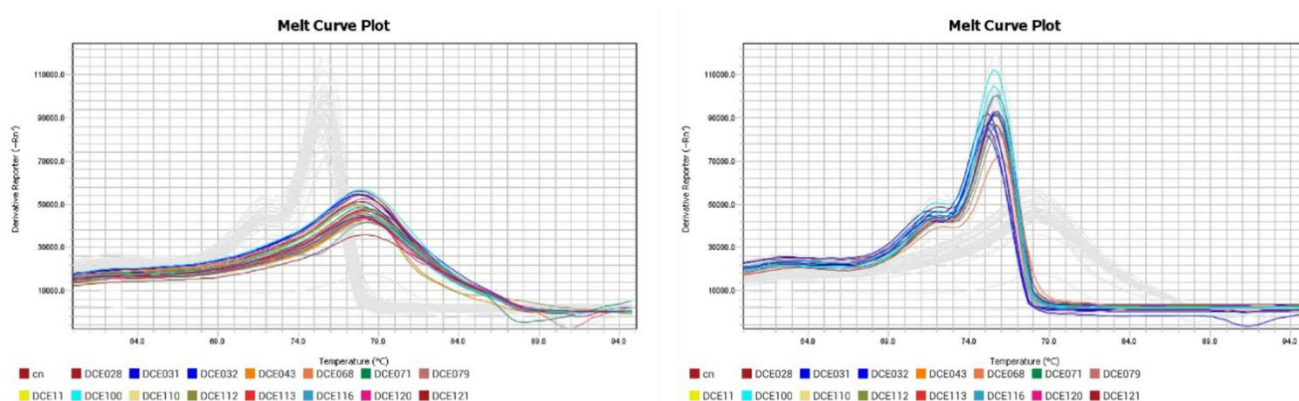


Figura 9. Ejemplo de las curvas de melting de la amplificación de los telómeros (izquierda) y del gen 36B4 (derecha) de 16 muestras de pacientes LONG-COVID.

4.3 Cuantificación Relativa de la Longitud Telomérica en pacientes y controles sanos.

Una vez fijadas las condiciones de la qPCR y evaluada la concentración y calidad de las muestras, se procedió a la cuantificación de la rTL de todas las ellas. Todas las muestras utilizadas en el estudio tenían una concentración óptima, con un ratio 260/280 cercano a 1,8 y 260/230 cercano a 2,0, por lo que todas ellas fueron incluidas en el análisis.

Tal y como se puede observar en la figura 11, las mujeres con Long-COVID mostraban niveles significativamente menores de la longitud telomérica relativa en comparación con el grupo control, con una mediana y rango intercuartílico de 0,33 [0,14 0,77] y 1,03 [0,46 1,43] respectivamente.

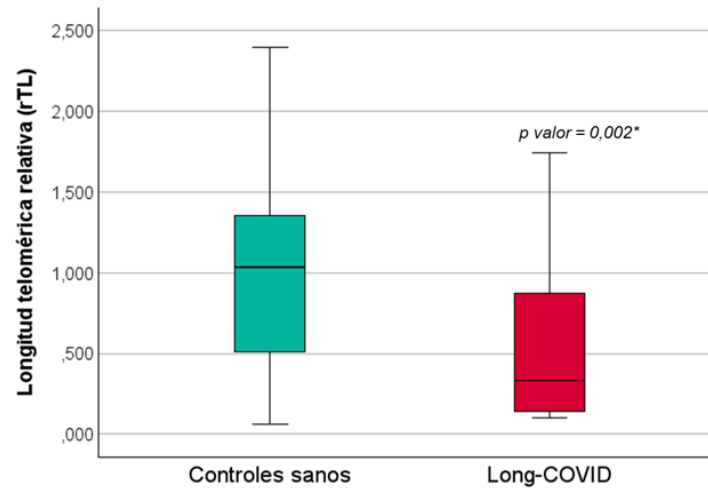


Figura 10. Diagrama de cajas que representa las diferencias en la rTL entre controles sanos y pacientes Long-COVID. Elaborado con IBM SPSS Statistics (versión 30).

Cuando se analizó la rTL en función de la de la intensidad del dolor en las pacientes Long-COVID se vio que, a pesar de que los valores eran inferiores en las mujeres con una intensidad severa respecto al leve/moderado, no se observaron diferencias significativas (figura 12). Tampoco se encontraron diferencias en los rTL en función de si las mujeres diagnosticadas de Long-COVID presentaban dolor generalizado o no. Tampoco se encontró una asociación significativa entre la rTL y la duración del dolor.

