

Perché invecchiamo ?

La selezione naturale opera in maniera da consentire agli organismi con i migliori assetti genotipici di tramandare i propri geni alla prole attraverso la riproduzione.

Come si intuisce solo i geni che hanno un'attività negativa prima dell'età della riproduzione vengono eliminati dalle forze evolutive.

Secondo le moderne teorie tutti gli individui di tutte le specie invecchiano per l'azione di geni che:

1. Manifestano la loro azione negativa solo in età adulta avanzata
2. Hanno effetti positivi prima dell'età riproduttiva ed effetti negativi nella vita adulta (**pleiotropia antagonistica**)

1794 R. Holliday *Understanding ageing*

Table 1. *The allocation of all available energy resources in mammals*

normal functions	reproduction	maintenance
biochemical synthesis metabolism respiration cell turnover movement feeding and digestion excretion	gonads, gametes and sex development gestation suckling care of offspring growth to adult	wound healing immunity protein turnover defence against free radicals DNA repair detoxification epigenetic stability homeostasis fat storage

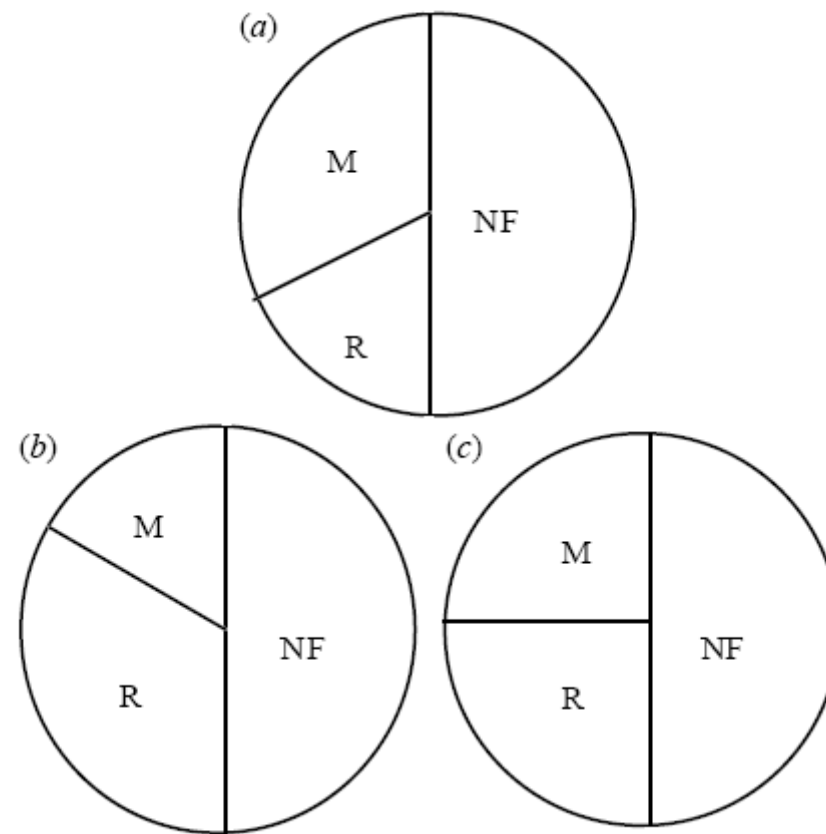


Figure 1. Strategies for survival and the allocation of resources. NF, normal functions, which are assumed to be a constant fraction of all available resources. R, all reproductive functions and M, all maintenance functions. (a) An organism which is potentially immortal, (b) an organism with a short lifespan, and (c) an organism with a long lifespan.

