

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO



Scuola di dottorato:
Scienze Fisiopatologiche, Neuropsicobiologiche e
Assistenziali del Ciclo della Vita

Corso di dottorato:
XXVII ciclo

Dipartimento:
Dipartimento di scienze cliniche e di comunità

Leukocyte telomere length, telomerase activity and prevalence of age-related diseases in semisupercentenarians, centenarians and centenarians' offspring.

Settore scientifico disciplinare: Med/09 medicina interna

Tesi di dottorato di:
Dr. Enzo Tedone
Matricola n° R09514

Tutor: Chia.ma Prof.ssa Daniela Mari

Coordinatore del dottorato: Chia.mo Prof. Roberto L. Weinstein

Anno accademico 2013-2014

INDICE

INTRODUZIONE	5
L'invecchiamento	6
Caratteristiche generali	6
Le cause dell'invecchiamento	8
Aspettativa di vita e longevità	14
Telomeri e telomerasi	15
Telomeri: ruolo, struttura e funzionamento	15
Telomerasi: ruolo, struttura e funzionamento	20
Regolazione dell'attività telomerasica	23
Regolazione dell'attività telomerasica nei linfociti	25
Patologie legate all'invecchiamento e all'accorciamento telomerico	25
Scopo della tesi	31
MATERIALI & METODI	33
Disegno dello studio	34

Criteri di inclusione e scale di valutazione	35
Estrazione di DNA	36
Analisi della lunghezza telomerica	37
Stimolazione dei linociti T	41
Analisi dell'attività telomerasica	42
Estrazione di RNA	44
Analisi dei livelli di mRNA del gene hTERT	45
Analisi statistica	47

RISULTATI

48

Caratteristiche della popolazione di studio	49
Valutazione dello stato di salute dei soggetti arruolati	51
Analisi della lunghezza telomerica	54
Analisi dell'attività telomerasica	56
Analisi dei livelli di espressione del gene hTERT	57

DISCUSSIONE

58

BIBLIOGRAFIA

64

RINGRAZIAMENTI

77

INTRODUZIONE

L'invvecchiamento

Caratteristiche generali

L'invvecchiamento è stato definito come un complesso fenomeno di degenerazione delle funzioni fisiologiche fondamentali per la sopravvivenza e per la fertilità di un organismo(1).

Benché la diminuzione della capacità di sopravvivenza e l'aumento del tasso di mortalità che si evidenziano con l'invvecchiamento siano spesso associati ad un accrescimento dell'incidenza delle comuni malattie relative all'età (ischemia, malattie cerebrovascolari e i tumori maligni), si deve sottolineare che l'invvecchiamento non è necessariamente dovuto alla comparsa di patologie o malattie più o meno invalidanti, in quanto i suoi effetti, in termini di diminuzione nelle prestazioni psicofisiche, sono osservabili anche in individui perfettamente sani (2).

L'elenco dei processi e degli organi coinvolti nell'invvecchiamento è molto lungo: tutti gli organi sono soggetti all'invvecchiamento, tuttavia alcuni aspetti giocano un ruolo di primo piano nel definire lo stato di salute dell'individuo, determinando la suscettibilità a sviluppare particolari tipi di patologie (3).

Durante l'invvecchiamento tipicamente si assiste ad una manifesta variazione della struttura corporea, con aumento del grasso e diminuzione di acqua e minerali ossei, calo nella produzione enzimatica, riduzione del volume degli organi e conseguente atrofia dei tessuti. Evidenti sono le alterazioni a carico dell'apparato cardiovascolare che mostrano indurimento dello spessore del muscolo cardiaco, irrigidimento dei lembi valvolari, riduzione della frequenza massima spontanea a riposo, dilatazione di vene e capillari, aumento della dilatazione delle pareti arteriose e diminuzione della capacità contrattile (4). Come risultato

finale si assiste ad una crescente incapacità dell'individuo di far fronte alle richieste necessarie per l'attività fisica. Inoltre la fragilità e la minor plasticità dei tessuti diventa un importante fattore di rischio per una lunga serie di patologie cardiovascolari.

L'apparato digerente diventa frequentemente sede di disturbi che provocano dispepsia o inappetenza e che richiedono variazioni nelle abitudini alimentari. In aggiunta, si riduce la capacità di digerire gli alimenti, a causa di una minore sintesi enzimatica, peggiora la masticazione e diminuisce sia la sintesi proteica del fegato che l'assorbimento di vitamine quali D, A e K (5).

Le modifiche a carico del sistema respiratorio riguardano sostanzialmente la riduzione dell'elasticità polmonare e l'aumento della rigidità della gabbia toracica che causano, di conseguenza, un calo della capacità polmonare; inoltre, la perdita in efficacia dei meccanismi di difesa come la tosse o l'attività delle ciglia vibratili, rende l'anziano più suscettibile alle infezioni (6).

Le alterazioni del metabolismo osseo come l'osteoporosi ed il verificarsi di processi infiammatori e degenerativi a carico delle articolazioni, come l'artrosi e l'artrite reumatoide, rendono l'anziano maggiormente esposto al rischio di fratture e ne riducono le capacità motorie (7).

L'invecchiamento colpisce anche gli organi di senso come vista e udito, indebolendoli, e coinvolge il sistema nervoso, allungando, per esempio, il tempo di reazione agli stimoli.

Infine, a livello renale si verifica una diminuzione delle capacità di ultrafiltrazione. In aggiunta a tali alterazioni funzionali o organiche, va sommato l'invecchiamento cerebrale, legato alle

capacità intellettive e di percezione razionale dell'ambiente, che conduce ad una diminuzione delle capacità di concentrazione, di memorizzazione e della soglia di attenzione(8).

Le cause dell'invecchiamento

I cambiamenti indotti dall'invecchiamento sono spesso evidenti, nella nostra esperienza di vita comune, osservando da vicino l'evoluzione della vita quotidiana degli anziani. Non altrettanto evidente è il perché si invecchi in questo modo e quando e dove la senescenza inizi a manifestarsi nell'individuo. Già intorno alla fine del 1500 Francis Bacon (in "Natural History of Life and Death") elencava le teorie che la scienza del XVI secolo avanzava per spiegare l'invecchiamento. Ad oggi, sebbene il pensiero scientifico abbia fatto enormi progressi, sono ancora numerose le teorie che si contendono la piazza. Quelle attualmente più accreditate e condivise dalla comunità scientifica sono:

La teoria Genetica

Secondo tale teoria esisterebbero dei geni in grado di regolare il processo di invecchiamento.

Questo pensiero è supportato da recenti studi condotti sui centenari che hanno dimostrato come la longevità sia una caratteristica legata essenzialmente a fattori genetici ed ereditari piuttosto che a fattori ambientali e socio-economici (9, 10, 11).

L'ipotesi che la durata della vita sia fondamentalmente regolata da fattori genetici è coerente con alcune osservazioni:

1) la durata della vita di specie animali aventi un corredo cromosomico differente è significativamente diversa;

2) nell'ambito della specie umana, è certa l'esistenza di famiglie costituite da individui estremamente longevi;

3) esistono malattie su base genetica (ad esempio la progeria, la sindrome di Werner, la sindrome di Down ed il mongolismo) che comportano un accelerato processo di invecchiamento ed una ridotta durata della vita.

Studi condotti sia su modelli sperimentali che sull'uomo hanno permesso di identificare i geni coinvolti nell'invecchiamento, definiti anche gerontogeni, ed i geni coinvolti nella longevità.

I due insiemi dovrebbero essere disgiunti sebbene il termine gerontogeni venga usato per indicare genericamente "geni che condizionano l'invecchiamento e le aspettative di vita".

Il primo gerontogene scoperto fu *Daf-2*, causa di invecchiamento in un verme chiamato filaria (12) e la cui disattivazione comportava un' aspettativa di vita raddoppiata in tali vermi. Cinque anni dopo, nel 1998, è stato individuato, sempre nello stesso modello animale, il gene Matusalemme che consentiva di aumentare del 35% la vita di quella specie.

Nel 1999 l'équipe di P. G. Pelicci ha scoperto il gene *p66shc*, la cui soppressione portava ad un incremento del 33% nella sopravvivenza delle cavie murine (13).

Nel dicembre 2000 è stata annunciata la scoperta di Indy (acronimo di I'm not dead yet), la cui mutazione si è dimostrata in grado di raddoppiare la durata della vita dei moscerini (14).

L'anno seguente, nel 2001, un'équipe italo-americana (guidata dall'italiano Antonio Musarò dell'università La Sapienza e dall'americana Nadia Rosenthal dell'Harvard University di Boston) ha annunciato la generazione di topi transgenici i cui muscoli non invecchiano e quindi non perdono forza con l'età. Ciò è stato possibile trasferendo negli embrioni il gene di una proteina (Igf1, insulin-like growth factor) in grado di bloccare la degenerazione dei muscoli,

tipica dell'invecchiamento (15). Ad oggi, l'elenco dei geni coinvolti nell'invecchiamento e nella longevità coincide con la lista dei geni riportata nel database of Human Ageing Genomic Resources (<http://genomics.senescence.info/>). Se osservati globalmente, tutti questi geni sembrano intervenire specificatamente in particolari funzioni biologiche e cellulari tra cui il metabolismo del calcio, del DNA, il bilancio energetico, l'asse GH/IGF-1, lo stress cellulare e lo stress ossidativo.

La teoria Evoluzionistica

La teoria evoluzionistica fu formulata per la prima volta negli anni '40, basandosi sull'osservazione che la malattia di Huntington, una mutazione dominante mortale, permaneva nella popolazione, sebbene fortemente sfavorevole dal punto di vista selettivo. Tuttavia, la tarda età di comparsa della malattia di Huntington (30-40 anni) permette al portatore di riprodursi prima di morire, rendendo la malattia non soggetta alla selezione naturale. Tale osservazione ha ispirato la teoria evoluzionistica, la quale suggerisce che mutazioni dannose, agenti tardivamente, possano accumularsi nella popolazione ed alla fine portare a malattia e senescenza. Nell'ambito della teoria evoluzionistica si è sviluppata la teoria dell'invecchiamento dei corpi eliminabili, secondo la quale l'organismo vive solo per il successo riproduttivo, raggiunto il quale è eliminabile. L'antagonismo tra riproduzione e longevità è inoltre supportato da esperimenti in cui, limitando la riproduzione mediante distruzione di linee di cellule germinali, si è stati in grado di prolungare la vita sia della *Drosophila* che del *Caenorhabditis elegans* (16, 17). Nei mammiferi, invece, la longevità risulta minore in specie con una più alta frequenza riproduttiva, come ad esempio nei pipistrelli (18).

La teoria dei radicali liberi

La teoria dei radicali liberi afferma che, con il passare degli anni, si accumulerebbero nell'organismo radicali liberi dell'ossigeno in grado di svolgere una potente azione ossidante, fortemente dannosa. Il danno da radicali liberi interesserebbe soprattutto il DNA, ovvero il patrimonio genetico ed i mitocondri, e quindi le strutture cellulari indispensabili per la produzione dell'energia.

In condizioni fisiologiche vi è uno stato di equilibrio tra la produzione endogena di radicali liberi e la loro neutralizzazione da parte dei meccanismi anti-ossidanti. Quando prevale la produzione dei radicali liberi si verifica una condizione, definita stress ossidativo, che, a lungo andare, comporta una progressiva usura.

Numerosi studi sperimentali (condotti ad esempio sulla *Drosophila Melanogaster*, il comune moscerino della frutta) hanno dimostrato una correlazione tra produzione di radicali liberi e durata della vita. Nell'uomo tale dimostrazione non è possibile ma è certo che molte malattie comuni nell'anziano come l'arteriosclerosi, la cataratta, il morbo di Parkinson ed il morbo di Alzheimer, si associano ad una prevalenza dei sistemi ossidativi su quelli antiossidanti. Inoltre, in diversi modelli animali, è stato dimostrato che la restrizione calorica, ovvero l'imposizione di una dieta molto rigida, sarebbe in grado di prolungare la durata media della vita dei soggetti proprio attraverso la riduzione del metabolismo e della produzione di radicali liberi (19).

La teoria dei telomeri e della senescenza cellulare

La senescenza cellulare fu descritta per la prima volta nel 1956 come il processo che limita il numero di divisioni, che possono avvenire in coltura, operate da cellule umane normali (20).

Nel 1961, Leonard Hayflick osservò che c'era un limite al numero di replicazioni a cui una cellula normale poteva andare incontro e che cellule provenienti da individui giovani potevano dividersi un numero di volte maggiore rispetto a cellule provenienti da individui anziani.

Questa fu la prima reale evidenza che le cellule umane contengono una sorta di orologio, i telomeri, dall'osservazione del quale si può risalire alla loro età.

Alexei Olovnikov, nel 1971, e James Watson, nel 1972, compresero che i cromosomi non sono in grado di replicarsi autonomamente in modo completo e che perdono, a dimostrazione di questa ipotesi, una parte di DNA ad ogni ciclo replicativo. Successivamente Olovnikov correlò la sua scoperta con quella di Hayflick e suggerì, per la prima volta, che il meccanismo limitante il numero di replicazioni di cellule normali era proprio il progressivo accorciamento dei telomeri, localizzati alle estremità dei cromosomi.

Il limite della replicazione cellulare sembra quindi essere imposto dalla presenza di queste strutture e la conferma arrivò dall'osservazione che l'enzima *telomerasi*, in grado di ricostituire le sequenze telomeriche, è particolarmente attivo in cellule immortalizzate e nei tumori. Il fatto che le cellule umane immortali necessitino della telomerasi, unitamente all'osservazione che i telomeri si accorciano con l'età, ha portato all'ipotesi che la lunghezza telomerica potrebbe regolare la durata di vita delle cellule replicative in vivo, contribuendo di conseguenza all'invecchiamento.

La teoria neuroendocrina

Secondo tale teoria l'invecchiamento sarebbe la conseguenza di alcuni cambiamenti delle funzioni nervose ed endocrine riguardanti selettivamente i neuroni e gli ormoni coinvolti nella riproduzione, nella crescita, nello sviluppo e nella sopravvivenza. La durata della vita sarebbe quindi regolata da fasi sequenziali e governata da segnali nervosi ed endocrini (21, 22). Una componente importante della teoria neuroendocrina è la funzione dell'asse ipotalamo-ipofisurrene (HPA). Una delle maggiori funzioni dell'asse HPA è coordinare gli aggiustamenti fisiologici necessari alla preservazione ed al mantenimento dell'omeostasi interna, nonostante i continui cambiamenti ambientali. Durante la vita, l'esposizione cronica a stress di natura fisica, biologica o psicologica, può esaurire o danneggiare la capacità di adattamento e portare alle cosiddette "malattie da adattamento" oltre che all'invecchiamento di tutti gli organi.

La teoria immunologica

La teoria, proposta più di 40 anni fa da Roy Walford, suggerisce che il normale processo d'invecchiamento nell'uomo e negli animali sia patogeneticamente correlato a processi immunologici sbagliati. In molti anziani, l'immunosenescenza caratterizzata da una ridotta resistenza alle malattie infettive, da una ridotta protezione contro il cancro e da un'aumentata incapacità di autoriconoscimento (da cui patologie autoimmuni) sarebbe quindi alla base del meccanismo dell'invecchiamento (22).

Aspettativa di vita e longevità

L'aspettativa di vita in Italia agli inizi del '900 era di circa 45 anni per i maschi e 50 per le femmine, come riportato dal Human Mortality Database (23). Il progressivo miglioramento delle condizioni socio-economiche e delle condizioni igieniche, unitamente ai progressi della medicina, hanno permesso di spostare notevolmente tale limite, tanto che oggi l'aspettativa di vita per un neonato è di 78 anni se maschio e 80.5 anni se femmina (23).

Questa evoluzione ha inevitabilmente sollevato nuovi quesiti nella comunità scientifica che, parallelamente agli studi sull'invecchiamento, ha iniziato ad interrogarsi sul concetto più esclusivo di longevità, sulle basi biologiche che la determinano, sui limiti potenzialmente raggiungibili e sul modo per superarli (24).

La longevità può essere definita come la lunghezza massima di vita per una determinata specie. Generalmente la biologia assume che la durata massima di vita per ogni specie sia pari ad un tempo equivalente a cinque volte il periodo impiegato per l'accrescimento. Nell'uomo tale periodo corrisponde alla saldatura degli ultimi anelli di ossificazione, che avviene tra i 21 ed i 25 anni, per cui, sulla base di questo dato, il limite massimo teorico dovrebbe attestarsi intorno a 125 anni. Nonostante il metodo per stabilire il limite teorico della vita umana produca un valore esclusivamente orientativo, questo limite sembra essere verosimile in quanto, ad oggi, non ci sono stati individui che lo abbiano superato.