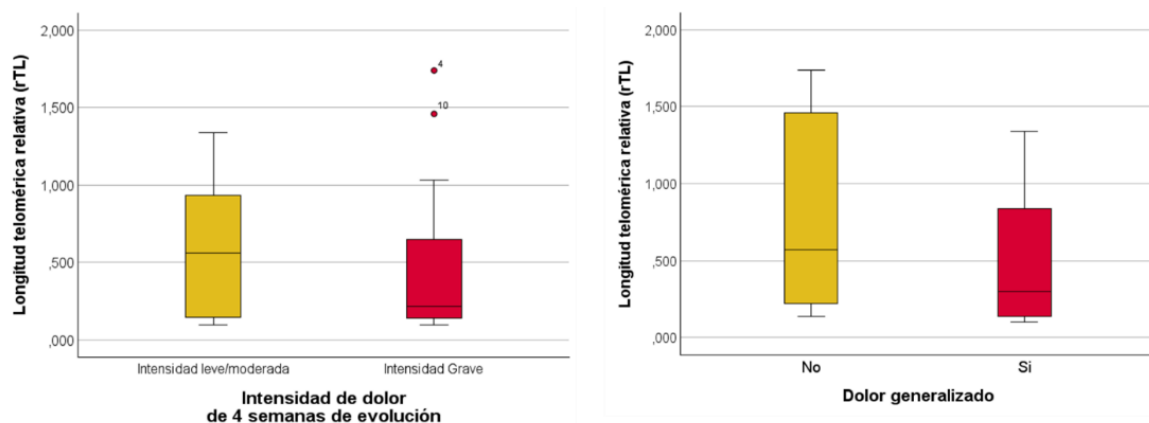


Figura 11. Diagramas de cajas en los que se representan la intensidad del dolor a las 4 semanas (izquierda) y dolor generalizado (derecha) frente a la rTL. Elaborado con IBM SPSS Statistics (versión 30).

5. Discusión

Este trabajo de fin de grado se planteó con varios objetivos fundamentales: caracterizar el dolor musculoesquelético crónico en una cohorte de pacientes Long-COVID, optimizar la técnica de cuantificación de longitud telomérica mediante qPCR, comparar la longitud telomérica relativa entre pacientes y controles sanos y explorar la posible relación entre el acortamiento telomérico y el dolor musculoesquelético crónico.

El hallazgo principal de esta investigación fue que las mujeres con Long-COVID y dolor musculoesquelético crónico presentaban una longitud telomérica significativamente reducida en comparación con mujeres sanas, sin síntomas persistentes tras la infección post-COVID, lo que sugiere la existencia de un proceso de envejecimiento celular acelerado vinculado al Long-COVID.

A pesar de que existen muy pocos estudios al respecto, los resultados que aquí se presentan concuerdan con los obtenidos en un estudio publicado por Andrea Polli *et al.* (2025), quienes en una cohorte prospectiva de 358 pacientes con Long-COVID, también identificaron una reducción significativa de la longitud telomérica en células mononucleares periféricas (PBMCs) en comparación con controles sanos. Aunque la muestra de Polli *et al.* (2025) incluía principalmente pacientes con fatiga crónica post-COVID —y solo una parte de ellos presentaba dolor crónico—, sus hallazgos refuerzan la asociación entre el acortamiento telomérico y la persistencia de síntomas en el Long-COVID. En su estudio, la longitud de los telómeros, junto con los niveles de troponina T, se identificaron como marcadores biológicos relevantes vinculados a fenotipos de fatiga y disfunción inmunitaria, durante el seguimiento entre 4 y 12 meses post-infección. En conjunto, ambos estudios apuntan a una posible implicación de mecanismos de envejecimiento celular en la fisiopatología de los síntomas persistentes del Long-COVID, aunque en poblaciones con perfiles clínicos parcialmente distintos (37). Estos resultados también demuestran la consecución de uno de los objetivos de este estudio, implementar con éxito un protocolo de qPCR robusto y reproducible para medir la longitud telomérica relativa en leucocitos de sangre periférica.

Existe, por el contrario, un estudio realizado en Río de Janeiro en 2025, donde tras comparar la longitud relativa de telómeros leucocitarios y la actividad de la telomerasa entre pacientes con Long-COVID y controles sanos, hallaron telómeros más largos y mayor actividad en los primeros. No obstante, este estudio presenta limitaciones metodológicas significativas: una muestra reducida (34 casos para longitud telomérica y solo 4 para actividad de telomerasa) sin cálculo de potencia previo; uso de controles prepandémicos que pueden generar “*batch effects*” en la qPCR; ausencia de ajuste por edad y sexo, etc... Estas debilidades podrían explicar la discrepancia con los resultados obtenidos en este trabajo (38).

Una fortaleza del estudio que aquí se presenta, es la naturaleza de la cohorte analizada, constituida

exclusivamente por mujeres de mediana edad. Ambas características, edad y género femenino, se han descrito como factores de riesgo para desarrollar Long-COVID (39,40). Además, se ha priorizado que las participantes presentaran dolor musculoesquelético, uno de los síntomas más relevantes, limitantes y persistentes de esta enfermedad, con un impacto significativo sobre la calidad de vida y la funcionalidad de las pacientes (41). La elección de esta cohorte responde, por tanto, a la necesidad de centrar la investigación en un subgrupo clínicamente relevante, no solo por su elevada susceptibilidad al síndrome post-COVID, sino también por la relevancia del dolor musculoesquelético como componente central del cuadro clínico.

En cuanto a la caracterización del dolor en el grupo de pacientes, el 64% presentaba una intensidad de dolor moderada-severa en las últimas 4 semanas. Además, el 80% de ellas presentaban una distribución del dolor generalizada en todo el cuerpo, con afectación predominantemente en muslos, región lumbar, manos, cuello, pies y brazos. Asimismo, presentaban niveles de ansiedad y depresión moderados-severos, y una baja calidad de vida auto percibida.

Relacionado con el dolor post-COVID, encontramos también una escasez de estudios específicos. No obstante, a pesar de esta limitación, nuestros hallazgos en relación con la caracterización del dolor en pacientes Long-COVID se alinean con lo reportado por Khoja et al. (2024), donde se describe el dolor musculoesquelético post-covid de nuevo inicio (*new-onset*) como un dolor generalizado, continuo y predominantemente articular. Este dolor se asocia con signos clínicos y sensoriales de sensibilización central, un perfil proinflamatorio persistente, debilidad muscular, disfunción física, así como con una afectación del estado de ánimo (ansiedad y depresión) y una notable disminución en la calidad de vida (42).