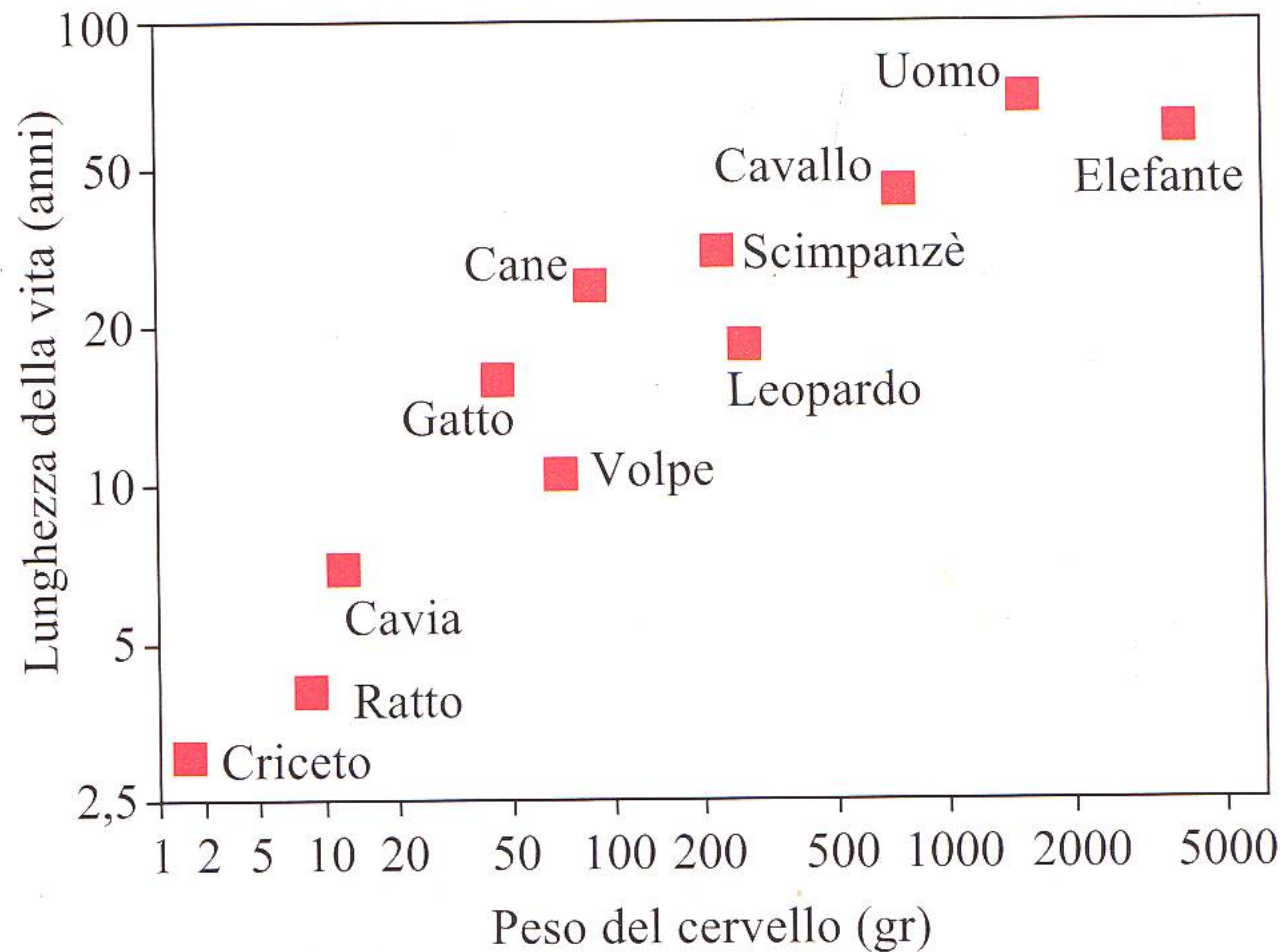
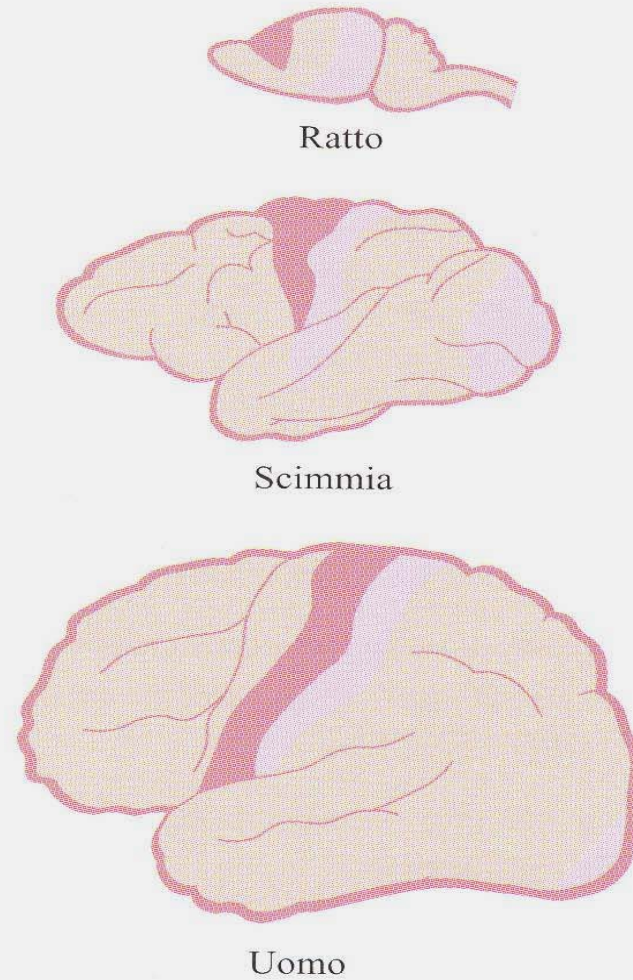