Nonostante gli studi sulla longevità umana siano influenzati dalla presenza di numerose variabili (stile di vita, status socio-economico, stress, ecc.), si ritiene che anche nell'uomo la longevità abbia un carattere prevalentemente ereditario, in accordo con la maggiore durata di vita dei soggetti con genitori longevi rispetto a gruppi di controllo.

Telomeri e telomerasi

Telomeri: ruolo, struttura e funzionamento

I telomeri sono complessi nucleoproteici localizzati nelle porzioni terminali dei cromosomi e consistono di sequenze specie-specifica, non codificanti e altamente ripetute in tandem, associate a diverse proteine (25-28) (Figura 1). Le terminazioni 3' e 5' dei filamenti di DNA lineare sono estremamente suscettibili alla degradazione nucleasica ed altamente soggette a fenomeni di fusione e ricombinazione genica (29,30). I telomeri, pertanto, fungono da “cappuccio” protettivo per le estremità dei cromosomi lineari (31) impedendo la degradazione progressiva del DNA e conferendo, di conseguenza, stabilità genetica. Inoltre, i telomeri regolano il riconoscimento e la separazione dei cromosomi durante la mitosi, facilitano la replicazione del DNA nei vari stadi del ciclo mitotico e meiotico, posizionando ed ancorando i cromosomi al macchinario nucleare (32,33), e influenzano la trascrizione di geni posti nelle vicinanze delle estremità cromosomiche (34).

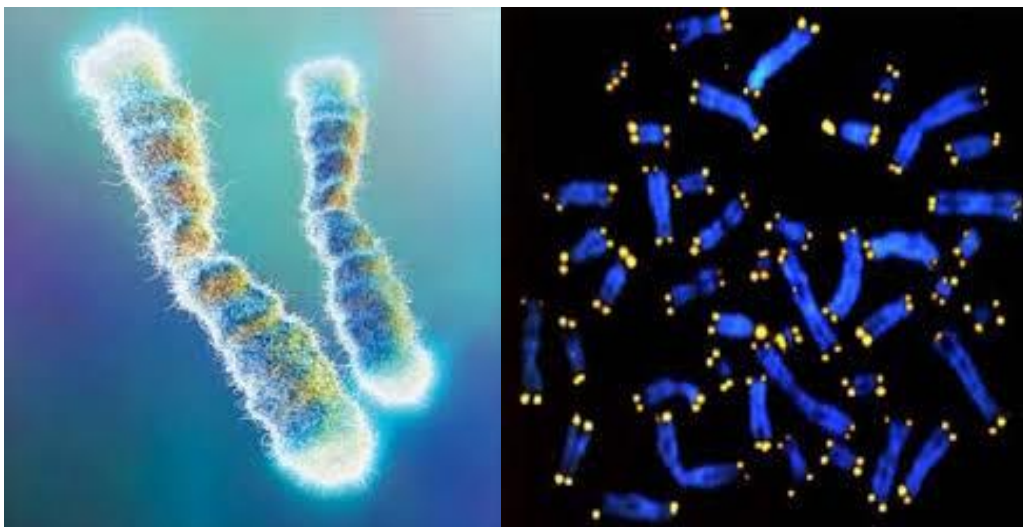


Figura 1. Localizzazione dei telomeri a livello cromosomico

Il meccanismo di sintesi delle estremità dei cromosomi lineari causa l'insorgenza del "problema della replicazione terminale", descritto per la prima volta da Watson nel 1972 (31,35), che consiste nell'incapacità delle DNA polimerasi di replicare completamente le estremità 3' dei cromosomi lineari.

La DNA polimerasi è capace infatti di procedere solo in direzione 5'→3' e la diversa conformazione dei due filamenti di DNA determina un processo di sintesi differente per ciascuna elica. Mentre il filamento guida (leading strand) viene sintetizzato interamente e in modo continuo, il filamento lento (lagging strand) è sintetizzato in modo discontinuo a partire da piccoli primer di RNA, capaci di fornire alla DNA polimerasi l'innesco 3'-OH. Anche se un primer di RNA ibridasse lungo la sequenza più distale del cromosoma, la sua degradazione ad opera delle DNAsi lascerebbe uno spazio vuoto e l'estremità 5' del filamento lagging risulterebbe più corta rispetto all'estremità 3' del filamento complementare. Di conseguenza, ad ogni replicazione del DNA, si verifica la perdita di 50-100 paia basi (36,37).

Per questo motivo, ad ogni ciclo di divisione cellulare i telomeri subiscono un accorciamento (in fase S) ed il ripetersi di tale processo, nel corso dei successivi eventi replicativi, conduce al raggiungimento di una lunghezza minima critica (limite di Hayflick) che segnala la fine della proliferazione, l'inizio della senescenza e/o la successiva morte per apoptosi della cellula (38-40). Dopo molte divisioni cellulari i telomeri diventano infatti così corti che cessano di funzionare correttamente e producono un segnale intracellulare (p53-dipendente) simile a quello prodotto da rotture del doppio filamento di DNA (41-43). L'attivazione di questo pathway impedisce alla cellula di dividersi ulteriormente, bloccando il ciclo cellulare in fase G1 (44), secondo un processo noto come senescenza replicativa (45-47). La vita replicativa

della cellula è quindi scandita dall'accorciamento dei telomeri, aventi la funzione di "orologio mitotico" che "memorizza o ricorda" il numero delle divisioni cellulari permesse.

Nell'uomo il DNA telomerico consiste di sequenze esanucleotidiche 5'-TTAGGG-3' nel filamento leading e 3'-CCCTAA-5' nel filamento lagging, organizzate in una struttura a doppio filamento (dsDNA) ripetuta approssimativamente per 9-15 kb (33,48,49). L'estremità 3' della sequenza telomerica sul filamento leading termina con una protrusione a singolo filamento ricca in G (G-strand overhang) che sporge 50-300 nucleotidi rispetto al filamento complementare e termina con un'estremità 3'-OH libera (41,48,50) (Figura 2).

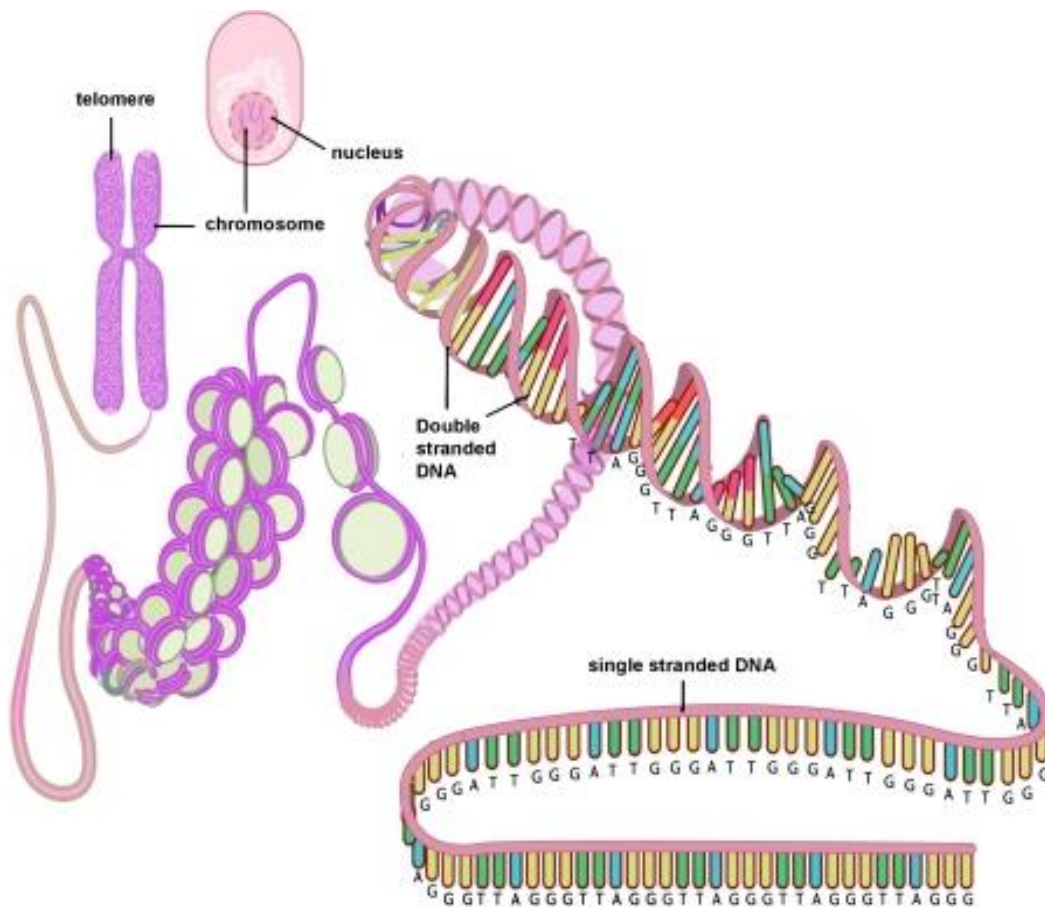


Figura 2. Tipica struttura telomerica a doppio e singolo filamento (G-strand overhang).

Il G-strand overhang si ripiega ad ansa per insinuarsi nella doppia elica del DNA telomerico, che a sua volta si apre formando una struttura a tripla elica detta D-loop (displacement loop) (Figura 3). L'anello maggiore generato dal ripiegamento dell'estremità protrudente è invece definito T-loop (telomere loop) (Figura 3). Questa conformazione conferisce protezione dalle esonucleasi e da fenomeni di fusione termino-terminale, evita che l'estremità 3' del cromosoma venga erroneamente riconosciuta come rottura del doppio filamento dai sistemi di riparazione del DNA e ostacola per ingombro sterico l'allungamento dei telomeri operato dalla telomerasi, (49,51-53).

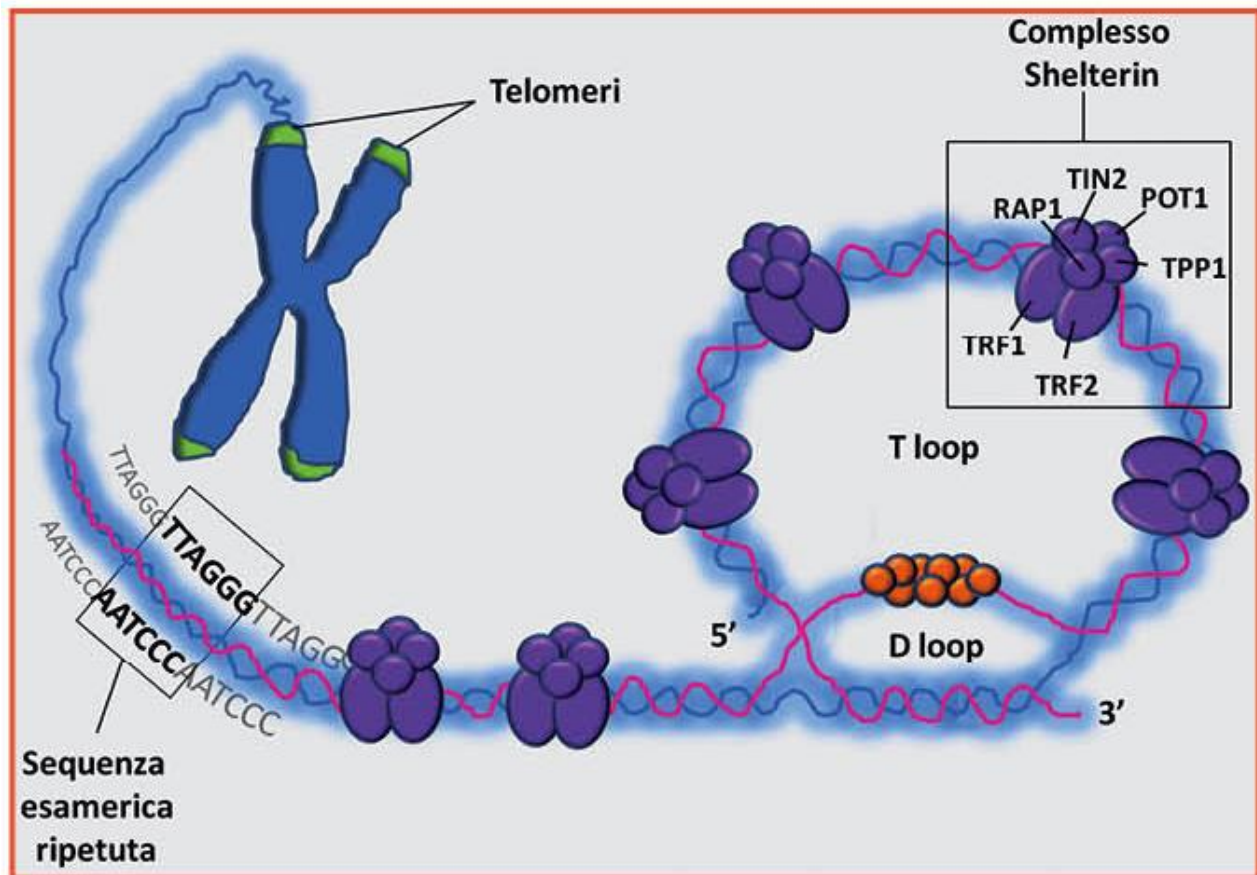


Figura 3. T-loop, D-loop e complesso delle shelterin protein (TRF1, TRF2, TPP1, POT1, TIN2 e Rap1) permettono di discriminare i telomeri da rotture del DNA a doppio filamento.

Le sequenze telomeriche umane sono associate ad un complesso multiproteico noto come “Shelterin Complex” (TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 e POT1) implicato nella formazione e nel mantenimento dell’architettura dei telomeri, oltre che nella regolazione della loro lunghezza (Figura 3). Il complesso delle proteine shelterin si associa specificamente con le ripetizioni telomeriche TTAGGG, media la formazione e la stabilità del T-loop (41,53), stabilizza le estremità dei cromosomi interagendo sia con la struttura a singolo che a doppio filamento e contribuisce alla funzione protettiva dei telomeri.

Studi in vitro e in vivo hanno evidenziato che nei mammiferi la conformazione ad anello (T-loop) è favorita, in particolare, dall’intervento di due proteine shelterin: TRF1 (telomeric repeat binding factor 1) e TRF2 (TTAGGG repeat binding factors) (53-57). Mentre la proteina TRF1 sembrerebbe essere coinvolta nella regolazione della lunghezza telomerica (55,56), la proteina TRF2 ostacola la fusione delle estremità cromosomiche e ne aumenta la stabilità (57). In aggiunta, TRF2 favorisce l’inserimento del G-strand overhang all’interno del dsDNA telomerico, mascherando in tal modo il 3'-overhang. Tale struttura costituisce un interessante modello di studio che potrebbe spiegare come le estremità cromosomiche a singolo filamento siano protette dai meccanismi di riparazione, degradazione, ricombinazione e fusione (53,58,59).

Telomerasi: ruolo, struttura e funzionamento

L'integrità dei telomeri è garantita dall'enzima telomerasi (60), una trascrittasi inversa telomero-specifica capace di aggiungere ripetizioni telomeriche all'estremità dei cromosomi lineari, controbilanciando in tal modo il meccanismo di accorciamento terminale. Il complesso telomerasico è costituito da una subunità catalitica avente funzione di trascrittasi inversa (Telomerase Reverse Transcriptase, TERT), da una componente a RNA (Telomerase RNA Component, TERC o TR) che funge da templatò, da una componente proteica principale detta discherina e da diverse proteine specie-specifiche che stabilizzano il complesso (38,49,51,61) (Figura 4).

La telomerasi riconosce l'estremità 3' del filamento leading e sintetizza una o più copie dell'esanucleotide telomerico (5'-TTAGGG-3') (Figura 4). Dopo molti cicli di estensione, l'allungamento del filamento lagging, all'estremità del cromosoma, viene effettuato dalla DNA polimerasi che usa il filamento leading neo-esteso come stampo (49,60). Questo meccanismo assicura che l'estremità 3' del DNA telomerico sia sempre più lunga rispetto all'estremità 5' con la quale è appaiata (3'- overhang).