Curiosamente, este cuadro de dolor que presentan las pacientes Long-COVID se asemeja en gran medida a otro tipo de patologías, como es la fibromialgia o el síndrome de fatiga crónica. En estudios sobre pacientes con fibromialgia y acortamiento telomérico, se ha visto que el dolor de fibromialgia correlaciona inversamente con la longitud telomérica relativa (40). Esto concuerda con el mecanismo propuesto de que el dolor sostenido actúa como estrés biológico continuo, acelerando el envejecimiento celular. En el contexto de Long-COVID, este vínculo cobra importancia: los síntomas de dolor y fatiga persistente podrían ser tanto causa como consecuencia de una senescencia prematura. El dolor crónico genera inflamación sistémica y estrés oxidativo, factores que aceleran la erosión de telómeros. Así, las pacientes con Long-COVID que reportan dolor musculoesquelético intenso podrían estar experimentando un “envejecimiento biológico” acelerado que se refleja en sus telómeros cortos. Esto explicaría por qué en estudios como Polli et al. (2025), se exhibe también una longitud telomérica reducida (37).

Como principales limitaciones cabe destacar el reducido tamaño muestral —si bien es superior al

de estudios previos—, que limita la solidez de las conclusiones basadas exclusivamente en nuestros datos. Asimismo, dado que se trata de un área emergente con escasa bibliografía, resulta necesario llevar a cabo estudios con cohortes de mayor tamaño. Finalmente, en este trabajo de fin de grado no se aborda directamente la relación entre la longitud telomérica y marcadores de estrés oxidativo, inflamación o actividad de la telomerasa, aspectos que deberían incorporarse en futuros estudios para profundizar en los mecanismos subyacentes. Incorporar estos parámetros permitiría no solo establecer correlaciones más sólidas entre el acortamiento telomérico y procesos biológicos clave en el Long-COVID, sino también identificar vías de intervención terapéutica que modulen el envejecimiento celular y la respuesta inmunitaria de los pacientes a largo plazo.

6. Conclusiones

- Las mujeres Long-COVID con dolor musculoesquelético crónico presentaron una longitud telomérica relativa significativamente menor en comparación con el grupo control sin síntomas persistentes, lo cual apunta a un posible envejecimiento celular acelerado en este grupo, probablemente mediado por procesos inflamatorios y estrés oxidativo derivados de la infección y del dolor mantenido.
- Además del acortamiento telomérico, las pacientes Long- COVID presentan un perfil clínico y psicosocial desfavorable. El 80% de las pacientes mostraron un patrón de dolor generalizado, con una intensidad del dolor moderada-severa, una baja calidad de vida auto percibida, además de niveles moderados-severos de ansiedad y depresión. Todo ello refleja el alto grado de carga emocional y cognitiva asociado al dolor crónico post-COVID. En conjunto, estos hallazgos subrayan la necesidad de abordar de manera integral no solo los síntomas físicos, sino también el componente psicológico para optimizar el manejo terapéutico de estas pacientes.
- Se ha conseguido optimizar y poner a punto con éxito la técnica de qPCR para la cuantificación de longitud telomérica, estableciendo un protocolo robusto y reproducible que constituye una base fiable para posteriores investigaciones en el contexto del Long-COVID.
- Finalmente, este estudio aporta información valiosa sobre la relación entre Long-COVID y el acortamiento telomérico en mujeres con dolor musculoesquelético crónico, un ámbito aún poco explorado. Aunque la longitud telomérica no es específica para el diagnóstico, su inclusión en un panel de biomarcadores —junto con indicadores de inflamación, estrés oxidativo y parámetros funcionales— podría mejorar la estratificación del riesgo y la monitorización de la respuesta al tratamiento en estos paciente. Estos resultados subrayan la necesidad de futuros estudios con tamaños muestrales mayores y diseños longitudinales que integren análisis multivariantes para validar su aplicabilidad clínica, para optimizar el manejo terapéutico de estas pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Boix V, Merino E. Síndrome post-COVID. El desafío continúa. *Med Clínica*. 25 de febrero de 2022;158(4):178-80.
2. Overview | COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19 | Guidance | NICE [Internet]. NICE; 2020 [citado 29 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng188>
3. Scholkmann F, May CA. COVID-19, post-acute COVID-19 syndrome (PACS, “long COVID”) and post-COVID-19 vaccination syndrome (PCVS, “post-COVIDvac-syndrome”): Similarities and differences. *Pathol - Res Pract*. 1 de junio de 2023;246:154497.
4. Post COVID-19 condition (Long COVID) [Internet]. [citado 30 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/post-covid-19-condition>
5. Chow NKN, Tsang CYW, Chan YH, Telaga SA, Ng LYA, Chung CM, et al. The effect of pre-COVID and post-COVID vaccination on long COVID: A systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 1 de diciembre de 2024;89(6):106358.
6. COVID-19 long-term sequelae: Omicron versus Alpha and Delta variants - PMC [Internet]. [citado 11 de mayo de 2025]. Disponible en: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9970656/?utm_source=chatgpt.com
7. Evering TH, Moser C, Jilg N, Ritz J, Wohl DA, Li JZ, et al. Post-acute COVID-19 outcomes including participant-reported long COVID: amubarvimab/romlusevimab versus placebo in the ACTIV-2 trial. *eClinicalMedicine* [Internet]. 1 de septiembre de 2024 [citado 11 de mayo de 2025];75. Disponible en: https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370%2824%2900366-3/fulltext?utm_source=chatgpt.com
8. True prevalence of long-COVID in a nationwide, population cohort study | Nature Communications [Internet]. [citado 11 de mayo de 2025]. Disponible en: https://www.nature.com/articles/s41467-023-43661-w?utm_source=chatgpt.com
9. Davis HE, McCorkell L, Vogel JM, Topol EJ. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nat Rev Microbiol*. marzo de 2023;21(3):133-46.
10. Gheorghita R, Soldanescu I, Lobiuc A, Caliman Sturdza OA, Filip R, Constantinescu – Bercu A, et al. The knowns and unknowns of long COVID-19: from mechanisms to therapeutical approaches. *Front Immunol* [Internet]. 4 de marzo de 2024 [citado 26 de junio de 2025];15. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1344086/full>
11. Lopez-Leon S, Wegman-Ostrosky T, Perelman C, Sepulveda R, Rebolledo PA, Cuapio A, et al. More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 9 de agosto de 2021;11(1):16144.
12. Aiyegbusi OL, Hughes SE, Turner G, Rivera SC, McMullan C, Chandan JS, et al. Symptoms, complications and management of long COVID: a review. *J R Soc Med*. septiembre de 2021;114(9):428-42.
13. Komaroff AL, Lipkin WI. ME/CFS and Long COVID share similar symptoms and biological abnormalities: road map to the literature. *Front Med* [Internet]. 2 de junio de 2023 [citado 26 de junio de 2025];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2023.1187163/full>
14. Chen B, Julg B, Mohandas S, Bradfute SB, RECOVER Mechanistic Pathways Task Force. Viral persistence, reactivation, and mechanisms of long COVID. Iqbal J, Zaidi M, editores. *eLife*. 4 de mayo de 2023;12:e86015.