FIGURA 3.5 Relazione tra peso cervello (gr) e lunghezza massima di vita (log) in diverse specie di mammiferi placentati (da Finch C.E., 1990, mod.).



■ Motoria ■ Sensoriale ■ Associativa

FIGURA 3.6 L'encefalo del ratto, della scimmia e dell'uomo: notare la progressiva estensione e prevalenza delle aree associative su quelle motorie e sensoriali (da Ordry J.M., 1975, mod.).

Come invecchiamo ?

- A questa domanda risponderemo con le principali teorie dell'invecchiamento: ognuna di queste pone un meccanismo specifico alla base del processo di invecchiamento

Le teorie si dividono in due gruppi:

TEORIE STOCASTICHE: propongono che l'invecchiamento sia causato da danni casuali alle macromolecole. Occorre però precisare che l'organismo può riparare o ricambiare le macromolecole alterate.

TEORIE GENETICHE: propongono che alla base dell'invecchiamento vi siano programmi genetici continui con quelli che determinano lo sviluppo e la morfogenesi.

TEORIE/MECCANISMI DELL'INVECCHIAMENTO

Invecchiamento come evento programmato

Neuroendocrina

Immunologica

Senescenza cellulare

Invecchiamento come evento stocastico

Mutazioni Somatiche e Riparazione del DNA

Catastrofe da Errori

Alterazioni delle proteine e del turn-over proteico

Radicali Liberi (Stress ossidativo)/DNA mitocondriale

Table II. Evidence supporting the "program" theory

- The lifespan of a given species is relatively fixed.
 - Human aging has a significant genetic component.
 - Single mutations in human beings can produce premature aging syndromes.
 - Altered expression of a single gene may increase maximal lifespan in lower organisms.
-

J Lab Clin Med
October 2001

Volume 138, Number 4

TEORIE NEUROENDOCRINE

La maggior parte si basa sul declino della funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene che regola lo sviluppo, la crescita, la pubertà, il metabolismo e molte altre funzioni fisiologiche.

Una delle maggiori evidenze sperimentali è il prolungamento della longevità di topi che hanno subito ipofisectomia.

I livelli di numerosi ormoni variano con l'età: alcuni di essi sono stati messi in relazione all'invecchiamento come ad esempio il GH e il DHEAS.