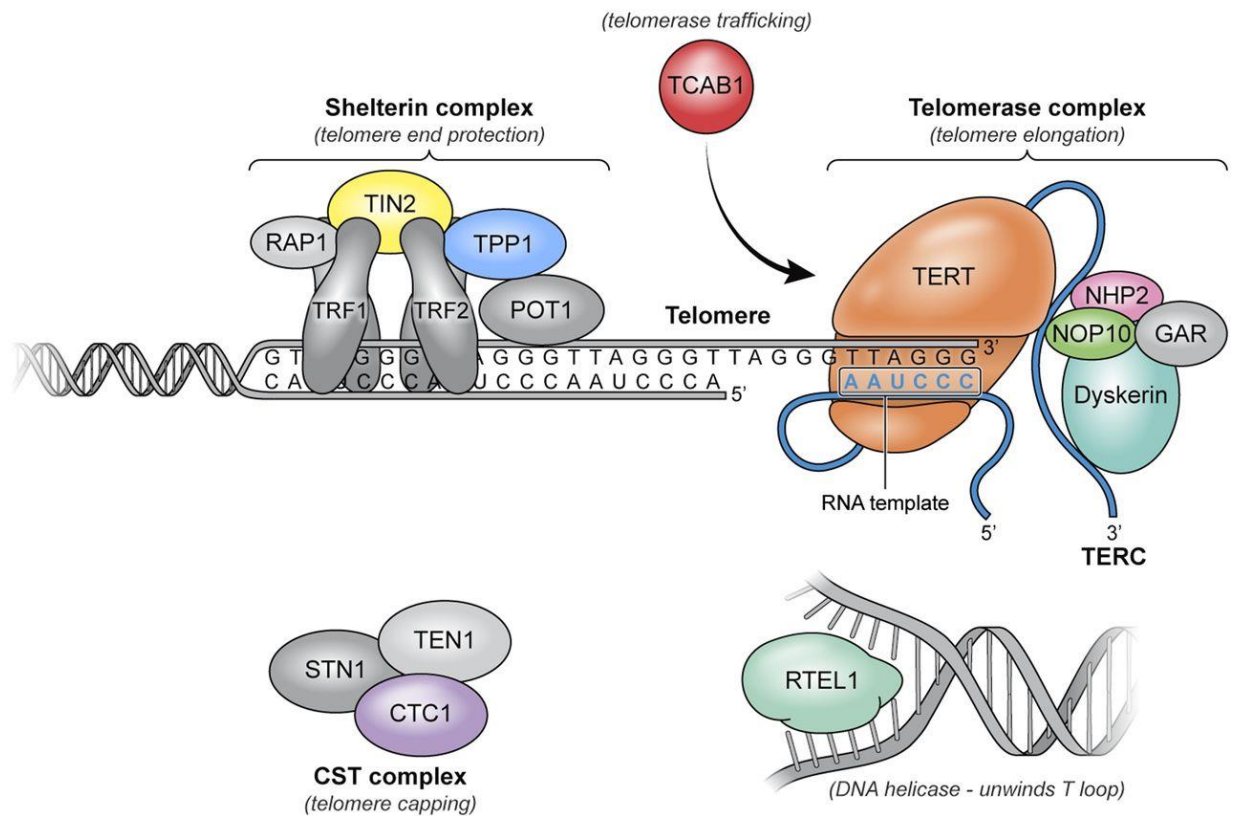


Figura 4. Complesso della telomerasi (TERT, TERC e discherina) e componenti proteiche ad essa associate (GAR, NOP10, NHP2).

Ad eccezione delle cellule della linea germinale e staminale, l'espressione del gene della telomerasi è silenziata (62,63) e pertanto, dopo un numero finito di divisioni cellulari, la maggior parte delle cellule umane entra nella fase di senescenza cellulare.

La proteina TERT, codificata dal gene omonimo localizzato sul cromosoma 5 (5p15.33), appartiene alla famiglia delle trascrittasi inverse (49,64,65). Studi bioinformatici e mutazionali hanno dimostrato che la componente proteica TERT contiene tre elementi strutturali principali: una lunga regione amino-terminale contenente domini conservati necessari per il legame al DNA e all'RNA, un dominio centrale catalitico RT e una corta regione carbossi-terminale (Figura 5A) (49,66).

Il gene TERC è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 3 (3q21-q28) e consta di tre domini conservati: un dominio core pseudoknot/tempiato, un dominio CR4/CR5 e il box H/ACA. Il dominio core è essenziale per l'attività della telomerasi in vivo e in vitro (67) e contiene un dominio CR1 di 11 nucleotidi (5'-CUAACCCUAAC-3') che funge da tempiato ed è essenziale per la funzione enzimatica della telomerasi, un'importante struttura pseudoknot (CR2/CR3), un sito putativo di legame che permette l'interazione con la componente proteica TERT ed elementi 5'- e 3'-boundary che evitano l'incorporazione di nucleotidi aspecifici (Figura 5B) (34,49,68)

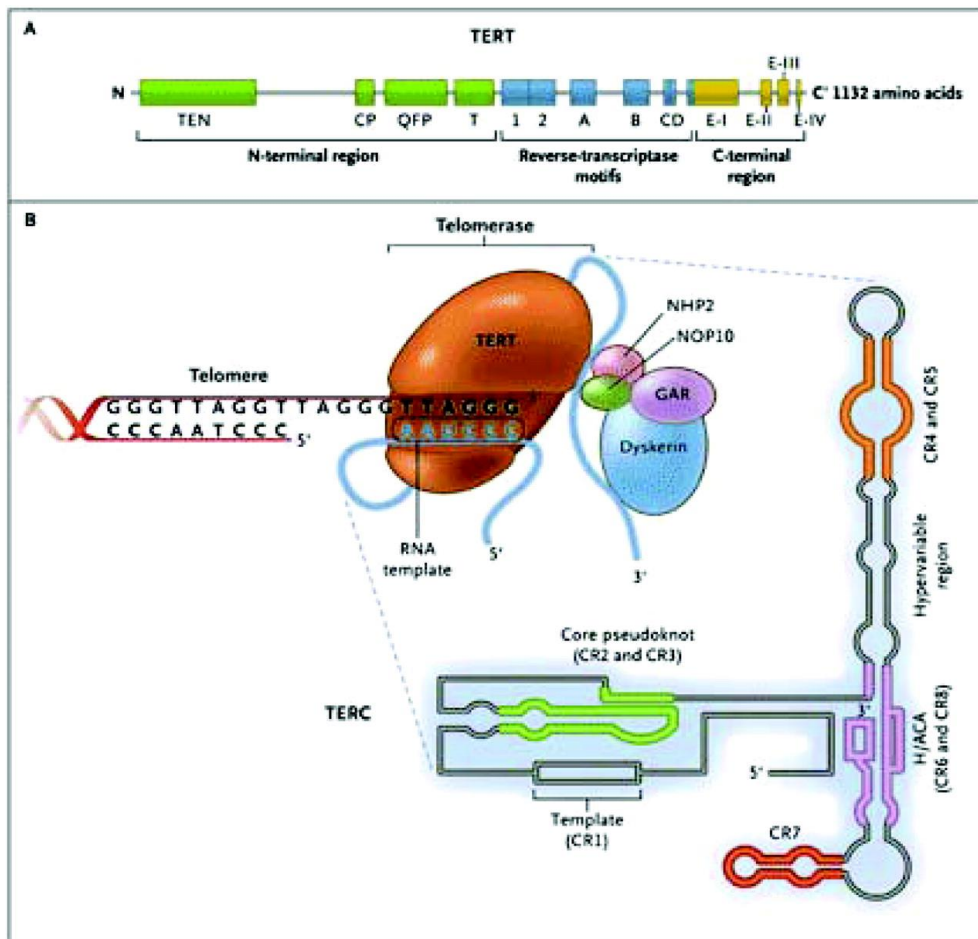


Figura 5. Rappresentazione schematica della struttura di TERT (A) e TERC (B)

Regolazione dell'attività telomerasica

Mentre il gene codificante TERC è espresso in maniera sostanzialmente sovrapponibile nei tessuti somatici e germinali, l'espressione del gene TERT è finemente regolata e generalmente risulta assente nella maggior parte delle cellule somatiche dopo la nascita. Pertanto, la componente proteica TERT, è il fattore limitante l'attività telomerasica e la sua espressione correla con l'attività dell'enzima (69,70).

La regolazione della telomerasi è un fenomeno multifattoriale cui concorrono interazioni trascrizionali, post-traduzionali, meccanismi di fosforilazione e di controllo ormonale: fra questi sembra che il controllo trascrizionale del gene TERT giochi un ruolo fondamentale (Figura 8). Infatti, il promotore del gene TERT è inattivo nelle cellule somatiche umane normali e risulta attivato in diversi tumori primari e in linee cellulari immortalizzate (71). La dettagliata analisi della sequenza ha evidenziato che il promotore di TERT è ricco in GC, manca della TATA e CAAT box e presenta siti di legame per diversi fattori di trascrizione, suggerendo che l'espressione della telomerasi potrebbe essere soggetta a livelli multipli di controllo e regolata da diversi fattori in differenti contesti cellulari (51,65,72,73). Studi in letteratura riportano inoltre che la fosforilazione di TERT da parte della proteina chinasi C (PKC) up-regola fortemente l'attività telomerasica e risulta necessaria sia per l'assemblaggio dell'oloenzima che per la sua attività catalitica (74,75) (Figura 6). Il modello proposto per la telomerasi presume quindi un meccanismo di regolazione mediante fosforilazione/defosforilazione e l'esistenza dell'enzima in due differenti conformazioni tra loro reversibili (forma attiva/inattiva). In aggiunta, al fine di ottenere la massima attività catalitica, la protein chinasi B (PKB o Akt) deve fosforilare il peptide AVRIRGKSYV di

TERT (80) (Figura 6). L'attività della telomerasi viene regolata anche attraverso meccanismi di splicing alternativo, che possono portare alla produzione di una forma tronca o inattiva della proteina (77-79) (Figura 8). In particolare, trascritti deleti di una o entrambe le regioni funzionali per l'attività catalitica (α e β) sembrerebbero regolare negativamente l'attività della telomerasi.

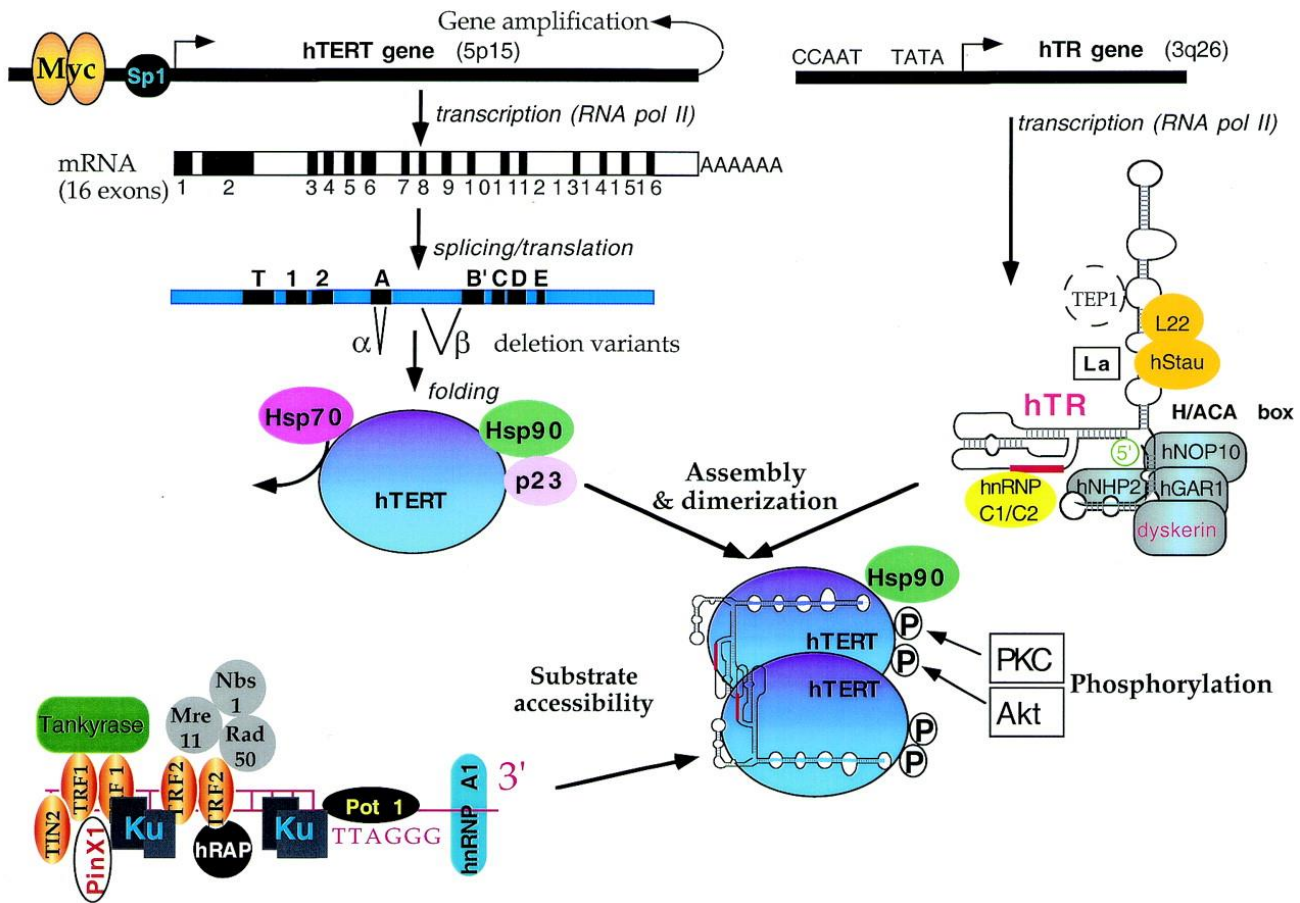


Figura 6. Meccanismi di regolazione dell'attività telomerasica.

Regolazione dell'attività telomerasica nei linfociti

A differenza di tutte le altre cellule somatiche, i linfociti hanno la straordinaria capacità di poter transitoriamente riattivare la telomerasi in seguito ad uno stimolo antigenico o proliferativo (80) ma la quantità di telomerasi e l'arco temporale in cui essa rimane attiva variano da individuo a individuo e dipendono presumibilmente sia da fattori ambientali che da fattori genetici. Al momento non si conoscono i meccanismi responsabili della regolazione della telomerasi nei linfociti e la caratterizzazione dei pathways coinvolti in questo processo potrebbe fornire nuovi spunti per l'identificazione di nuovi determinanti di longevità e di invecchiamento in buona salute.

Patologie legate all'invecchiamento ed all'accorciamento telomerico

Nel corso degli ultimi 20 anni, molti studi hanno evidenziato che il progressivo accorciamento telomerico durante l'invecchiamento correla in modo diretto con la patogenesi e la progressione di diverse malattie. In seguito sono riportati alcuni degli esempi più emblematici.

Il cancro

Gli studi più numerosi sono stati condotti sul cancro, il quale, nelle sue varie forme, rappresenta una delle patologie più caratteristiche dell'invecchiamento.

In cellule normali giovani i telomeri sono relativamente lunghi e mantengono la loro funzione di capping, la telomerasi non è attiva e non si osserva instabilità genomica. Con l'invecchiamento, i telomeri si accorciano fino a raggiungere una lunghezza critica e non sono più in grado di proteggere le estremità cromosomiche. Tale perdita della funzione di capping

potrebbe permettere la fusione delle estremità di due diversi cromosomi, causando la formazione di cromosomi dicentrici. In metafase, i cromosomi dicentrici, che sono appaiati al fuso mitotico in quattro punti, possono essere spinti in direzioni opposte della cellula, formando un “anaphase bridge”. La conseguente rottura del “ponte” genererebbe cromosomi rotti nelle cellule figlie, causando cicli successivi di “fusion-bridge-breakage”. Questa instabilità genomica conduce al progressivo accumulo di alterazioni geniche (81). In particolare, quando si verificano mutazioni che inattivano i checkpoint di Rb e p53, il limite di Hayflick e la senescenza possono essere bypassati. Le cellule che continuano a proliferare oltre questo limite subiscono un ulteriore accorciamento telomerico e cicli successivi di fusion-bridge-breakage (81). In questo contesto, le mutazioni prodotte possono portare alla de-repressione della telomerasi che, una volta attiva, conferisce l’immortalità alla cellula trasformata e favorisce la comparsa di nuove mutazioni gene-specifiche critiche per la progressione del cancro verso stadi invasivi e metastatici (81).