15. Lai YJ, Liu SH, Manachevakul S, Lee TA, Kuo CT, Bello D. Biomarkers in long COVID-19: A systematic review. *Front Med*. 20 de enero de 2023;10:1085988.
16. Gold JE, Okyay RA, Licht WE, Hurley DJ. Investigation of Long COVID Prevalence and Its Relationship to Epstein-Barr Virus Reactivation. *Pathogens*. junio de 2021;10(6):763.
17. Michalak KP, Michalak AZ, Brenk-Krakowska A. Acute COVID-19 and LongCOVID syndrome – molecular implications for therapeutic strategies - review. *Front Immunol* [Internet]. 17 de abril de 2025 [citado 26 de junio de 2025];16. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2025.1582783/full>
18. Zhang J, Rane G, Dai X, Shanmugam MK, Arfuso F, Samy RP, et al. Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing Res Rev*. enero de 2016;25:55-69.
19. Correia-Melo C, Hewitt G, Passos JF. Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? *Longev Heal*. 16 de enero de 2014;3:1.
20. Blackburn EH. Telomeres and Telomerase: The Means to the End (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed*. 2010;49(41):7405-21.
21. Oxidative stress shortens telomeres - PubMed [Internet]. [citado 9 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12114022/>
22. In vitro proinflammatory gene expression predicts in vivo telomere shortening: A preliminary study - PubMed [Internet]. [citado 9 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29980010/>
23. Virseda-Berdices A, Behar-Lagares R, Martínez-González O, Blancas R, Bueno-Bustos S, Brochado-Kith O, et al. Longer ICU stay and invasive mechanical ventilation accelerate telomere shortening in COVID-19 patients 1 year after recovery. *Crit Care*. 7 de agosto de 2024;28:267.
24. STROBE [Internet]. [citado 26 de junio de 2025]. Checklists. Disponible en: <https://www.strobe-statement.org/checklists/>
25. Fernández-de-las-Peñas C, Rodríguez-Jiménez J, Moro-López-Menchero P, Cancela-Celleruelo I, Pardo-Hernández A, Hernández-Barrera V, et al. Psychometric properties of the Spanish version of the EuroQol-5D-5L in previously hospitalized COVID-19 survivors with long COVID. *Sci Rep*. 23 de julio de 2022;12(1):12605.
26. Magán I, Sanz J, García-Vera MP. Psychometric properties of a Spanish version of the Beck Anxiety Inventory (BAI) in general population. *Span J Psychol*. noviembre de 2008;11(2):626-40.
27. Steer RA, Ball R, Ranieri WF, Beck AT. Dimensions of the Beck Depression Inventory-II in clinically depressed outpatients. *J Clin Psychol*. enero de 1999;55(1):117-28.
28. Bijur PE, Silver W, Gallagher EJ. Reliability of the visual analog scale for measurement of acute pain. *Acad Emerg Med Off J Soc Acad Emerg Med*. diciembre de 2001;8(12):1153-7.
29. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics [Internet]. [citado 15 de mayo de 2025]. Disponible en: <https://icd.who.int/browse/2025-01/mms/en#849253504>
30. Southerst D, Côté P, Stupar M, Stern P, Mior S. The reliability of body pain diagrams in the quantitative measurement of pain distribution and location in patients with musculoskeletal pain: a systematic review. *J Manipulative Physiol Ther*. septiembre de 2013;36(7):450-9.
31. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 15 de mayo de 2002;30(10):e47.
32. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. marzo de 2005;5(2):209-19.