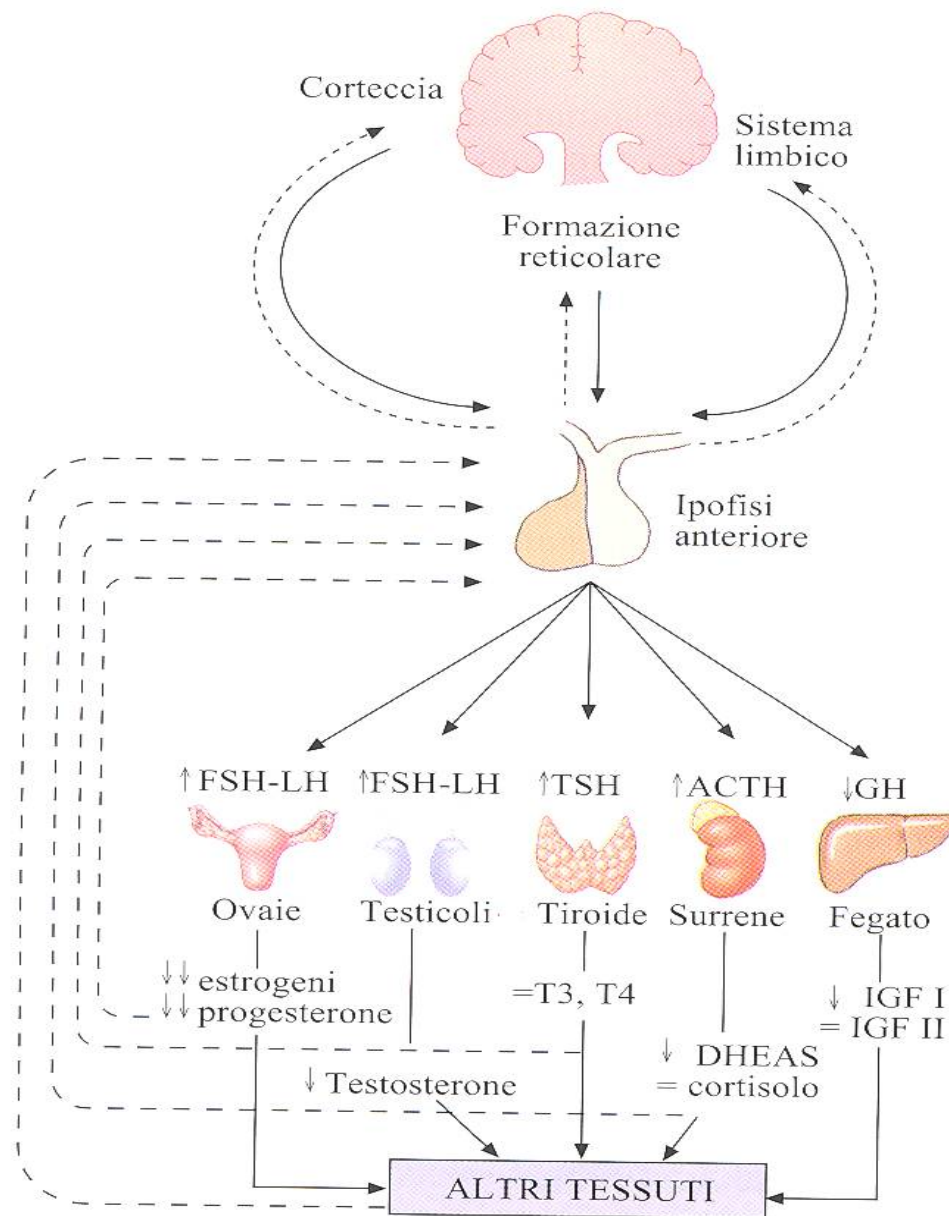


FIGURA 3.12 Rappresentazione schematica dei principali sistemi feedback positivi (—) e negativi (- - -) del sistema endocrino con indicate le modificazioni funzionali nel corso dell'invecchiamento.

TEORIE IMMUNOLOGICHE

Si basano sul ruolo importante del sistema immunitario nel mantenimento della salute e della sopravvivenza dell'organismo.

1. La risposta delle cellule T ai mitogeni diminuisce, così come aumenta la suscettibilità alle malattie infettive.
2. Con l'invecchiamento aumentano i fenomeni di autoimmunità, come evidenziato dai livelli di autoanticorpi nel siero.