L'aterosclerosi

L'aterosclerosi non è solamente una patologia tipica della vecchiaia ma è anche una delle maggiori cause di morte nei paesi occidentali. Essa si manifesta a livello delle pareti arteriose, dove a seguito di una lesione endoteliale si può verificare l'accumulo di macrofagi, i quali, dopo fagocitosi di LDL, di lipidi ed alcune cellule muscolari lisce della zona sub endoteliale (tonaca intima) si trasformano in cellule schiumose formando la stria lipidica, primo abbozzo di placca aterosclerotica. In seguito, la stria lipidica può evolvere in placca fibrosa o ateroma, a causa del progressivo ispessimento della tonaca intima dovuto al continuo accumulo di lipidi e

cellule schiumose, ma soprattutto per la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla sottostante tonaca media, la loro moltiplicazione e poi trasformazione in cellule capaci di produrre matrice fibrosa (sintesi di collagene e proteoglicani). Inoltre, con il continuo ingrandirsi della placca, si possono verificare micro fratture nell'endotelio con conseguente richiamo di citochine (IL-1 e TNF) che gli donano proprietà aggregante permettendo così alle piastrine, spinte dai fattori di coagulazione, di legarsi sulla superficie vasale formando microtrombi e rilasciando fattori di crescita che contribuiscono ulteriormente alla proliferazione delle cellule muscolari.

Studi in letteratura hanno dimostrato come l'accorciamento dei telomeri sia dannoso per la funzione cardiaca, associandosi a un più elevato tasso di mortalità per cardiopatie (82). In particolare, è stato osservato che pazienti aventi placche aterosclerotiche di dimensioni significative presentavano telomeri più corti rispetto a quelli di persone coetanee sane e inoltre che la lunghezza telomerica era direttamente correlata alla gravità e all'insorgenza dei sintomi dell'aterosclerosi (83). In aggiunta, è interessante notare come i cardiociti con telomeri corti (lunghezza minore a 2.5kb) siano anche positivi alla proteina p16, un marcatore di invecchiamento cellulare e proapoptosi (83). Si suppone che i telomeri corti associati ad un aumento di invecchiamento cellulare possano facilitare il collasso cardiaco, anche se non in modo causativo. Lo stress ossidativo o uno stato infiammatorio prolungato possono infatti essere considerati come la causa sia di aterosclerosi che dell'accelerato accorciamento telomerico (84). E' necessario stabilire al più presto i processi che legano i telomeri allo sviluppo di questa patologia.

La demenza

La demenza è una delle maggiori cause della riduzione della qualità della vita. Le cause sono multifattoriali e includono sia fattori ambientali che genetici (85). E' stato ipotizzato che lo stress ossidativo, attraverso la produzione di radicali liberi, contribuisce significativamente all'invecchiamento cellulare (86). Il cervello è un organo particolarmente vulnerabile al danno ossidativo con conseguente declino cognitivo e possibile insorgenza di malattie neurodegenerative (87).

Recenti studi hanno suggerito che lo stress ossidativo comporta un aumento di cellule senescenti, che hanno come caratteristica una lunghezza telomerica particolarmente ridotta (88). Con l'avanzare dell'età il danno ossidativo aumenta, in parallelo alla produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), i quali, a loro volta, accelerano l'accorciamento dei telomeri (89). In particolare, la lunghezza dei telomeri è influenzata dalla relazione che intercorre tra stress ossidativo e l'efficienza delle difese antiossidanti dell'individuo. Se la capacità antiossidante viene meno, i telomeri, in presenza di elevate concentrazioni di ROS, si accorciano e inducono un'alterata proliferazione cellulare portando alla senescenza cellulare. Questo fenomeno è stato evidenziato in vitro in varie condizioni di stress, come ipossia, sia nei fibroblasti umani (90) sia in cellule nervose (88) e potrebbe costituire uno dei meccanismi eziopatogenetici delle malattie neurodegenerative.

Studi sui linfociti hanno evidenziato una correlazione positiva tra l'accorciamento dei telomeri e la demenza (89). Pertanto, la determinazione della lunghezza telomerica linfocitaria potrebbe costituire un marker di declino cognitivo, in quanto rifletterebbe la capacità dei leucociti di proliferare in risposta allo stress ossidativo.

Il diabete di tipo II

Il diabete di tipo II è una malattia cronica caratterizzata dalla presenza di elevati livelli di glucosio nel sangue (iperglicemia) e dovuta ad un'alterata quantità o funzione dell'insulina. L'insulina è l'ormone prodotto dal pancreas che consente al glucosio l'ingresso nelle cellule e il suo conseguente utilizzo come fonte energetica. Quando questo meccanismo è alterato, il glucosio si accumula nel circolo sanguigno.

Il diabete di tipo II è la forma più comune di diabete e rappresenta circa il 90% dei casi di questa malattia. La causa è ancora ignota, anche se è certo che il pancreas è in grado di produrre insulina, le cellule dell'organismo non riescono poi a utilizzarla. In genere, la malattia si manifesta dopo i 30-40 anni e numerosi fattori di rischio sono stati riconosciuti associarsi alla sua insorgenza. Tra questi: la familiarità per diabete, lo scarso esercizio fisico, il sovrappeso e l'appartenenza ad alcune etnie. Riguardo la familiarità, circa il 40% dei diabetici ha parenti di primo grado (genitori, fratelli) affetti dalla stessa malattia, mentre nei gemelli monozigoti la concordanza della malattia si avvicina al 100%, suggerendo una forte componente ereditaria per questo tipo di diabete.

Studi recenti hanno dimostrato che i telomeri delle cellule beta pancreatiche sono più corti nelle persone con diabete e quindi più prossime alla senescenza rispetto a cellule di individui sani (91). L'accelerato accorciamento telomerico in pazienti affetti da diabete potrebbe quindi costituire uno dei meccanismi eziopatogenetici scatenanti l'esordio e la progressione di questa invalidante malattia (91).

La Broncopolmonite Cronica Ostruttiva (BPCO)

La broncopolmonite cronica ostruttiva (BPCO) è un'affezione cronica polmonare caratterizzata da una progressiva ostruzione bronchiale, con limitazione del flusso aereo solo parzialmente o per nulla reversibile e causata da un'inflammatione cronica delle vie aeree e del parenchima polmonare. Recentemente, la BPCO è stata classificata come la terza causa di morte, essendo responsabile di oltre 3 milioni di decessi (2).

Il fumo di tabacco è la causa più comune della condizione insieme ad altri fattori, quali l'inquinamento dell'aria e fattori genetici (93). L'esposizione a lungo termine a queste sostanze irritanti provoca un'intensa risposta infiammatoria nei polmoni con conseguente restringimento delle piccole vie aeree e la rottura del tessuto polmonare, una condizione conosciuta come enfisema (94).

La lunghezza telomerica diminuisce con l'avanzare dell'età ed è inoltre associata allo stile di vita tra cui il fumo, l'obesità e lo stress (95-98). Infiammazione e stress ossidativo a livello polmonare potrebbero portare ad un accelerato accorciamento telomerico ed è quindi plausibile considerare la lunghezza telomerica come un marker di funzionalità polmonare e di aumentato rischio di sviluppare la BPCO (99).

Recenti studi suggeriscono inoltre che la BPCO potrebbe essere associata anche a particolari varianti genetiche che determinano una fisiologica diminuzione dell'attività della telomerasi. Questa teoria è supportata dalla scoperta che cellule polmonari prelevate da individui affetti da BPCO e coltivate in vitro esibiscono, in media, non solo telomeri più corti ma anche più bassi livelli di attività telomerasica rispetto a cellule polmonari provenienti da individui sani della stessa età (100,101).

SCOPO DELLA TESI

Rispetto agli inizi del '900, l'aspettativa di vita è quasi raddoppiata portando ad un significativo invecchiamento della popolazione generale e, di conseguenza, ad un radicale aumento dell'incidenza di patologie associate all'età come le malattie cardiovascolari o quelle neurodegenerative.

La comprensione dei meccanismi biologici e molecolari caratterizzanti l'invecchiamento e la longevità, l'altra faccia della stessa medaglia, diventa pertanto oggi più che mai di estremo interesse. Sebbene la genetica abbia fatto luce su molteplici aspetti di questa affascinante problematica, identificando numerosi geni responsabili dell'invecchiamento e parecchi fattori legati invece alla longevità, è importante pensare all'invecchiamento come ad un processo influenzato da numerose variabili alcune delle quali sono da ricercarsi nell'ambiente e nelle complesse interazioni che l'organismo instaura con esso.

Partendo da tali presupposti abbiamo deciso di investigare ulteriormente se esiste un'associazione tra la longevità dei genitori e lo stato di salute, la lunghezza telomerica e l'attività telomerasica dei figli.

A tale scopo abbiamo disegnato un modello sperimentale innovativo: abbiamo confrontato tra loro un gruppo di centenari e tre categorie di soggetti anziani coetanei ovvero i figli di centenari, aventi un'alta aspettativa di vita, i figli di genitori morti ad un'età in linea con l'aspettativa di vita media ed un gruppo di anziani aventi una bassa aspettativa di vita, in quanto nati da genitori entrambi non longevi e morti precocemente per cause non accidentali.

Il confronto diretto tra queste tre categorie di soggetti anziani, distinguibili esclusivamente per

le diverse aspettative di vita, permetterà di studiare ulteriormente i determinanti dell'invecchiamento in buona salute e della longevità.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

L'intero progetto appartiene ad uno studio multicentrico più ampio, volto ad indagare come la longevità dei genitori possa riflettersi in un invecchiamento in buona salute dei figli.

Con l'obiettivo di selezionare i potenziali candidati per questo studio abbiamo contattato 46 uffici anagrafe situati nel nord Italia e raccolto i nomi, le date di nascita e la residenza di tutte le persone ancora in vita aventi almeno 100 anni di età. Successivamente abbiamo inviato, ad ognuno di loro, una lettera contenente gli obiettivi di questo studio. In aggiunta, abbiamo incluso tra i possibili candidati tutti i figli di centenari ed i loro rispettivi coniugi disposti a partecipare allo studio.

Il modello sperimentale disegnato prevedeva il reclutamento di 4 categorie di soggetti: un gruppo di centenari, costituito da individui nati tra il 1900 ed il 1908; un gruppo di figli di centenari (CO) costituito da individui con almeno un genitore centenario; un gruppo di figli di individui nati nello stesso periodo dei centenari (1900-1908) ma morti per cause non accidentali ad un'età in linea con l'aspettativa di vita media (dai 67 ai 77 anni se maschio, dai 72 agli 82 anni se femmina) (CT) ed infine il gruppo dei figli di non longevi (NLO), costituito da individui con entrambi i genitori nati nello stesso periodo dei centenari (1900- 1908) ma morti entrambi precocemente per cause non accidentali ad un'età non superiore a 67 se maschi e 72 anni se femmine.

Al termine del reclutamento, il gruppo dei centenari è stato suddiviso in due sottocategorie: il gruppo dei semisupercentenari (SSCENT) (individui con età compresa tra 105 e 109 anni) ed il gruppo dei centenari (CENT) (individui con età compresa tra 100 e 104 anni). Questa ulteriore sottoclassificazione è stata effettuata con l'intento di investigare ed approfondire ulteriormente

il legame che intercorre tra invecchiamento, lunghezza telomerica e stato di salute. Infatti, il gruppo dei SSCENT potrebbe esibire caratteristiche peculiari rispetto al gruppo dei CENT.

Tale modello sperimentale, costituito dai cinque gruppi di individui precedentemente descritti, è stato impiegato per l'analisi della lunghezza telomerica, per l'analisi dell'attività telomerasica e per il successivo approfondimento inerente alla prevalenza di malattie età-correlate nei gruppi di studio.

Per questo studio sono stati selezionati 29 SSCENT con età media di 105.8 ± 1.6 anni; 59 CENT con età media di 100.7 ± 1.4 anni; 70 CO, con un'età media di 70.6 ± 6.9 ; 28 CT, con un'età media di 73.1 ± 3.5 anni; e 35 NLO, con un'età media di 73.1 ± 7.0 anni.

Criteri di inclusione e scale di valutazione

Le età dei partecipanti allo studio sono state confermate mediante visione di certificato di nascita o documento di identità.

Tutti i soggetti arruolati sono stati visitati da un medico che, contestualmente al prelievo di sangue, ha raccolto i dati anamnestici relativi alla storia personale e familiare oltre ad informazioni attinenti alle caratteristiche biometriche e demografiche.

Le performance cognitive sono state valutate mediante Mini Mental State Examination test (MMSE) (102) e a ciascun individuo è stato assegnato un punteggio compreso fra 0 (stato cognitivo estremamente compromesso) e 30 (stato cognitivo ottimale). Lo stato funzionale è stato invece valutato sia mediante la scala Lawton Instrumental Activities of Daily Living (IADL) (103) che mediante la scala Katz index of independence in Activities of Daily Living (ADL) (104). Sulla base dei punteggi ottenuti, ad ogni soggetto arruolato è stato assegnato un

punteggio IADL compreso tra 0 (stato funzionale estremamente compromesso) e 8 (ottimo stato funzionale) ed un punteggio ADL compreso tra 0 (stato funzionale estremamente compromesso) e 6 (ottimo stato funzionale).

In aggiunta, è stata somministrata la Geriatric Depression Scale (GDS) (105) per la valutazione del grado di depressione e ad ogni individuo è stato assegnato un punteggio compreso tra 0 (normale tono dell'umore) a 30 (significativo stato depressivo).

I criteri di reclutamento impiegati prevedevano inoltre stringenti criteri di esclusione: sono stati esclusi dal reclutamento tutti i soggetti affetti da tumori ematologici, in terapia con chemioterapici, anticoagulanti e immunosoppressori.

Tutti i partecipanti allo studio hanno sottoscritto un consenso informato, il quale è stato approvato dal comitato etico vigente.

Estrazione di DNA

Il DNA genomico è stato estratto da sangue periferico utilizzando il kit commerciale Wizard genomic DNA purification kit (PROMEGA, WI, USA).

Un volume pari a 3-5 ml di sangue periferico è stato trattato con una soluzione di lisi fornita nel kit e successivamente digerito a 37°C per 1 ora con Proteasi K in un tampone contenente sodium dodecyl sulfate (SDS). Il DNA è stato successivamente estratto tramite metodica salting-out e risospeso in un tampone contenente Tris- EDTA (TE).

Per ogni campione estratto è stato eseguito un controllo quantitativo mediante NanoDrop (NanoDrop Products Thermo Scientific Wilmington, DE) ed un controllo qualitativo mediante visualizzazione diretta dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1%.

I protocolli per l'allestimento delle due q-PCR si differenziano per la sequenza dei primer usati, le loro temperature di annealing ed il numero totale dei cicli (Tab1-3).

Nello specifico, il protocollo prevede:

- Allestimento delle diluizioni di DNA dei campioni in esame e dello standard interno (pool di DNA provenienti da diversi individui): i DNA sono stati diluiti in TRIS-EDTA pH 7.5 così da ottenere una concentrazione di 1ng/μl. Per ogni campione, incluso lo standard interno, sono stati caricati 10μl di DNA per pozzetto della piastra in triplicato. In ogni piastra è stato inoltre inserito un controllo negativo (DNA sostituito con H₂O)
- Preparazione della Mix (15μl per reazione):
 - Primer: 3μl (Tab. 1)
 - SYBR Select Master Mix (Applied Biosystem, CA, USA): 12μl
- Dispensazione della Mix di reazione nei pozzetti
- Copertura della piastra completa con apposita pellicola adesiva trasparente per evitare contaminazioni da agenti ambientali
- Programmazione e successivo avvio dello strumento (AB Prism 7500, Applied Biosystem, CA, USA).

	Sequenza primers	Concentrazione finale
Tel 1	5'-GGTTTTTGGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'	270 nM
Tel 2	5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'	900 nM
36B4u	5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'	300 nM
36B4d	5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'	500 nM

Tabella 1: sequenza e concentrazioni finali dei primer utilizzati.

Ciclo 1:	(1X)		
	Step 1:	95 °C	10:00
Ciclo 2:	(30X)		
	Step 1:	95 °C	00:15
	Step 2:	54 °C	02:00

Tabella 2: Condizioni di reazione relative all'amplificazione delle estremità telomeriche.