33. Vasilishina A, Kropotov A, Spivak I, Bernadotte A. Relative Human Telomere Length Quantification by Real-Time PCR. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;1896:39-44.
34. Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K, et al. Telomere Length: A Review of Methods for Measurement. *Nurs Res*. 2014;63(4):289-99.
35. Boulter N, Suarez FG, Schibeci S, Sunderland T, Tolhurst O, Hunter T, et al. A simple, accurate and universal method for quantification of PCR. *BMC Biotechnol*. 9 de marzo de 2016;16:27.
36. Pérez Rivera JÁ. Aplicación de la longitud telomérica y los polimorfismos de la telomerasa en el estudio de los pacientes con síndrome coronario agudo [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de Salamanca; 2013 [citado 17 de junio de 2025]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=85944>
37. Polli A, Godderis L, Martens DS, Patil MS, Hendrix J, Wyns A, et al. Exploring DNA methylation, telomere length, mitochondrial DNA, and immune function in patients with Long-COVID. *BMC Med*. 4 de febrero de 2025;23(1):60.
38. Dos Reis GG, Silvestre RT, Alves G, Delmonico L, Chantre-Justino M, Moreira ADS, et al. Leukocyte telomere length and telomerase activity in Long COVID patients from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2025;120:e240129.
39. Subramanian A, Nirantharakumar K, Hughes S, Myles P, Williams T, Gokhale KM, et al. Symptoms and risk factors for long COVID in non-hospitalized adults. *Nat Med*. agosto de 2022;28(8):1706-14.
40. Dessie ZG, Zewotir T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis*. 21 de agosto de 2021;21(1):855.
41. Fernández-de-Las-Peñas C, de-la-Llave-Rincón AI, Ortega-Santiago R, Ambite-Quesada S, Gómez-Mayordomo V, Cuadrado ML, et al. Prevalence and risk factors of musculoskeletal pain symptoms as long-term post-COVID sequelae in hospitalized COVID-19 survivors: a multicenter study. *Pain*. 1 de septiembre de 2022;163(9):e989-96.
42. Khoja O, Silva-Passadouro B, Cristescu E, McEwan K, Doherty D, O'Connell F, et al. Clinical Characterization of New-Onset Chronic Musculoskeletal Pain in Long COVID: A Cross-Sectional Study. *J Pain Res*. 2024;17:2531-50.
43. Penley JA, Wiebe JS, Nwosu A. Psychometric Properties of the Spanish Beck Depression Inventory-II in a Medical Sample. *Psychol Assess*. 2003;15(4):569-77.

APÉNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

IBGM: Instituto de Investigación Biomedicina y Genética Molecular – Centro de investigación responsable del estudio.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa – Técnica de biología molecular para amplificar fragmentos de ADN.

qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real – Variante de PCR que permite cuantificar ADN en cada ciclo mediante fluorescencia.

Ct: Ciclo umbral (Threshold cycle) – Número de ciclos necesarios para que la fluorescencia supere un umbral preestablecido.

SYBR: SYBR® Green PCR Master Mix – Mezcla comercial que contiene el agente fluorescente SYBR Green para detección de ADN bicatenario.

rTL: Longitud telomérica relativa – Medida comparativa de la longitud de los telómeros, calculada respecto al gen de referencia.

BAI: Beck Anxiety Inventory – Inventario de Ansiedad de Beck, cuestionario de 21 ítems para evaluar gravedad de la ansiedad.

VAS: Escala Visual Analógica (Visual Analog Scale) – Línea de 100 mm para que el paciente marque la intensidad del dolor que siente.

ICD-11: Clasificación Internacional de Enfermedades, 11ª edición – Sistema de codificación de enfermedades

PASC: Post-Acute Sequelae of SARS-CoV-2 – Secuelas post-agudas de la infección por SARS-CoV-2.

PCC: Post-COVID Condition – Término en inglés para “condición post-COVID”.

SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 – Virus causante de la enfermedad COVID-19.

36B4 (RPLP0): Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0 – Gen de copia única empleado como referencia en qPCR.

EQ-5D: EuroQoL-5D – Escala de calidad de vida de 5 dimensiones.

CÓDIGO

ANEXOS

Anexo 1. Documento de Consentimiento informado

 Avda. Ramón y Cajal, 3 - 47003 Valladolid Tel.: 983 42 00 00 - Fax 983 25 75 11 gerente.hcuv@saludcastillayleon.es	DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID	 V.ABRIL-2020
--	--	---

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID

**SERVICIO / UNIDAD: UNIDAD DE ESTRATEGIAS DE AFRONTAMIENTO ACTIVO
PARA EL DOLOR CRÓNICO**

INVESTIGADOR RESPONSABLE: Federico Montero Cuadrado

TELÉFONO DE CONTACTO:

EMAIL:

**NOMBRE DE LA LÍNEA DE TRABAJO: DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DEL DOLOR MUSCULOESQUELÉTICO PERSISTENTE EN PACIENTES COVID-19 EN
ATENCIÓN PRIMARIA.**

VERSIÓN DE DOCUMENTO: (Número de versión, fecha): versión 1, 1-06-2021

I) Finalidad de la línea de trabajo propuesta:

Pedimos su colaboración en una investigación que se está liderando desde la Gerencia de Atención Primaria de Valladolid Este, Oeste y la Universidad de Valladolid. El objetivo del estudio es investigar sobre las características del dolor persistente en pacientes que hayan pasado el Covid-19. Actualmente no se llega a comprender los mecanismos neurofisiológicos y genéticos subyacentes al desarrollo del dolor persistente musculoesquelético postcovid. De ahí la necesidad de realizar este estudio.