Il sistema immunitario: generalità

- Il sistema immune esercita una protezione per l'organismo
- Insieme di cellule e mediatori solubili
- Deputato a imbastire risposte per debellare potenziali aggressioni dell'organismo
 - Dall'esterno: es. microorganismi
 - Dall'interno: es. tumori

Il sistema immunitario: generalità

- Immunità innata o naturale:
 - Barriere “esterne” (cute, lisozima,...) e “interne” (epitelio ciliato, muco, IgA,...)
 - Meccanismi aspecifici (NK, PMN... non discriminano)
- Immunità acquisita o specifica:
 - Esercitata mediante il riconoscimento (diversità dei recettori, specificità) dell'agente aggressore (self/non self)
 - Capace di memoria immunologica

Il sistema immunitario: generalità

■ Immunità specifica (continua):

- Processazione e presentazione alle cellule immunocompetenti
- Riconoscimento, selezione ed espansione clonale

➔ Meccanismi effettori di difesa

- Immunità umorale - linfociti B, plasmacellule produttrici di anticorpi
- Immunità cellulo-mediata - linfociti T
linfociti citotossici o produttori di citochine

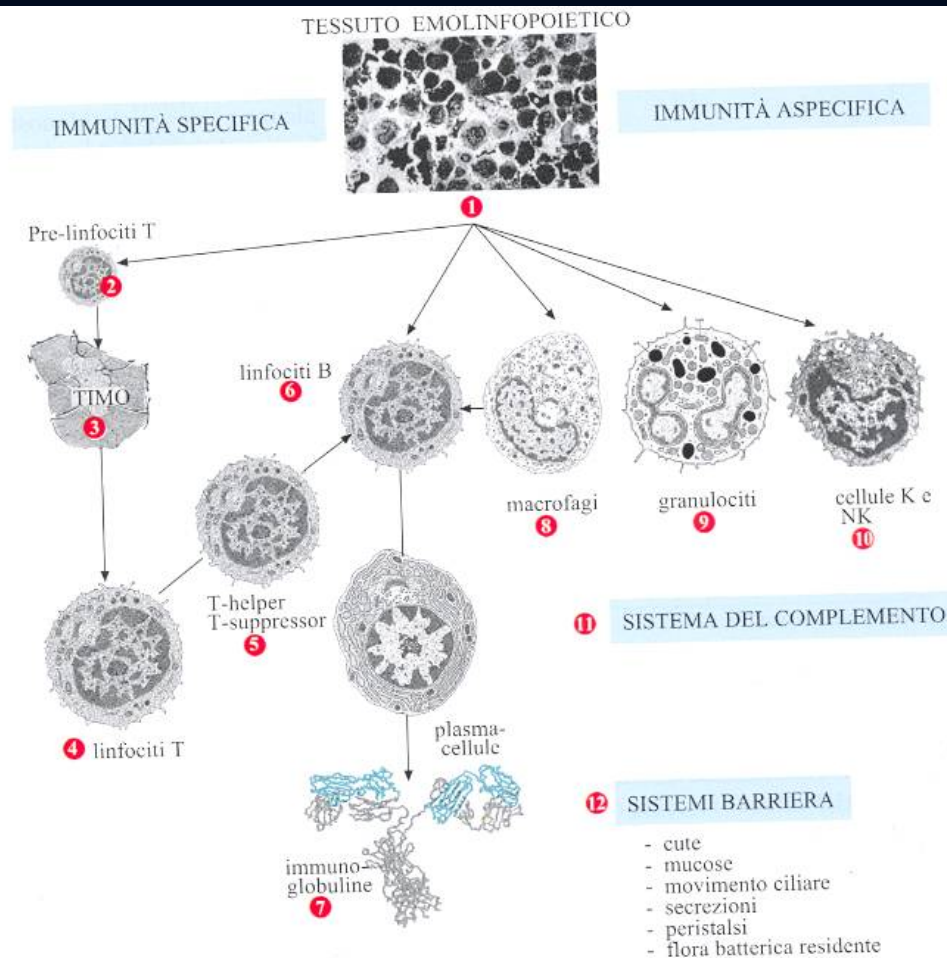
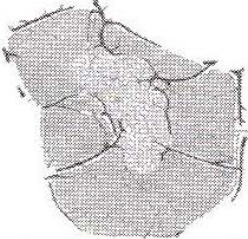


FIGURA 4.16.1 Modificazioni con l'età del sistema immunitario.