Ciclo 1:	(1X)		
	Step 1:	95 °C	10:00
Ciclo 2:	(40X)		
	Step 1:	95 °C	00:15
	Step 2:	58 °C	01:00

Tabella 3: Condizioni di reazione relative all'amplificazione del gene 36B4

Prima dell'analisi dei campioni, il DNA dello standard interno è stato diluito 1:2 in modo seriale allo scopo di produrre 5 aliquote aventi concentrazioni differenti, da 3.5 a 0.22 ng/μl. Ciascuna di tali aliquote è stata utilizzata per l'allestimento di una curva standard. In breve, per ogni diluizione sono stati caricati in due diverse piastre 10μl di DNA in triplicato e sono state

eseguite due q-PCR, una per l'amplificazione delle sequenze telomeriche, l'altra per l'amplificazione del gene 36B4. Entrambe le reazioni hanno evidenziato una buona linearità tra le concentrazioni di DNA usate ($r^2=0.99$). La quantità ottimale di DNA per le reazioni di q-PCR sui campioni dello studio è stata scelta in seguito all'analisi della curva standard.

Il calcolo delle lunghezze telomeriche è stato effettuato applicando un metodo di quantificazione relativa. Nello specifico, al termine di ogni singola q-PCR i dati inerenti alle variazioni di fluorescenza dei campioni in funzione del numero di cicli (Rn data) sono stati esportati dallo strumento e importati nel programma LinRegPCR per il calcolo dell'efficienza media di amplificazione (E), della linea di threshold, e del ciclo threshold (ct) di ogni campione (107). L'efficienza media di amplificazione è stata utilizzata per il calcolo delle lunghezze telomeriche relative dei campioni rispetto allo standard interno (T) e per il calcolo delle quantità relative del gene 36B4 nei campioni rispetto allo standard interno (S), secondo le seguenti formule:

$$T = \frac{(E)^{\text{ct medio dello standard interno}}}{(E)^{\text{ct medio del campione}}}$$

$$S = \frac{(E)^{\text{ct medio dello standard interno}}}{(E)^{\text{ct medio del campione}}}$$

La lunghezza telomerica di ogni campione è stata espressa come rapporto T/S.

Per confermare le lunghezze telomeriche, tutti i campioni sono stati rianalizzati ed il coefficiente di variazione inter-assay (CV) è risultato essere < 5%.

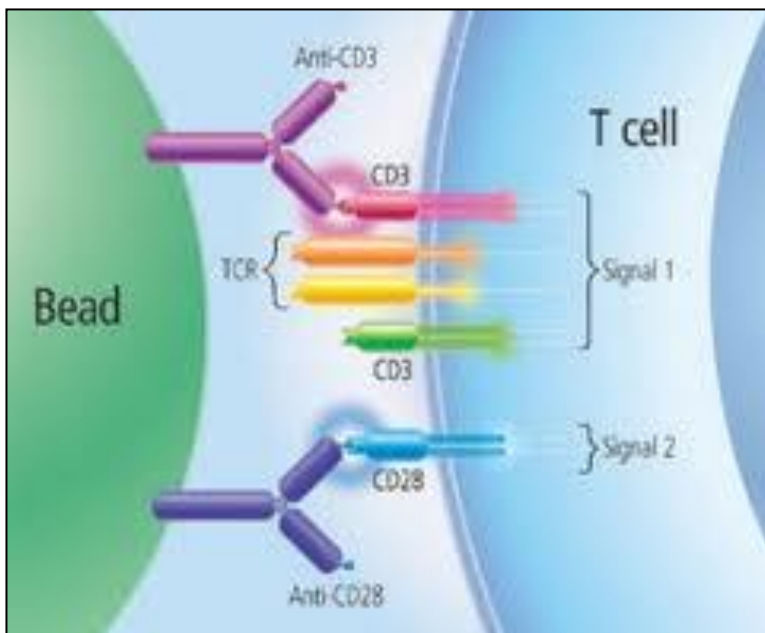
Stimolazione dei linfociti T

I PBMC sono stati isolati da sangue periferico mediante stratificazione su Ficoll e messi in coltura alla concentrazione di 1 milione PBMC/ml in RPMI medium (Gibco® RPMI 1640 medium, Life Technologies, CA, USA) + 10% FBS (Gibco® fetal bovine serum, Life Technologies, CA, USA).

In seguito, i PBMC sono stati stimolati per mezzo di beads metalliche che espongono sulla loro superficie anticorpi anti-CD3 e anticorpi anti-CD28 (Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28, Life Technologies, CA, USA), seguendo il protocollo fornito nel kit.

Le interazioni “anticorpo-recettore” sulla superficie dei linfociti T producono un effetto simile alla stimolazione fisiologica dei linfociti T operata dalle cellule presentanti l’antigene (APC cells) (Figura 8)

Stimolazione dei linfociti T **In vitro** (Beads)



Stimolazione dei linfociti T **In vivo**

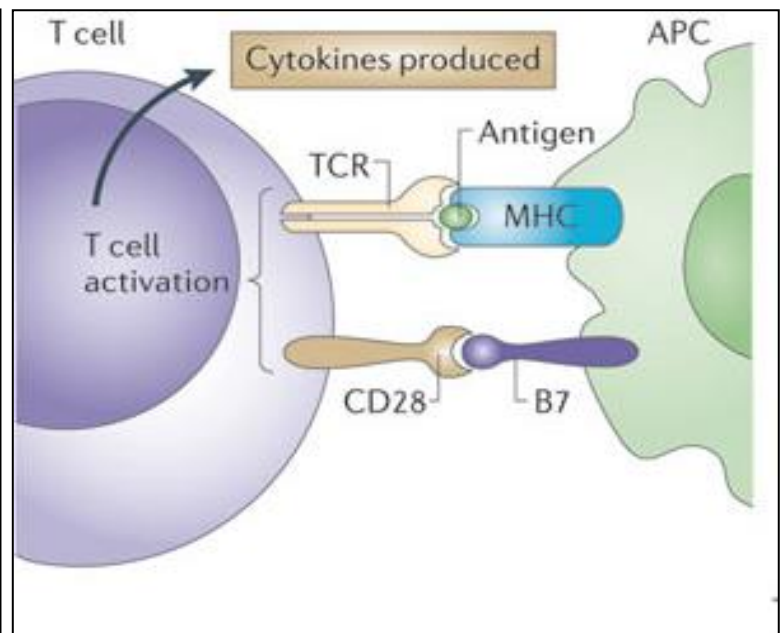


Figura 8: Stimolazione dei linfociti T in vitro e in vivo

Le cellule sono state incubate a 37 C°, 5% CO₂ e raccolte al giorno 1, 3, 5 e 7 dopo la stimolazione per la misurazione dell'attività telomerasica.

Analisi dell'attività telomerasica

La tecnica impiegata per la misurazione dell'attività telomerasica prende il nome di ddTRAP (108). Tale metodica permette l'impiego simultaneo del classico protocollo TRAP e della ddPCR.

In breve:

1) Un campione di 10⁵ PBMC sotto forma di pellet secco viene lisato per mezzo del buffer di lisi NP-40 (40 ul) e al lisato cellulare vengono aggiunti dei primer di sequenza analoga ai telomeri. Il sistema viene poi mantenuto a 25C° per 45 minuti per permettere alla telomerasi di estendere i primer (Tabella 4).

Lisato cellulare (2,500 cellule/ul)	1ul
10X TRAP Buffer	5ul
2.5mM dNTP	1ul
10uM Primer Telomerici	1ul
50mg/ml BSA	0.4ul
ddH ₂ O	41.6ul
Totale	50ul

Protocollo di reazione

25C	40min
95C	5min

Tabella 4: Protocollo di estensione dei primer telomerici ad opera della telomerasi.

2) Il campione viene poi processato mediante un “droplets generator” che lo suddivide in migliaia di microscopiche goccioline (Figura 9.1, Tabella 5). Il numero di goccioline create è pensato in modo tale da superare di gran lunga il numero di primer telomerici che sono stati eventualmente allungati dalla telomerasi. Di conseguenza, ciascuna delle gocce create contiene una sola o nessuna molecola di primer esteso dalla telomerasi.

Extension product (50 cellule/ul)	1ul
2X Evagreen ddPCR Supermix (BioRad)	10ul
10uM Primer Telomerici	0.1ul
10uM ACX	0.1ul
ddH2O	8.8ul
Totale	20ul

Tabella 5: Preparazione del campione prima della reazione operata dal “droplet generator”.

3) Il campione suddiviso in microscopiche goccioline viene processato mediante reazione di real-time PCR (Figura 9.2, Tabella 6): ogni gocciolina creata rappresenta un sistema di real-time PCR indipendente in cui potrà verificarsi l’amplificazione del templatato telomerico (gocce positive, contenenti una molecola di primer esteso dalla telomerasi) o in cui non si verificherà alcuna reazione di amplificazione (gocce negative, contenenti nessuna molecola di primer esteso dalla telomerasi).

95C	5min
95C	30s
54C	30s
72C	30s
40 cicli di reazione	40 cicli di reazione

Tabella 6: Protocollo di reazione di Real-time PCR.

4) Terminata la reazione di real-time PCR, un “droplets reader” classifica ogni gocciolina in “positiva” o “negativa” in base alla quantità di fluorescenza emessa e calcola il numero totale di gocce positive e quello di gocce negative (Figura 9.3).

Maggiore è il rapporto tra gocce positive e gocce totali maggiore è l’attività telomerasica espressa dal campione. Per elaborare e normalizzare i dati è stato poi impiegato il software “QuantaSoft”.

Dal momento che per ogni campione viene processato lo stesso numero di cellule, con questo tipo di esperimento è possibile calcolare il numero medio di molecole di telomerasi attiva presente in ogni cellula del campione.



Figura 9: Raffigurazione del “droplet generator” (1), Real-time PCR (2) e “droplet reader” (3).

Estrazione dell’RNA

L’RNA è stato estratto dai PBMC utilizzando il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, CA, USA) seguendo il protocollo fornito nel kit.

L’RNA è stato successivamente retrotrascritto utilizzando il kit iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, CA, USA) seguendo il protocollo riportato in tabella 7. Insieme all’RNA di ciascun

campione è stato retrotrascritto anche l'RNA del batteriofago MS2 che fungerà da calibratore per la normalizzazione dei dati di espressione genica di hTERT.

5X iScript reaction mix	4ul
iScript reverse transcriptase	1ul
MS2 RNA (0.8pg/ul, Roche 10165948001)	1ul
RNA template	100ng
ddH2O	Up to 14ul
Totale	20ul

Protocollo di retrotrascrizione

25C	5min
42C	30min
85C	5min

Tabella 7: Allestimento del saggio di retrotrascrizione dell'RNA

Analisi dei livelli di mRNA del gene hTERT, codificante la subunità catalitica della telomerasi.

Allo scopo di investigare l'esistenza di una correlazione tra i livelli di attività telomerasica e i livelli di mRNA della telomerasi, i livelli di mRNA della subunità catalitica della telomerasi (hTERT) sono stati misurati nei PBMC prima e dopo la stimolazione (rispettivamente al giorno 0 e al 3° giorno dopo la stimolazione).

La tecnica impiegata per misurare i livelli di mRNA di hTERT e' la ddPCR.

In breve, il cDNA ottenuto mediante retrotrascrizione è stato processato mediante un "droplets generator" che lo suddivide in migliaia di microscopiche goccioline (Figura 9.1, Tabella 8).

Analogamente a quanto già precedentemente descritto per la tecnica del ddTRAP, il numero di goccioline create è pensato in modo tale da superare di gran lunga il numero di molecole di cDNA di hTERT eventualmente contenute nel campione. Di conseguenza, ciascuna delle gocce create contiene una sola o nessuna molecola di cDNA di hTERT.

cDNA (10ng)	2ul
2X ddPCR™ Supermix for Probes (no dUTP) (BioRad 186-3025)	10ul
GOI Primer - F (10uM) (BioRad)	1ul
GOI Primer - R (10uM) (BioRad)	1ul
GOI UPL Probe (FAM) (BioRad)	0.2ul
MS2 (Assembly) Primer - F (10uM) (BioRad)	1ul
MS2 (Assembly) Primer - R (10uM) (BioRad)	1ul
REF Probe (HEX) (BioRad)	0.1ul
ddH2O	3.7ul
Totale	20ul

Tabella 8: Preparazione del campione prima della reazione operata dal “droplet generator”.

Il campione suddiviso in microscopiche goccioline è stato poi analizzato mediante reazione di real-time PCR (Figura 9.2, Tabella 9): ogni gocciolina creata rappresenta un sistema di real-time PCR indipendente in cui potrà verificarsi l’amplificazione del cDNA di hTERT (gocce positive, contenenti una molecola di cDNA di hTERT) o in cui non si verificherà alcuna reazione di amplificazione (gocce negative, contenenti nessuna molecola di cDNA di hTERT). Nello specifico, il cDNA di hTERT è stato amplificato utilizzando dei primer disegnati per appaiarsi a cavallo tra l’esone 15 e l’esone 16. La mix contiene anche una coppia di primer disegnati per amplificare il cDNA del batteriofago MS2 che fungerà da calibratore per la normalizzazione dei dati di espressione genica di hTERT.

95C	10min
94C	30s
60C	1min
x 40 cicli di reazione	
95C	30s

Tabella 9: Protocollo di reazione di Real-time PCR.

Terminata la reazione di real-time PCR, un “droplets reader” classifica ogni gocciolina in “positiva” o “negativa” in base alla quantità di fluorescenza emessa e calcola il numero totale di gocce positive e quello di gocce negative (Figura 9.3).

Maggiore è il rapporto tra gocce positive e gocce totali maggiore è il livello di mRNA di hTERT espresso dal campione. Per elaborare e normalizzare i dati è stato poi impiegato il software “QuantaSoft”.

Dal momento che per ogni campione viene amplificata la stessa quantità di cDNA (10ng), con questo tipo di metodica e’ possibile calcolare il numero totale di molecole di cDNA di hTERT presenti nel campione.

Analisi Statistica

L’analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il software SPSS (SPSS, version 21, IL, USA). I dati socio-demografici, i punteggi relativi alle performance cognitive e funzionali, le lunghezze telomeriche e i livelli di attività telomerasica e dell’ mRNA di hTERT, sono stati paragonati tra i gruppi utilizzando l’ analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

La distribuzione del sesso e l’analisi della prevalenza delle malattie età-correlate fra i gruppi sono state effettuate mediante il test del chi-quadrato (X^2 test) o mediante il test esatto di Fisher a due code per confronti fra due soli gruppi.

$p < 0.05$ è stato utilizzato come valore di significatività statistica.

RISULTATI

Caratteristiche della popolazione di studio

Le caratteristiche generali dei soggetti reclutati sono riportate in Tabella 10.

Come atteso, una differenza nell'età media è stata riscontrata tra i gruppi di studio. In particolare, i SSCENT risultano essere significativamente più vecchi rispetto ai CENT ($p < 0.001$) i quali, a loro volta, sono significativamente più anziani rispetto ai CO, CT e NLO ($p < 0.001$). Coerentemente con il modello sperimentale utilizzato, non sono emerse differenze significative fra il gruppi dei CO, dei CT e dei NLO né sull'età media ($p = 0.950$), né sulla percentuale di donne all'interno dei singoli gruppi ($p = 0.348$).

Sia i SSCENT che i CENT hanno esibito un Indice di Massa Corporea (BMI) significativamente inferiore rispetto ai CO, CT e NLO ($p < 0.001$), al contrario non è emersa nessuna differenza significativa sul BMI né dal confronto dei SSCENT e CENT ($p = 0.987$) né dal confronto fra i coetanei CO, CT ed NLO ($p = 0.973$) (Tabella 10).

Le performance cognitive, valutate mediante il test MMSE, e le performance funzionali, valutate mediante scala ADL e IADL, sono risultate essere significativamente ridotte sia nei SSCENT che nei CENT rispetto ai CO, CT e NLO ($p < 0.001$) (Tabella 10), mentre fra i tre gruppi di soggetti coetanei CO, CT ed NLO non è stata evidenziata nessuna differenza nelle performance cognitive e funzionali ($p = 0.978$). Una differenza significativa è invece emersa dal confronto diretto tra SSCENT e CENT, nel contesto del grado di decadimento cognitivo ($p < 0.001$) e funzionale (scala IADL, $p = 0.026$) (Tabella 10).