En caso de participar en el estudio, tendrá que cumplimentar un conjunto de preguntas y cuestionarios, así como realizar una valoración de su condición física y permitir que le extraigamos una pequeña cantidad de sangre. Cumplimentará unas preguntas sobre su situación socio-demográfica y de salud, el cuestionario EQ-5D, la escala Tampa de Kinesiofobia, el Cuestionario de Catastrofismo, el Cuestionario de Ansiedad y Depresión, el Inventario de Sensibilización Central, la Escala de Gradación de Dolor Crónico y la Escala Visual Analógica. A continuación, se realizarán también pruebas de algometría para determinar el umbral doloroso a la presión y una prueba de fuerza manual con dinamómetro. Además, se realizará la prueba de la marcha de

6 minutos para valorar la capacidad aeróbica. Finalmente, se le solicitará la donación de una pequeña cantidad de sangre (10mL) en la que se realizarán diferentes determinaciones potencialmente relacionadas con su patología. De la misma muestra se extraerá DNA para estudios posteriores. Todas las variables se medirán en el mismo día del estudio. Los resultados de estos estudios ayudarán probablemente a diagnosticar y/o tratar de manera más precisa a los enfermos con una enfermedad como la suya.

II) Algunas consideraciones sobre su participación:

Es importante que Vd., como potencial donante de muestras, conozca varios aspectos importantes:

A) La donación de muestras es totalmente voluntaria.

B) Puede plantear todas las dudas que considere sobre su participación en este estudio.

C) Se solicita su autorización para la toma y uso en investigación biomédica de muestras de sangre periférica. En dichas muestras se obtendrán y/o analizarán marcadores inflamatorios y metabólicos y se extraerá ADN para generar una genoteca específica de la patología estudiada utilizando los métodos que el investigador principal considere necesarios para avanzar en la línea de trabajo arriba expuesta.

D) Se le tomará un volumen relativamente pequeño (**10 ml**) de sangre venosa mediante una punción en el brazo en toma única. La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días.

E) No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el donante.

F) Las muestras y los productos obtenidos de las mismas serán almacenados y custodiados en el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), lugar designado para este fin por el Investigador Principal del Estudio. La persona responsable de la custodia es el Dr. Juan José Tellería. La muestra quedará allí depositada de forma indefinida (siempre que no se haya consumido en su totalidad en el curso de los trabajos asociados a la misma). Si en dicho momento se propusiera el paso de las muestras a un Biobanco oficialmente reconocido, se le volverá a solicitar su consentimiento para ello.

G) Los datos personales serán tratados según lo dispuesto en la normativa que resulte de aplicación según el Reglamento (UE) 2016/679, de 27 de abril, General de Protección de datos, y su normativa de datos personales de desarrollo tanto a nivel nacional como europeo.

H) La información obtenida se almacenará en una base de datos, en soporte informático, registrada en la Agencia Española de Protección de Datos, según la legislación vigente.

I) Los datos registrados serán tratados estadísticamente de forma codificada. En todo momento el donante tendrá derecho de acceso, modificación, oposición, rectificación o cancelación de los datos depositados en la base de datos siempre que expresamente lo solicite. Para ello deberá ponerse en contacto con el investigador principal. Los datos quedarán custodiados bajo la responsabilidad del Investigador Principal del Estudio, **Dr. Federico Montero Cuadrado** Así mismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no queda satisfecho.

J) Las muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser utilizadas por el grupo del investigador principal en estudios futuros de investigación relacionados con la línea de trabajo arriba expuesta. Dichas muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser cedidas a otros investigadores designados por el Investigador Principal para trabajos relacionados con esta línea, siempre al servicio de proyectos que tengan alta calidad científica y respeto por los principios éticos. En estos dos últimos casos, se solicitará antes autorización al CEIm (Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos) Área de Salud Valladolid Éste.

K) La falta de consentimiento o la revocación de este consentimiento previamente otorgado no supondrá perjuicio alguno en la asistencia sanitaria que Vd. recibe/recibirá.

L) Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Vd. tiene derecho a conocerla y transmitirla a sus familiares si así lo desea.

M) Sólo si Vd. lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información asociada al estudio.

Anexo 2. Variables recogidas en el estudio:

Variables sociodemográficas

Edad (años), Índice de Masa Corporal (IMC), empleo, nivel educativo, estado civil, vivir sola o acompañada.

Variables relacionadas con la infección aguda

Ola de COVID-19 en la que se contagió, gravedad de la infección aguda de COVID-19, número de infecciones y número de dosis de vacunación.

Variables clínicas relevantes

Índice de masa corporal, hábitos de consumo de tabaco, presencia de comorbilidades.