	SSCENT (n=29)	CENT (n=59)	CO (n=70)	CT (n=28)	NLO (n=35)	p value
Età, media ± D.S.	105.8 ± 1.6	100.7 ± 1.4 ^a	70.6 ± 6.9 ^{a,b}	73.1 ± 3.5 ^{a,b}	73.1 ± 7.0 ^{a,b}	<0.001
Sesso, donne, %	86.2	72.9	68.6	67.9	54.3 ^a	NS
Indice di Massa Corporea (BMI), media ± D.S.	22.0 ± 3.8	23.6 ± 3.8	26.1 ± 5.5 ^{a,b}	26.3 ± 4.5 ^{a,b}	27.7 ± 3.2 ^{a,b}	<0.001
MMSE, punteggio, media ± S.D.	11.0 ± 10.2	18.6 ± 7.2 ^a	29.3 ± 1.3 ^{a,b}	29.1 ± 1.1 ^{a,b}	28.3 ± 3.9 ^{a,b}	<0.001
Scala ADL a 6 domini, media ± D.S.	1.5 ± 1.5	2.2 ± 2.1	5.8 ± 0.4 ^{a,b}	5.7 ± 0.5 ^{a,b}	5.4 ± 1.3 ^{a,b}	<0.001
Funzionalità inalterata (punteggio ADL 5-6), %	10.3	25.4	98.6 ^{a,b}	96.4 ^{a,b}	91.4 ^{a,b}	<0.001
Moderatamente invalidi (punteggio ADL 3-4), %	6.9	8.5	1.4	3.6	2.9	NS
Invalidi (punteggio ADL 0-2), %	82.8	66.1	0.0 ^{a,b}	0.0 ^{a,b}	5.7 ^{a,b}	<0.001
Scala IADL a 8 domini, media ± D.S.	0.8 ± 1.8	2.0 ± 2.8 ^a	7.9 ± 0.2 ^{a,b}	7.7 ± 0.4 ^{a,b}	7.5 ± 1.5 ^{a,b}	<0.001
Soggetti con perfette o buone abilità funzionali (punteggio IADL 4-8), %	6.9	27.1 ^a	100 ^{a,b}	100 ^{a,b}	94.3 ^{a,b}	<0.001
Soggetti con nessuna o scarse abilità funzionali (punteggio IADL 0-3), %	93.1	72.9 ^a	0.0 ^{a,b}	0.0 ^{a,b}	6.1 ^{a,b}	<0.001

a p<0.05 vs SSCENT

b p<0.05 vs CENT

NS non significativo

Tabella 10: Caratteristiche generali, performance cognitive e performance funzionali dei semisupercentenari (SSCENT), centenari (CENT), figli di centenari (CO), figli di individui morti entrambi ad un'età in linea con l'aspettativa di vita media (CT) e figli di genitori entrambi non longevi (NLO).

Valutazione dello stato di salute dei soggetti arruolati

La prevalenza delle principali malattie età-correlate nei gruppi analizzati è riportata in Tabella 11. L'analisi dei dati biometrici e delle informazioni anamnestiche ha permesso di identificare alcune differenze tra le popolazioni selezionate per lo studio.

In generale, i CENT sono risultati essere il gruppo con il peggiore stato di salute poiché hanno un'incidenza significativamente maggiore di ictus ($p < 0.001$), infarto ($p = 0.025$), scompenso cardiaco ($p < 0.001$), aritmia ($p < 0.001$), angina ($p < 0.001$), ipertensione ($p < 0.001$), BPCO ($p < 0.001$), demenza ($p < 0.001$) e artrosi ($p = 0.002$) rispetto ai tre gruppi di soggetti coetanei CO, CT ed NLO (Tabella 5). Inoltre, i CENT hanno mostrato una maggiore prevalenza di infarto ($p = 0.027$), angina ($p = 0.016$) e depressione ($p = 0.021$) rispetto ai SSCENT (Tabella 5). Tuttavia, il gruppo dei SSCENT è risultato essere quello con la maggiore incidenza di declino cognitivo e demenza ($p < 0.001$). Molto interessanti sono i risultati del confronto fra i SSCENT ed i più giovani CT ed NLO, infatti non sono emerse differenze significative in merito alla prevalenza di patologie età-correlate, eccetto che per la demenza ($p < 0.001$) e per l'aritmia rispetto ai CT ($p = 0.013$) (Tabella 11). Al contrario, i SSCENT presentano uno stato di salute di gran lunga peggiore rispetto ai CO i quali hanno mostrato una minore prevalenza di ictus ($p = 0.008$), scompenso cardiaco ($p = 0.025$), aritmia ($p = 0.002$), ipertensione ($p = 0.027$), BPCO ($p = 0.007$) e demenza ($p < 0.001$) (Tabella 11).

Il confronto diretto fra i tre gruppi di soggetti coetanei CO, CT ed NLO, ha prodotto notevoli differenze riguardo allo stato generale di salute e alla eventuale presenza delle patologie prese in esame. In particolare i NLO, i cui genitori sono i meno longevi, hanno la più alta prevalenza di malattie, tra cui aritmia ($p < 0.001$) e ipertensione ($p < 0.001$) rispetto sia ai CO che ai CT

(Tabella 11). In aggiunta, i NLO hanno una maggior prevalenza di BPCO ($p=0.041$), e assumono cronicamente un più alto numero di farmaci ($p=0.023$) rispetto ai CO, i cui genitori sono i più longevi.

Il confronto diretto tra CO e CT non ha invece evidenziato differenze significative per quanto riguarda la prevalenza di patologie età-correlate.

Infine, è stato calcolato il numero medio di malattie di cui i soggetti di ogni gruppo sono affetti. Coerentemente con i dati sopra riportati, i CO sono affetti da un più basso numero di malattie per individuo rispetto ai SSCENT ($p=0.008$), CENT ($p<0.001$), e NLO ($p=0.021$). In contrasto, i CENT sono caratterizzati invece da un più alto numero di malattie per individuo rispetto a CO ($p<0.001$), CT ($p=0.003$), e NLO ($p=0.011$). Nessuna differenza significativa è emersa invece nè tra i SSCENT rispetto ai CENT ($p=0.508$), né tra i CO ed i CT ($p=0.214$) (Tabella 11).

Valutazione dello stato di salute	SSCENT (n=29)	CENT (n=59)	CO (n=70)	CT (n=28)	NLO (n=35)	p value
Storia di cancro, %	6.9	15.5	14.7	26.9	14.7	NS
Ictus, %	24.1	39.0	4.5 ^{a,b}	11.5 ^b	12.1 ^b	<0.001
Infarto acuto del miocardio (AMI), %	6.9 ^b	28.8	13.2 ^b	3.8 ^b	14.7	0.025
Scompenso cardiaco, %	10.3	25.4	0.0 ^{a,b}	3.8 ^b	5.9 ^b	<0.001
Aritmia, %	31.0	30.5	5.9 ^{a,b,c}	3.8 ^{a,b,c}	25.7	<0.001
Angina, %	3.4 ^b	25.4	7.4 ^b	0.0 ^b	5.9 ^b	0.001
Ipertensione, %	58.6	72.4	33.8 ^{a,b,c}	46.2 ^{b,c}	71.4	<0.001
Bronco Polmonite Cronica Ostruttiva (BPCO), %	13.8	22.0	0 ^{a,b,c}	3.8 ^b	11.8	0.001
Demenza, %	69.0	37.9 ^a	0 ^{a,b}	0 ^{a,b}	2.9 ^{a,b}	<0.001
Depressione, %	10.3 ^b	33.9	23.5	30.8	32.4	NS
Diabete mellito, %	7.2	5.1	8.8	3.8	11.8	NS
Osteoporosi, %	24.1	22.4	20.6	26.9	32.4	NS
Artrosi, %	55.2	67.8	36.8 ^b	30.8 ^b	52.9	0.002
Soggetti in trattamento farmacologico cronico, %	89.7	96.6	79.4 ^{b,c}	83.3 ^{b,c}	100	0.005
Numero di farmaci assunti quotidianamente, media ± D.S.	5.1 ± 4.1	5.4 ± 3.6	2.7 ± 2.6 ^{a,b,c}	3.0 ± 2.3 ^b	4.6 ± 3.2	<0.001
Numero di malattie coesistenti per individuo, media ± D.S.	3.3 ± 1.8	4.2 ± 2.2	1.6 ± 1.5 ^{a,b,c}	2.3 ± 1.1 ^b	2.9 ± 1.8 ^b	<0.001

a p<0.05 vs SSCENT

b p<0.05 vs CENT

c p<0.05 vs NLO

NS non significativo

Tabella 11: Prevalenza delle principali malattie età-correlate e terapia farmacologica nei semisupercentenari (SSCENT), centenari (CENT), figli di centenari (CO), figli di individui morti entrambi ad un'età in linea con l'aspettativa di vita media (CT) e figli di genitori entrambi non longevi (NLO).

Analisi della lunghezza telomerica

La lunghezza telomerica (media \pm D.S.) per i SSCENT, CENT, CO, CT and NLO è risultata essere rispettivamente di 0.65 ± 0.16 , 0.97 ± 0.11 , 1.15 ± 0.30 , 0.97 ± 0.19 and 0.98 ± 0.14 (Figura 10).

Il gruppo dei CO, risulta avere una maggiore lunghezza telomerica non solo rispetto ai SSCENT ($p < 0.001$) e CENT ($p = 0.002$) ma anche rispetto ai CT ($p = 0.014$) ed i NLO ($p = 0.008$) (Figura 10). Al contrario, i SSCENT hanno telomeri significativamente più corti rispetto a quelli degli altri gruppi di studio ($p < 0.001$). Molto interessante è stato notare come non siano emerse differenze significative nella lunghezza telomerica né tra i CENT e i CT ($p = 0.997$), né tra i CENT e i NLO ($p = 0.989$), sebbene l'età media di CT e NLO sia di circa 30 anni inferiore rispetto all'età dei CENT (Figura 10).

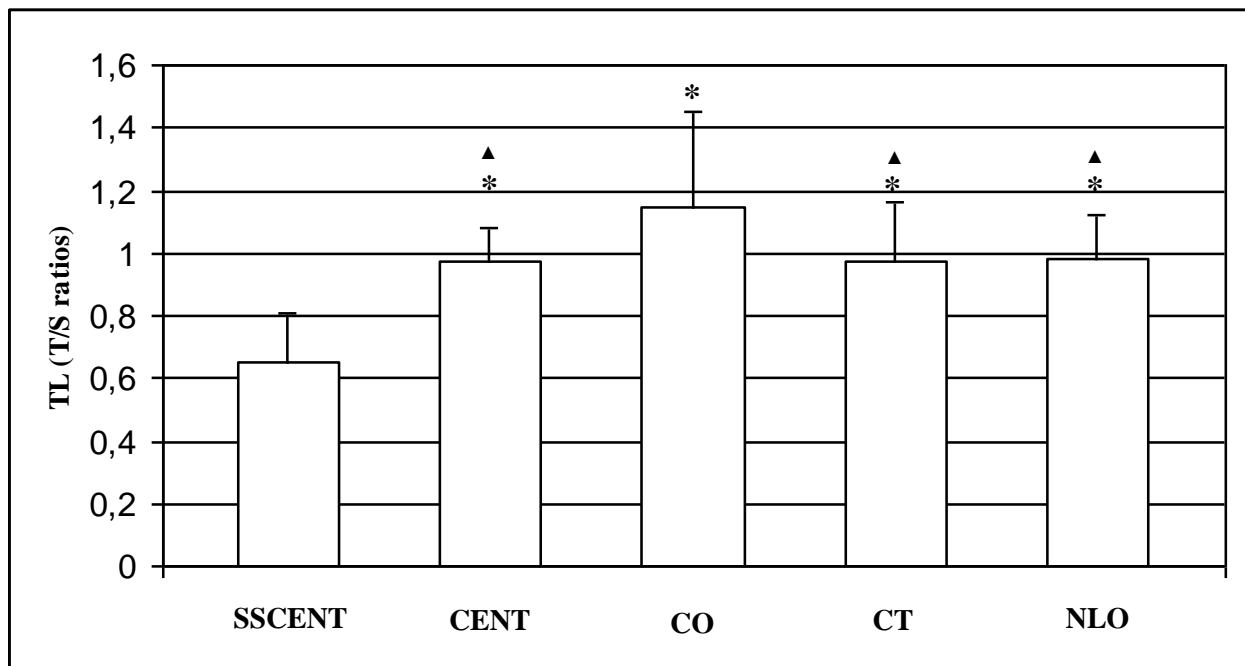


Figura 10: Confronto della lunghezza telomerica media dei semisupercentenari (SSCENT), centenari (CENT), figli di centenari (CO), figli di individui morti entrambi ad un'età in linea con l'aspettativa di vita media (CT) e figli di genitori entrambi non longevi (NLO). * $p < 0.05$ vs SSCENT; ▲ $p < 0.05$ vs CO

Studi in letteratura hanno evidenziato che gli individui in grado di raggiungere età estreme, come i semisupercentenari e i centenari, sono prevalentemente donne (109). Nonostante la nostra popolazione di studio sia composta per lo più da donne (70%), abbiamo trovato una differenza significativa nella prevalenza di donne soltanto fra i gruppo dei SSCENT ed il gruppo dei CT ($p=0.032$) (Tabella 10). Pertanto, allo scopo di confermare le differenze nella lunghezza telomerica osservate dal precedente confronto dei vari gruppi di studio, abbiamo ripetuto l'analisi nelle sole donne. La lunghezza telomerica delle donne (media \pm D.S.) per i SSCENT, CENT, CO, CT and NLO è risultata essere rispettivamente di 0.66 ± 0.16 , 1.00 ± 0.12 , 1.28 ± 0.24 , 0.95 ± 0.18 and 0.99 ± 0.18 (Figura 11). Alla luce di questa nuova analisi, le differenze significative per quanto riguarda la lunghezza telomerica nei gruppi di studio sono rimaste invariate (Figura 11).

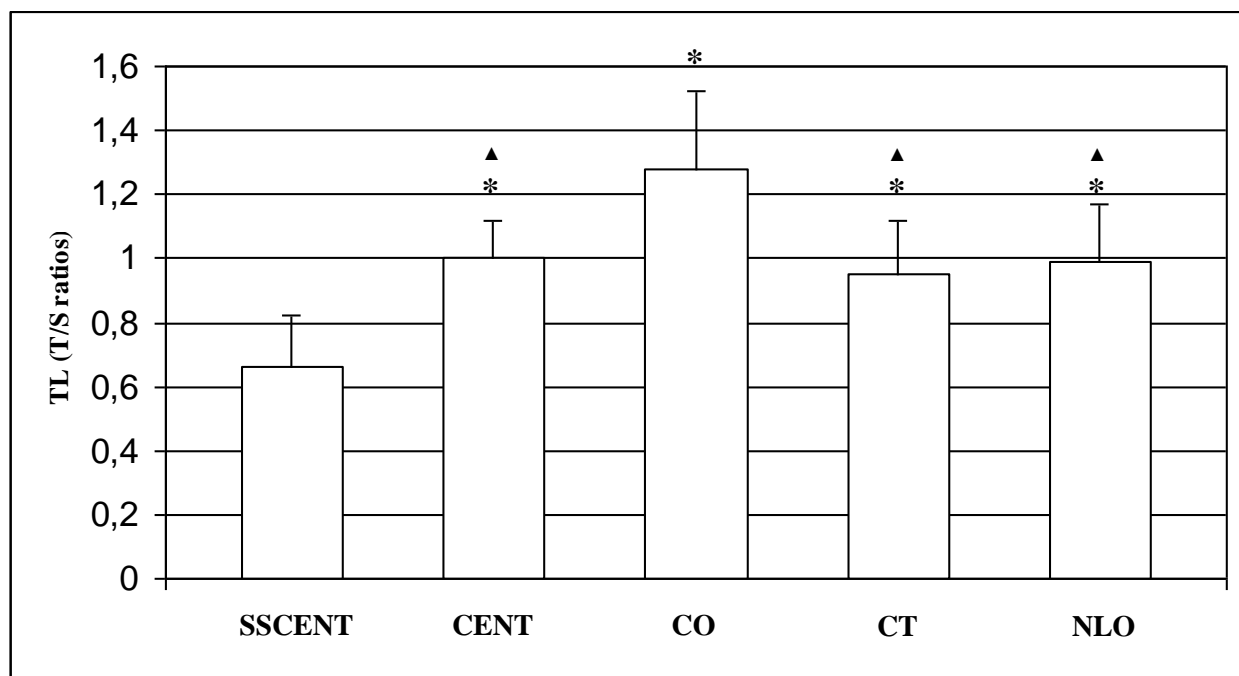


Figura 11: Confronto della lunghezza telomerica media nelle femmine dei semisupercentenari (SSCENT), centenari (CENT), figli di centenari (CO), figli di individui morti entrambi ad un'età in linea con l'aspettativa di vita media (CT) e figli di genitori entrambi non longevi (NLO). * $p < 0.05$ vs SSCENT; ▲ $p < 0.05$ vs CO.

Analisi dell'attività telomerasica

Questo tipo di indagine è stata resa possibile grazie alla collaborazione con il laboratorio di biologia cellulare dello UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA. Al momento, sono stati raccolti soltanto dei dati preliminari relativi al gruppo dei SSCENT e dei CO.

L'attività telomerasica è stata misurata nei PBMC al giorno 1, 3, 5 e 7 dopo la stimolazione. Per ogni campione è stato selezionato il valore massimo di attività telomerasica raggiunto durante il periodo di stimolazione e i due gruppi in esame sono stati confrontati.

L'attività telomerasica (media \pm D.S.) per i SSCENT e CO è risultata essere rispettivamente di 13.0 ± 5.1 e 1.9 ± 0.7 (Figura 12).

Sorprendentemente, i PBMC stimolati dei SSCENT hanno mostrato un'attività telomerasica significativamente maggiore rispetto ai PBMC stimolati dei CO ($p=0.031$) (Figura 12).

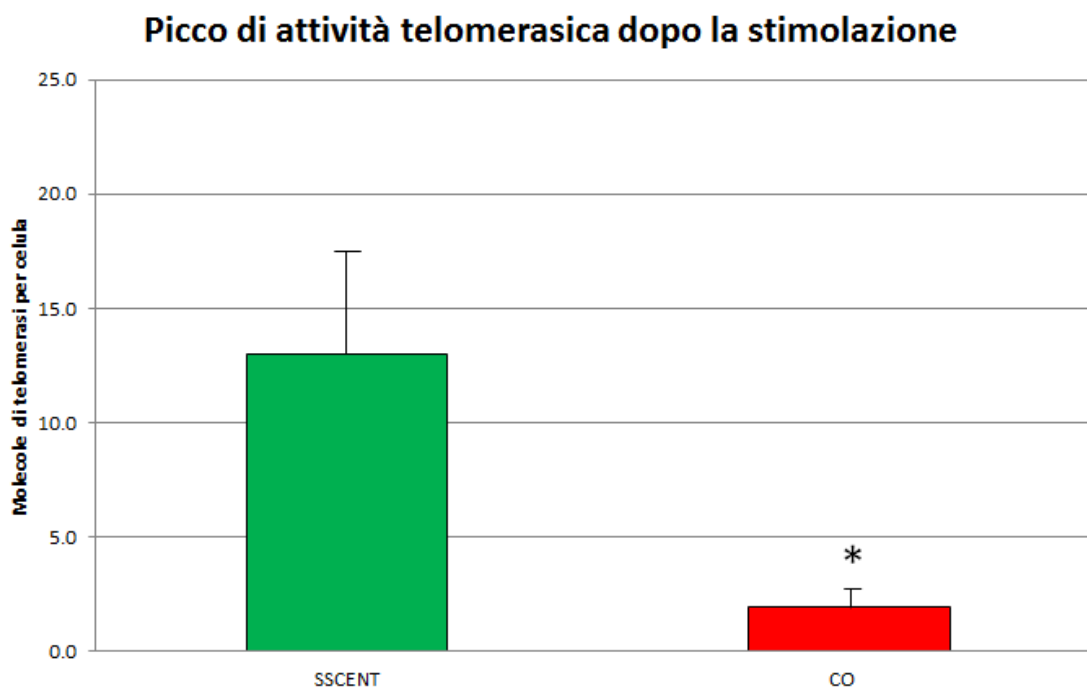


Figura 12: Confronto dell'attività telomerasica fra il gruppo dei semisupercentenari (SSCENT) ed il gruppo dei figli di centenari (CO). * $p < 0.05$ vs SSCENT

Analisi dei livelli di espressione del gene hTERT

Questo tipo di indagine è stata resa possibile grazie alla collaborazione con il laboratorio di biologia cellulare dello UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA. Al momento, sono stati raccolti soltanto dei dati preliminari relativi al gruppo dei SSCENT e dei CO.

I livelli di mRNA del gene hTERT sono stati misurati nei PBMC al giorno 0 (prima della stimolazione) e al giorno 3 (dopo la stimolazione).

Il livello di mRNA del gene hTERT (media \pm D.S.) per i SSCENT risultata essere di 7.1 ± 2.3 e 24.3 ± 3.9 rispettivamente per il giorno 0 e giorno 3, mentre per i CO risulta essere di 6.8 ± 1.6 e 11.8 ± 2.9 rispettivamente per il giorno 0 e giorno 3 (Figura 13).

In linea con i dati relativi all'attività telomerasica, i PBMC stimolati dei SSCENT esprimono più alti livelli di mRNA di hTERT rispetto ai PBMC stimolati dei CO ($p=0.043$) (Figura 13).

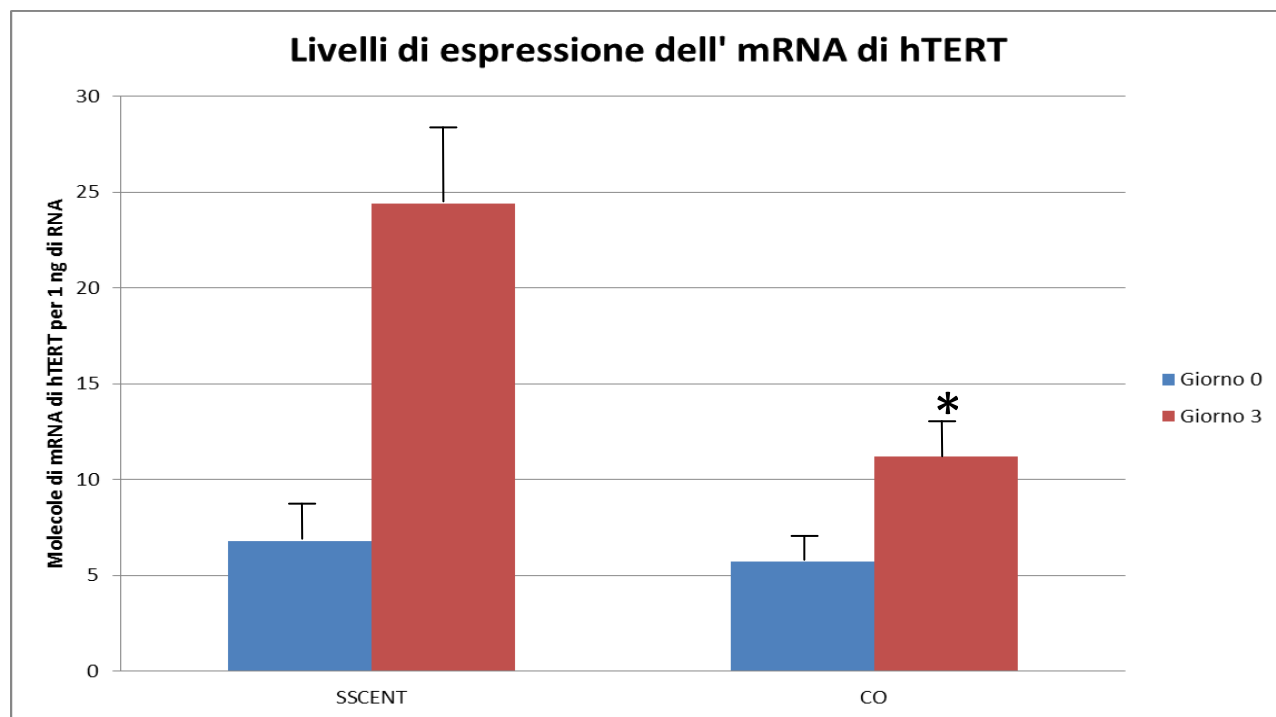


Figura 13: Confronto dei livelli di mRNA di hTERT fra il gruppo dei semisupercentenari (SSCENT) ed il gruppo dei figli di centenari (CO). * $p < 0.05$ vs SSCENT.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato come gli individui con genitori longevi non solo vivano più a lungo ma evidenzino anche un diminuito rischio di sviluppare patologie legate all'invecchiamento. La popolazione dei figli di centenari ha infatti mostrato una più bassa incidenza di patologie come ictus, infarto, ipertensione e diabete (110-112) e si è distinta per quello che viene definito *healthy aging* ovvero l'invecchiamento in buona salute. L'invecchiamento in buona salute e la maggior aspettativa di vita hanno inoltre qualificato i figli di centenari come ottimo modello per lo studio dell'invecchiamento e per la determinazione delle caratteristiche legate alla longevità. Benché numerosi studi abbiano impiegato questo modello, confrontando i figli dei centenari con individui appartenenti alla popolazione generale, negli ultimi anni è progressivamente emersa l'esigenza di sviluppare un modello sperimentale più estremo, che permettesse di evidenziare maggiormente eventuali differenze legate all'invecchiamento ed alla longevità. A tale scopo, è stato proposto uno *study design* che prevedeva di selezionare e studiare, oltre alla popolazione dei figli di centenari, anche altre due popolazioni di controllo, una costituita dai figli di genitori morti ad un'età in linea con l'aspettativa di vita media, l'altra costituita da un gruppo di anziani aventi una bassa aspettativa di vita, in quanto nati da genitori entrambi non longevi e morti precocemente per cause non accidentali. Il confronto diretto tra queste tre categorie di soggetti anziani, distinguibili esclusivamente per le diverse aspettative di vita, ha permesso di studiare ulteriormente i determinanti dell'invecchiamento in buona salute e della longevità.

Effettivamente i gruppi dei CO, CT e NLO sono risultati essere comparabili per età, sesso, BMI, stato cognitivo e funzionale. Tuttavia, i nostri dati indicano come i CO risultino avere un migliore stato di salute rispetto ai CT i quali, a loro volta, mostrano una minore prevalenza di

patologie età-correlate rispetto ai NLO, supportando l'ipotesi che la longevità dei genitori potrebbe influire sullo stato di salute dei loro figli.

Dal momento che alcuni studi hanno riportato che i centenari e i loro figli tendono, in linea generale, a seguire un corretto stile di vita (113,114), abbiamo esaminato la nostra popolazione di studio riguardo il consumo di alcolici e la prevalenza di fumatori. Molto interessante è stato notare come non siano emerse differenze significative tra CO, CT e NLO riguardo a queste due variabili legate allo stile di vita, suggerendo che la bassissima prevalenza di patologie età-correlate riscontrata nei CO potrebbe non dipendere da uno stile di vita più salutare.

I nostri risultati, che identificano i CO come individui caratterizzati da un migliore invecchiamento e stato di salute, sono in linea con i dati provenienti da studi precedenti e supportano ulteriormente l'ipotesi che la longevità è spesso una caratteristica di alcune famiglie peculiari, composte da individui in grado di sopravvivere fino ad un'età di gran lunga superiore all'aspettativa di vita media (115,116).

Recentemente, è stato ipotizzato che i centenari potrebbero essere caratterizzati da meccanismi "protettivi" verso la patogenesi delle principali malattie età-correlate. Questa teoria deriva dall'osservazione che l'età di esordio di tali patologie è notevolmente maggiore negli individui che raggiungono età estreme rispetto alla popolazione comune e che questo effetto risulta tanto più marcato quanto maggiore è l'età raggiunta da un determinato individuo (117).

Coerentemente con tale ipotesi, i nostri risultati mostrano una più bassa (seppur lieve) prevalenza di patologie nei SSCENT rispetto ai CENT. Tuttavia, i SSCENT esibiscono il più alto grado di decadimento cognitivo e funzionale.

Il nostro studio prevedeva inoltre il confronto fra i vari gruppi della lunghezza telomerica, il più noto marker di invecchiamento e mortalità. In questo contesto, è stato molto interessante notare come i CO e i SSCENT hanno mostrato rispettivamente i telomeri più lunghi e più corti. Sorprendentemente, non è emersa nessuna differenza significativa in lunghezza telomerica tra i gruppi dei CENT, CT e NLO. Dal momento che la lunghezza dei telomeri è comunemente considerata anche un marker di età biologica (118,119), i nostri risultati suggeriscono come sia i CENT che i CO potrebbero essere caratterizzati da una minor età biologica rispetto alla loro età cronologica. In linea con la nostra osservazione, in famiglie caratterizzate da estrema longevità sono state descritte delle varianti genetiche peculiari nel gene hTERT che potrebbero presumibilmente essere associate ad una diminuzione della velocità di accorciamento telomerico (120).

In aggiunta, un recente studio genome-wide ha dimostrato nei CO ma non nei NLO l'ipermetilazione di un caratteristico sottogruppo di geni implicati nella sintesi di DNA/RNA e nel metabolismo, suggerendo che specifici pattern epigenetici volti a rallentare il tasso metabolico e di crescita cellulare potrebbero predisporre alla longevità (121). Infatti, un elevato tasso metabolico porta ad una over-produzione di radicali liberi i quali, a loro volta, sono ritenuti essere tra i principali responsabili del precoce accorciamento telomerico, invecchiamento cellulare ed esordio di malattie età-correlate. (122-125).

Presi nel loro insieme, i nostri dati supportano l'ipotesi che sia i CENT che i CO potrebbero essere caratterizzati da un miglior meccanismo di mantenimento della lunghezza telomerica che, a sua volta, potrebbe contribuire alla loro longevità ed invecchiamento in buona salute.

La diminuzione della lunghezza telomerica di circa il 30% tra i SSCENT e i CENT in un arco di tempo di soli 5 anni è sorprendente. Recentemente, è stato ipotizzato che il progressivo calo del potenziale replicativo e delle capacità adattative associato con l'invecchiamento potrebbe portare, nel momento in cui si raggiunge il limite massimo di vita consentito, all'esaurimento delle capacità d'organo oltre che a quelle cognitive e funzionali (117). In effetti, i SSCENT potrebbero essere individui che sono molto vicini a tale limite. Coerentemente con questa ipotesi, la più bassa lunghezza telomerica dei SSCENT rispetto ai CENT potrebbe riflettere un progressivo deterioramento dei meccanismi di mantenimento dei telomeri durante la transizione da "semplici" centenari a semisupercentenari. In aggiunta, nel corso degli ultimi anni, i PBMC sono stati sempre di più considerati come marker periferici che potrebbero "rispecchiare" alterazioni a livello di vari sistemi e organi (126) e secondo questa ipotesi tali cellule potrebbero pertanto essere fortemente stimolate al raggiungimento di età estreme. Tuttavia, in letteratura non esistono né precedenti indagini volte alla valutazione della lunghezza telomerica nei SSCENT né studi longitudinali finalizzati allo studio dei cambiamenti della lunghezza dei telomeri in individui di tale longevità. Risulta pertanto estremamente difficile stabilire se i SSCENT reclutati hanno subito un drastico e repentino accorciamento telomerico nel corso di pochissimi anni. I dati preliminari raccolti sui SSCENT nel contesto dei livelli di espressione genica del gene hTERT e dei livelli di attività telomerasica suggeriscono che i PBMC stimolati di tali individui sarebbero in grado di riattivare transitoriamente la telomerasi in misura maggiore rispetto ai CO, presumibilmente in quanto capaci di esprimere più alti livelli del trascritto di hTERT. Come precedentemente ipotizzato per altre patologie (127), l'up-regolazione della telomerasi potrebbe, in alcuni casi, costituire una sorta di

meccanismo “compensatorio” messo in atto dalla cellula nel tentativo di controbilanciare un accorciamento telomerico troppo repentino o al raggiungimento di telomeri criticamente corti.