Variables psicosociales

- La calidad de vida se evaluó utilizando la versión española del **cuestionario de calidad de vida EuroQoL-5D**, específicamente su subescala (**EQ-VAS, Visual Analogue Scale**) (25). Esta subescala forma parte del instrumento EuroQoL-5D y valora el estado de salud general auto percibido en una escala de 0 (peor estado de salud imaginable) a 100 (mejor estado de salud imaginable). Este cuestionario presenta una buena consistencia interna, fiabilidad test-retest y validez de constructo.
- **El Inventario de Depresión de Beck (BDI-II)** es un cuestionario auto reportado que evalúa la gravedad de la depresión del paciente. La escala consta de 21 preguntas relacionadas con síntomas de depresión como desesperanza e irritabilidad, culpa o sentimientos de castigo, síntomas físicos como fatiga, falta de interés por el sexo y pérdida de peso. Este sistema de escala Likert de 4 puntos, va de 0, que indica ausencia de deterioro, a 3, que indica deterioro grave. La puntuación total oscila entre 0 y 63 puntos. La versión española del cuestionario BDI-II ha demostrado una buena consistencia interna (alfa de Cronbach = 0,92) y fiabilidad test-retest (ICC = 0,93) (43).
- **El Inventario de Ansiedad de Beck (BAI)** es un cuestionario auto reportado de 21 ítems que evalúa la gravedad de la ansiedad. Cada ítem describe un síntoma común de ansiedad, y los encuestados valoran el grado en que se han visto afectados en una escala tipo Likert de 4 puntos, que va de 0 («nada») a 3 («me ha molestado mucho»). La puntuación total oscila entre 0 y 63, y las puntuaciones más altas indican una ansiedad más grave. La versión española del cuestionario BAI es ampliamente utilizado en entornos clínicos y de investigación debido a su gran fiabilidad, validez y capacidad para diferenciar entre los síntomas de ansiedad y depresión

(alfa de Cronbach = 0,93 y ICC = 0,84) (26).

Variables relacionadas con el dolor.

- **Intensidad del dolor (VAS):** la intensidad del dolor actual y a las 4 semanas se registró mediante una Escala Visual Analógica de 100 mm (VAS, por sus siglas en inglés). Esta escala registra en una línea de 10 cm la intensidad del dolor, representando en un extremo la ausencia del dolor y en el otro extremo el peor dolor imaginable. En ella, se le pide al paciente marcar con una “X” el punto que mejor refleje la intensidad de su dolor. Esta escala es ampliamente utilizada tanto en contexto clínicos como de investigación (28).
- **Dolor generalizado:** la presencia de dolor generalizado se evaluó según los criterios de la ICD-11 para “dolor primario generalizado” (MG30.01), que define este concepto como un dolor difuso que afecte en al menos 4 de 5 regiones corporales (29). Para su evaluación, se empleó un body chart o mapa corporal. Se indicó a los pacientes que marcaran las zonas donde sentían dolor pintando las áreas correspondientes en el body chart. Junto a ese body chart, se les proporcionó un listado con 29 regiones anatómicas, lo que les permitió identificar por su nombre aquellas áreas que habían pintado en la figura.
- **Porcentaje de áreas con dolor:** el porcentaje total de áreas corporales con dolor se calculó según las áreas corporales marcadas por los pacientes en el body chart. Estudios recientes resaltan que los body chart –incluso en formato digital– proporcionan una evaluación objetiva de la localización y extensión del dolor (30).
- **Duración del dolor:** se registró el número de meses durante los cuales las pacientes presentaron dolor musculoesquelético.

Anexo 3. Protocolo utilizado en la purificación del ADN

Introducción/ Principio de la técnica

La obtención de ADN genómico de alta calidad y pureza constituye un requisito esencial en numerosas aplicaciones de biología molecular, entre las que se incluye la PCR cuantitativa (qPCR). La presencia de contaminantes —proteínas, ARN y otros componentes celulares— puede inhibir la actividad de la polimerasa, alterar la eficiencia de amplificación y comprometer la reproducibilidad y exactitud de los resultados. Por ello, los métodos de purificación deben garantizar la remoción eficaz de inhibidores y la preservación de fragmentos de ADN íntegros.

El “High Pure PCR Template Preparation Kit” de Roche se basa en la tecnología de unión a matriz de sílice bajo condiciones caotrópicas para retener el ADN genómico y descartar contaminantes mediante lavados sucesivos. En este enfoque, la muestra se lisia con detergentes y proteasas (Proteinasa K), liberando el ADN intracelular; a continuación, el ADN se forma en complejos con el buffer de unión (alto contenido de guanidina) y se adsorbe a la membrana de sílice del cartucho. Mediante la adición de soluciones caotrópicas y alcoholes se facilita la precipitación y unión de los ácidos nucleicos, eliminando la necesidad de disolventes orgánicos. Posteriormente, se elimina contaminantes específicos (hemoglobina u otros inhibidores presentes en la sangre) mediante un buffer de eliminación de inhibidores, y se realizan lavados con soluciones acuosas/alcohólicas que remueven sales y compuestos solubles. Finalmente, el ADN se eluye en un volumen reducido de tampón de baja salinidad, obteniéndose un extracto listo para su cuantificación y uso en PCR u otras técnicas.

Materiales y reactivos

Incluidos en el kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche):

- Binding Buffer (tapa verde): 20 mL. Contiene 6 M guanidina-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl y 20% polidocanol (v/v).
- Proteinasa K (tapa rosa): Formato liofilizado, grado PCR. Se reconstituye antes de su uso para la lisis y la inactivación de DNAsas endógenas.
- Inhibitor Removal Buffer (tapa negra, vial 4a): 33 mL con 5 M guanidina-HCl y 20 mM Tris-HCl (pH 6.6); requiere la adición de 20 mL de etanol absoluto para alcanzar la concentración de trabajo.
- Wash Buffer (tapa azul, vial 4): 20 mL con 20 mM NaCl y 2 mM Tris-HCl (pH 7.5); requiere la adición de 80 mL de etanol absoluto para la concentración final.
- Elution Buffer (tapa incolora): 40 mL de 10 mM Tris-HCl (pH 8.5).
- Tubos de filtro “High Pure”: Cartuchos de polipropileno con membrana de sílice (doble capa de fieltro de fibra de vidrio), para volúmenes de hasta 700 µL.
- Tubos de recolección (2 mL): Para recoger el eluido durante centrifugación.