In conclusione, sebbene questo studio abbia permesso di trovare una netta associazione tra la longevità dei genitori e lo stato di salute dei figli, sono necessarie indagini più approfondite e su una casistica più ampia per caratterizzare e descrivere dettagliatamente i meccanismi alla base della longevità e dell’invecchiamento in buona salute.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Salvioli S, Olivieri F, Marchegiani F, Cardelli M, Santoro A, Bellavista E, Mishto M, Invidia L, Capri M, Valensin S, Sevini F, Cevenini E, Celani L, Lescai F, Gonos E, Caruso C, Paolisso G, De Benedictis G, Monti D, Franceschi C. Genes, ageing and longevity in humans: problems, advantages and perspectives. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1303-23.
- 2) Syme SL, Berkman LF. Social class, susceptibility and sickness. *Am J Epidemiol.* 1976;104(1):18.
- 3) Butler RN. Aging: research leads and needs. *Forum Med.* 1979;2(11):716-25.
- 4) Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010;65(10):1028-41.
- 5) Thomson AB. Small intestinal disorders in the elderly. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2009;23(6):861-74.
- 6) Mironov S. Respiratory circuits: function, mechanisms, topology, and pathology. *Neuroscientist.* 2009;15(2):194-208.
- 7) Passeri G, Vescovini R, Sansoni P, Galli C, Franceschi C, Passeri M; Calcium metabolism and vitamin D in the extreme longevity. Italian Multicentric Study on Centenarians (IMUSCE). *Exp Gerontol.* 2008;43(2):79-87.
- 8) Strax TE, Luciano L, Dunn AM, Quevedo JP. Aging and developmental disability. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2010;21(2):419-27.
- 9) Perls T, Puca A. Pharmacogenomics. The genetics of aging implications for pharmacogenomics. 2002;3(4):469-84.
- 10) Perls T, Kunkel L, Puca A. The genetics of aging. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12(3):362-9.
- 11) Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H, Joyce E, Brewster S, Kunkel L, Puca A. Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8442-7.
- 12) Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* 1993;366(6454):461-4.

- 13)** Trinei M, Berniakovich I, Beltrami E, Migliaccio E, Fassina A, Pelicci P, Giorgio M. P66Shc signals to age. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(6):503-10.
- 14)** Rogina B, Reenan RA, Nilsen SP, Helfand SL. Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science*. 2000;290(5499):2137-40.
- 15)** Musarò A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL, Rosenthal N. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet*. 2001;27(2):195-200.
- 16)** Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dillin A, Kenyon C. Regulation of life-span by germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2002;295:502-5.
- 17)** Sgro CM, Partridge L. A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science*. 1999;286:2521-4.
- 18)** Kirkwood TB. Evolution of ageing. *Nature*. 1977;270:301-4.
- 19)** Miwa S, Riyahi K, Partridge L, Brand MD. Lack of correlation between mitochondrial reactive oxygen species production and life span in *Drosophila*. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1019:388-91.
- 20)** Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37:614-36.
- 21)** Finch CE. *Longevity, Senescence and the Genome*. Chicago: University of Chicago Press 1990.
- 22)** N. Ferrara, G. Corbi, D. Scarpa, G. Rengo, G. Longobardi, F. Mazzella, F. Cacciatore, F. Rengo G. The aging theories. *GERONTOL* 2005;53:57-74.
- 23)** Human Mortality Database. (<http://www.mortality.org/>)
- 24)** Gavrilova NS, Gavrilov LA. Search for mechanisms of exceptional human longevity. *Rejuvenation Res*. 2010;13(2-3):262-4.
- 25)** Shukla S, Acharya S, Rajput D, Vagha S, Grover S. Telomere-the twilight to immortality. *J Assoc Physicians India*. 2010;58:553-60.

- 26) Sugimoto K. Telomere maintenance by DNA damage response machinery. *Seikagaku*. 2010;82(12):1145-50.
- 27) Dahlman D, Fyhrquist F, Nilsson PM. Telomeres, aging and life style research with contradictory finding. *Lakartidningen*. 2010;107(48):3053-5.
- 28) Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*. 1978;120(1):33-53.
- 29) McClintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*. 1941; 26:234-282; 108.
- 30) Haber J.E, Thorburn P.C. Healing of broken linear dicentric chromosome in yeast. *Genetics*. 1984;106:207-226.
- 31) McKenzie K.E, Umbricht C.B, Sukumar S. Applications of telomerase research in the fight against cancer. *Mol. Med. Today*. 1999;5:114-122.
- 32) Blackburn E.H. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991;350:569-573.
- 33) de Lange T., Shiue L., Myers R.M., Cox D.R., Naylor S.L, Killery A.M, Varmus H.E. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol*. 1990;10:518-527.
- 34) Chatziantonou V. Telomerase: biological function and potential role in cancer management. *Pathol. Oncology Res*. 2001;7:161-170.
- 35) Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*. 1992;225(4):951-60.
- 36) Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001;106(6):661-73.
- 37) Meyerson M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *Journal of Clin. Oncol*. 2000;18:2626-2634.
- 38) Calado RT. Telomeres and marrow failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:338-43.

- 39)** Hayflick L. The cell biology of aging. *Clin Geriatr Med.* 1985;1(1):15-27.
- 40)** Hayflick L. Recent advances in the cell biology of aging. *Mech Ageing Dev.* 1980;14(1-2):59-79.
- 41)** Zhu H, Belcher M, van der Harst P. Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clin Sci (Lond).* 2011;120(10):427-40.
- 42)** Guillouf C, Rosselli F, Krishnarayu K, Moustacchi E, Hoffman B, Liebermann D.A. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damageinduced apoptosis. *Oncogene.* 1995;10:2263-2270.
- 43)** Gottlieb T.M. and Oren M. p53 and apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 1998;8:359-368;109.
- 44)** Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;41(1):29-40.
- 45)** Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):10114-8;
- 46)** Hastie N.D, Dempster M, Dunlop M.G, Thompson A.M, Green D.K, Allshire R.C. Telomere seduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature.* 1990;346:866-868.
- 47)** Harley C.B, Futcher A.B, Greider C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345:458-460.
- 48)** Moyzis R.K, Buckingham J.M, Cram L.S, Dani M, Deaven L.L, Jones M.D, Meyne J, Ratliff R.L, Wu J.R. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988,85:6622-6626.
- 49)** Wyatt HD, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(17):5609-22.

- 50)** O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(3):171-81.
- 51)** Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009;361(24):2353-65.
- 52)** Young NS. Telomere biology and telomere diseases: implications for practice and research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:30-5.
- 53)** de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005;19(18):2100-10.
- 54)** Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T. A human telomeric protein. *Science.* 1995;270(5242):1663-7.
- 55)** Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet.* 1997;17(2):231-5.
- 56)** Van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature.* 1997;385:740-743.
- 57)** Van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 1998;92:401-413.
- 58)** Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(19):5402-15.
- 59)** Parkinson GN, Lee MP, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature.* 2002;417(6891):876-80.
- 60)** Morin G.B. The human telomerase terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* 1989;59:521-529.
- 61)** Harrington L., Zhou W., McPhail T., Oulton R., Yeung D.S., Mar V., Bass M.B., Robinson M.O. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.* 1997;11:3109-3115;

- 62)** Mabruk M.J. and O. Flatharta C. Telomerase: is it the future diagnostic and prognostic tool in human cancer? *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2005;5: 907-916.
- 63)** Yui J., Chiu C.P., Lansdorp P.M. Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood.* 1998;91:3255-3262.
- 64)** Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science.* 1997;276(5312):561-7.
- 65)** Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet.* 1999;8:137-142.
- 66)** Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu. Rev. Biochem.* 2006;75:493-517.
- 67)** Feng J, Funk W.D, Wang S.S., Weinrich S.L, Avilion A.A, Chiu C.P, Adams R.R, Chang E, Allsopp R.C, Yu J, et al. The RNA component of human telomerase. *Science.* 1995;269:1236-1241.
- 68)** Cairney CJ, Keith WN. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie.* 2008;90(1):13-23.
- 69)** Terrin L, Rampazzo E, Pucciarelli S, Agostini M, Bertorelle R, Esposito G, DelBianco P, Nitti D, De Rossi A. Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin Cancer Res.* 2008;14(22):7444-51.
- 70)** Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* 1997;277(5328):955-9.
- 71)** Zhang A, Zheng C, Lindvall C, Hou M, Ekedahl J, Lewensohn R, Yan Z, Yang X, Henrikson M, Blennow E, Nordenskjold M, Zetterberg A, Bjorkholm M, Gruber A, Xu D. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res.* 2000;60:6230-6235.

- 72)** Sikand K, Kaul D, Varma N. Receptor Ck-dependent signaling regulates hTERT gene transcription. *BMC Cell Biol.* 2006;7:2.
- 73)** Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene.* 1999;232(1):97-106.
- 74)** Chang JT, Lu YC, Chen YJ, Tseng CP, Chen YL, Fang CW, Cheng AJ. hTERT phosphorylation by PKC is essential for telomerase holoprotein integrity and enzyme activity in head neck cancer cells. *Br J Cancer.* 2006;94(6):870-8.
- 75)** Ku WC, Cheng AJ, Wang TC. Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;241(3):730-6.
- 76)** Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13085-90.
- 77)** Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 1998;58(18):4168-72.
- 78)** Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development. *Int J Cancer.* 2001;91(5):644-9.
- 79)** Mu and Wei, 2002; Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Tissue-specific alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) influences telomere lengths during human development. *Int J Cancer.* 2001;91(5):644-9.
- 80)** Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S, Yamakido M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 1995;155(8):3711-5.
- 81)** Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005;6(8):611-22.

- 82)** Huzen J, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, van der Harst P. Telomeres and biological ageing in cardiovascular disease. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2008;152(22):1265-70.
- 83)** Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol.* 2008;165,14-21.
- 84)** Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1019,278-284.
- 85)** Fillit HM, Butler RN, O'Connell AW, Albert MS, Birren JE, Cotman CW, Greenough WT, Gold PE, Kramer AF, Kuller LH, Perls TT, Sahagan BG, Tully T.. Achieving and maintaining cognitive vitality with aging. *Mayo Clin Proc.* 2002;77:681-96.
- 86)** Harman D. Role of free radicals in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1992;673:126-41.
- 87)** Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:205-14.
- 88)** Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 2002;27:339-44.
- 89)** Saretzki G, Von Zglinicki T. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;959:24-9.
- 90)** Lorenz M, Saretzki G, Sitte N, Metzkow S, von Zglinicki T. BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:824-31.
- 91)** Tamura Y, Izumiyama-Shimomura N, Kimbara Y, Nakamura KI, Ishikawa N, Aida J, Chiba Y, Mori S, Arai T, Aizawa T, Araki A, Takubo K, Ito H. Beta Cell Telomere Attrition in Diabetes: Inverse Correlation Between HbA1c and Telomere Length. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 doi: 10.1210/jc.2014-1222.
- 92)** The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012, World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

- 93)** Decramer M, Janssens W, Miravitlles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2012;379(9823):1341-51.
- 94)** Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2007;176(6):532-55.
- 95)** Cherkas LF, Aviv A, Valdes AM, Hunkin JL, Gardner JP, Surdulescu GL, Kimura M, Spector TD. The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging Cell*. 2006;5:361-5.
- 96)** Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*. 2005;366:662-4.
- 97)** von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*. 2005;5:197-203.
- 98)** Cassidy A, De Vivo I, Liu Y, Han J, Prescott J, Hunter DJ, Rimm EB. Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women. *Am J Clin Nutr*. 2010;91:1273-80.
- 99)** 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.
- 100)** Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, Maitre B, Chaar V, Validire P, Stern JB, Noureddine H, Sapin E, Rideau D, Hue S, Le Corvoisier P, Le Gouvello S, Dubois-Randé JL, Boczkowski J, Adnot S. Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:1358-66.
- 101)** Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:886-93.
- 102)** Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res*. 1975;12(3):189-198.

- 103)** Lawton MP, Brody EM. Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist*. 1969;9(3):179–186.
- 104)** Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of illness in the aged. The index of ADL: a standardized measure of biological and psychological function. *JAMA*. 1963;185:914–919.
- 105)** Yesavage JA. Direct and indirect hostility and self-destructive behavior by hospitalized depressives. *Acta Psychiatr Scand*. 1983;68(5):345-50.
- 106)** Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10), e47.
- 107)** Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(6), e45.
- 108)** Ludlow AT, Robin JD, Sayed M, Litterst CM, Shelton DN, Shay JW, Wright WE. Quantitative telomerase enzyme activity determination using droplet digital PCR with single cell resolution. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(13):e104.
- 109)** Franceschi C, Motta L, Valensin S, Rapisarda R, Franzone A, Berardelli M, Motta M, Monti D, Bonafè M, Ferrucci L, Deiana L, Pes GM, Carru C, Desole MS, Barbi C, Sartoni G, Gemelli C, Lescai F, Olivieri F, Marchegiani F, Cardelli M, Cavallone L, Guerresi P, Cossarizza A, Troiano L, Pini G, Sansoni P, Passeri G, Lisa R, Spazzafumo L, Amadio L, Giunta S, Stecconi R, Morresi R, Viticchi C, Mattace R, De Benedictis G, Baggio G. Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian Multicentric Study on Centenarians (IMUSCE). *Aging (Milano)*. 2000;12(2):77-84.
- 110)** Terry DF, Wilcox MA, McCormick MA, Pennington JY, Schoenhofen EA, Andersen SL, Perls TT. Lower all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in centenarians' offspring. *J Am Geriatr Soc*. 2004;52(12):2074-6.
- 111)** Terry DF, Evans JC, Pencina MJ, Murabito JM, Vasan RS, Wolf PA, Kelly-Hayes M, Levy D, D'Agostino RB Sr, Benjamin EJ. Characteristics of Framingham offspring participants with long-lived parents. *Arch Intern Med*. 2007;167(5):438-44.
- 112)** Adams ER, Nolan VG, Andersen SL, Perls TT, Terry DF. Centenarian offspring: start healthier and stay healthier. *J Am Geriatr Soc*. 2008;56(11):2089-92.

- 113)** Galioto A, Dominguez L, Pineo A, Ferlisi A, Putignano E, Belvedere M. Cardiovascular risk factors in centenarians. *Exp. Gerontol.* 2008;43(2):106–113.
- 114)** Terry DF, Evans JC, Pencina MJ, Murabito JM, Vasan RS, Wolf PA. Characteristics of Framingham offspring participants with long-lived parents. *Arch. Intern. Med.* 2007;167(5):438–444.
- 115)** Adams ER, Nolan VG, Andersen SL, Perls TT, Terry DF. Centenarian offspring: start healthier and stay healthier. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2008;56(11):2089–2092.
- 116)** Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H. Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99(12):8442–8447.
- 117)** Andersen SL, Sebastiani P, Dworkis DA, Feldman L, Perls T.T. Health span approximates life span among many supercentenarians: compression of morbidity at the approximate limit of life span. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2012;67(4):395–405.
- 118)** Aviv A, 2004. Telomeres and human aging: facts and fibs. *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2004;(51), e43.
- 119)** Der G, Batty GD, Benzeval M, Deary IJ, Green MJ, McGlynn L. Is telomere length a biomarker for aging: cross-sectional evidence from the west of Scotland? *PLoS One.* 2012;7(9),e45166.
- 120)** Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107(Suppl. 1):1710–1717.
- 121)** Gentilini D, Mari D, Castaldi D, Remondini D, Ogliari G, Ostan R, Vitale G. Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring. *Age.* 2013;35(5):1961–1973.
- 122)** Epel ES, Merkin SS, Cawthon R, Blackburn EH, Adler NE, Pletcher MJ. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men. *Aging (Albany NY).* 2009;1(1):81–88.

- 123)** Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1019:278–284.
- 124)** Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 2004;117(Pt 11):2417–2426.
- 125)** Saretzki G, Von Zglinicki T. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002;959:24–29.
- 126)** Arosio B, D'Addario C, Gussago C, Casati M, Tedone E, Ferri, E. Mari D. Peripheral blood mononuclear cells as a laboratory to study dementia in the elderly. *Biomed. Res. Int.* 2014,169203.
- 127)** Zhang J1, Kong Q, Zhang Z, Ge P, Ba D, He W. Telomere dysfunction of lymphocytes in patients with Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol.* 2003;16(3):170-6.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare la Prof.ssa Daniela Mari per aver reso possibile la mia collaborazione con il team di ricerca del quale ho avuto l'onore di far parte e per la costante disponibilità e supporto avuto nei miei confronti.

Inoltre, ringrazio la Dott.ssa Beatrice Arosio per i preziosi insegnamenti ricevuti durante l'esperienza di dottorato.

Vorrei in aggiunta ringraziare i colleghi di laboratorio Evelyn, Martina e Cristina.