Nota: Todas las soluciones, salvo el Binding Buffer, presentan aspecto claro.

No incluidos en el kit (reactivos de laboratorio):

- Agua libre de nucleasas (pretratada con DEPC cuando se emplea para preparar tampones).
- Tampón PBS libre de DNAsas (preparado con agua tratada con DEPC, si procede).
- Isopropanol al 100%.
- Etanol absoluto.
- RNasa (opcional, para digestión de ARN si fuera necesario).
- Muestra biológica (en este caso, sangre completa).
- Material de laboratorio:
- Pipetas automáticas (P200, P1000) con puntas con filtro, estériles y libres de nucleasas.
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL estériles y libres de nucleasas.
- Tubos de recolección adicionales de 2 mL.
- Soporte para tubos de microcentrífuga.

Equipamiento:

- Centrífuga de sobremesa con rotor para tubos de 1.5 y 2 mL.
- Baño de agua o bloque térmico ajustable a 56 °C y 70 °C.
- Vortex.
- Cabina o área de trabajo libre de contaminantes y nucleasas.

Condiciones de limpieza y prevención de degradación

Todas las superficies, reactivos y material en contacto con las muestras deben estar libres de DNAsas y RNAsas. Se recomienda desinfectar mesadas, pipetas y frascos con lejía al 10%, seguida de lavado y secado adecuados. El agua usada para tampones debe tratarse con DEPC al 0,1% (incubación nocturna y autoclavado posterior) para inactivar nucleasas. Esta preparación debe realizarse con antelación suficiente (al menos dos ciclos de tratamiento) para garantizar la ausencia de contaminantes en los tampones y soluciones.

Resumen del procedimiento

1. Preparación de la muestra:

Pipetear 250 µL de sangre completa en un tubo de 1.5 mL. Si el volumen es inferior a 200 µL, completar con PBS libre de nucleasas; si es superior, ajustar proporcionalmente los volúmenes de reactivos.

2. Lisis y unión del ADN:

Añadir 250 μL de Binding Buffer y 50 μL de Proteinasa K (reconstituida). Mezclar inmediatamente. Incubar a 56 °C durante 15 minutos para lisis celular y desactivación de DNAsas endógenas. Durante este tiempo, precalentar el Elution Buffer a 70 °C.

3. Precipitación del ADN:

Añadir 125 μL de isopropanol y mezclar para homogeneizar. Esta etapa favorece la formación de complejos ADN-sílice.

4. Aplicación en la columna de sílice:

Transferir la mezcla al tubo de filtro (carga máxima $\sim 700 \mu\text{L}$, por lo que puede requerirse completar con parte de muestra hasta dicho volumen).

5. Centrifugación inicial:

Centrifugar 1 minuto a $8.000 \times g$. Desechar el filtrado y reemplazar el tubo de recolección.

6. Eliminación de inhibidores:

Añadir 500 μL de Inhibitor Removal Buffer (previamente preparado con etanol) al cartucho y centrifugar 1 minuto a $8.000 \times g$. Desechar el filtrado y renovar el tubo receptor.

7. Lavados sucesivos:

Realizar dos lavados con 500 μL de Wash Buffer preparado con etanol, centrifugando 1 minuto a $8.000 \times g$ en cada lavado. Desechar cada filtrado y reemplazar el tubo de recolección.

8. Eliminación de residuos de lavado:

Centrifugar el conjunto tubo de filtro en vacío (10 segundos a velocidad máxima, $\sim 13.000 \times g$) para eliminar trazas de tampones de lavado.

9. Elución del ADN:

Transferir el cartucho de sílice a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL libre de nucleasas. Añadir 110 μL de Elution Buffer precalentado a 70 °C y centrifugar 1 minuto a $8.000 \times g$. Recoger el eluido (aproximadamente 100–110 μL). Se puede optimizar el volumen de elución según la concentración deseada, prefiriendo volúmenes reducidos para obtener ADN más concentrado y, de ser necesario, diluir posteriormente.

10. Cuantificación y almacenamiento:

Medir la concentración y pureza del ADN en espectrofotómetro (Nanodrop): limpiar la lente antes de cada medición, realizar blanco con agua libre de nucleasas, luego medir la muestra (2 μL).

Registrar los resultados en hoja de cálculo. Almacenar el ADN purificado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o según recomendaciones específicas, evitando ciclos repetidos de congelación-descongelación.

Anexo 4. Resultados de eficiencias.

Eficiencias obtenidas a diferentes concentraciones de primers de telómeros usando el programa de análisis LinRegPCR.

Grupo de	Eficiencia	Desviación	Error estándar de	Error estándar
CAWTHON	1.73	0.104	0.037	0.021
CAWTHON	1.77	0.114	0.040	0.022
TESIS (1)	1.74	0.101	0.036	0.020
TESIS (2)	1.76	0.082	0.029	0.015
ESTÁNDAR	1.73	0.098	0.028	0.016
ESTÁNDAR	1.74	0.086	0.031	0.018