- | | |
|--|--|
| <p>1. midollo: ↑ componente grassa
milza e linfonodi: ↓ centri germinativi</p> <p>2. ↓ traffico pre- linfociti T</p> <p>3. ↓ atrofia età dipendente; ↓ ormoni timici</p> <p>4. ↓ capacità proliferativa mitogeni
↓ attività citotossica</p> <p>5. ↓ attività T-h</p> | <p>6. ↓ efficienza linfociti B</p> <p>7. ↑ auto-anticorpi (↑ MGUS)</p> <p>8. ↓ attività macrofagi (es. ↓ sintesi IL-1)</p> <p>9. ↓ capacità chemiotassica</p> <p>10. ↓ capacità citotossica per singola cellula</p> <p>11. (?)</p> <p>12. ↓ efficienza</p> |
|--|--|

MODIFICAZIONI ETÀ RELATE	EFFETTI FUNZIONALI
TIMO  ↓ immissione in circolo LT nativi  CD4+, CD8+, CD45RA+ Atrofia	- ↓ repertorio LT
LT effettori CD8+ Senescenza replicativa LT memoria CD4+, CD8+, CD45RO+ Espansione oligoclonale LT iporesponsivi con ridotta capacità di espansione clonale in risposta ad antigeni e/o a mitogeni	- ↓ risposta adeguata agli antigeni

Effetti dell'invecchiamento sul sistema dei linfociti T (LT).

TABELLA 4.16.2 Effetti dell'invecchiamento sul sistema dei linfociti B

MODIFICAZIONI ETÀ RELATE	EFFETTI FUNZIONALI
↑ IgA, ↑ IgG, ↑ IgM ↓ produzione anticorpi ad alta specificità ed affinità ↑ produzione anticorpi polireattivi a bassa affinità ↑ produzione autoanticorpi	concentrazione serica totale Ig invariata minor efficienza della risposta immune umorale agli antigeni esogeni aumentata incidenza MGUS aumentata incidenza malattie autoimmuni

TAVOLA XXXII Difese immunitarie e loro modificazioni con l'età (Lipsitz L.A., mod.)

MECCANISMO DI DIFESA

MODIFICAZIONE ETÀ CORRELATA

Immunità aspecifica

- Macrofagi
 - Neutrofili
 - Cellule K e NK
- ↓ IL1, ↑ IL6, $\text{TNF}\alpha$
 - ↔ o ↑ PMN circolanti, ↔ o ↓ chemiotassi, ↓ fagocitosi e killing intracellulare, ↑ suscettibilità all'apoptosi
 - ↑ numero cellule circolanti, ↓ capacità citotossica

Immunità specifica

- linfociti T
 - linfociti B
 - Citochine
 - Anticorpi
- ↓ LIN nativi, ↑ LIN T attivati, espansione oligoclonale LIN T, ↑ LIN T CD28- (soprattutto 8+) alterata risposta ad antigeni e mitogeni, ↓ citotossicità
 - ridotta capacità di attivazione e proliferazione, ↓ produzione anticorpale antigene specifica, ↑ produzione autoanticorpi
 - tendenza al passaggio da un pattern prevalentemente di tipo TH1 ad uno prevalentemente di tipo TH2, ↓ IL2, ↑ TNF, ↓ $\text{IFN}\gamma$
 - ↑ auto-anticorpi

Meccanismi di barriera

- Cute
 - Tratto gastro-enterico
 - Tratto respiratorio
- assottigliamento, ↓ grasso sottocutaneo, ↓ flusso ematico, ↓ melanociti che assorbono UV, ↓ collagene ed elasticità
 - ipocloridia e atrofia mucosa gastrica
 - ↓ trasporto mucociliare
 - ↓ riflesso tosse

SENESCENZA CELLULARE

In coltura le cellule si replicano raddoppiando il loro numero (Population Doublings). Dopo un certo numero di divisioni si entra in una fase di diminuita capacità replicativa fino a che le cellule non si dividono più (limite di Hayflick).

La senescenza cellulare ha rappresentato per molti anni sia una teoria di quella che poteva essere la senescenza in vivo sia un utile modello per lo studio dell'invecchiamento in vitro.

Sebbene oggi si pensi che la “senescenza replicativa” non riproduca l'invecchiamento cellulare in vivo la teoria ha ripreso vigore in seguito alla scoperta dei **telomeri**, che vengono rimossi parzialmente ad ogni ciclo replicativo.

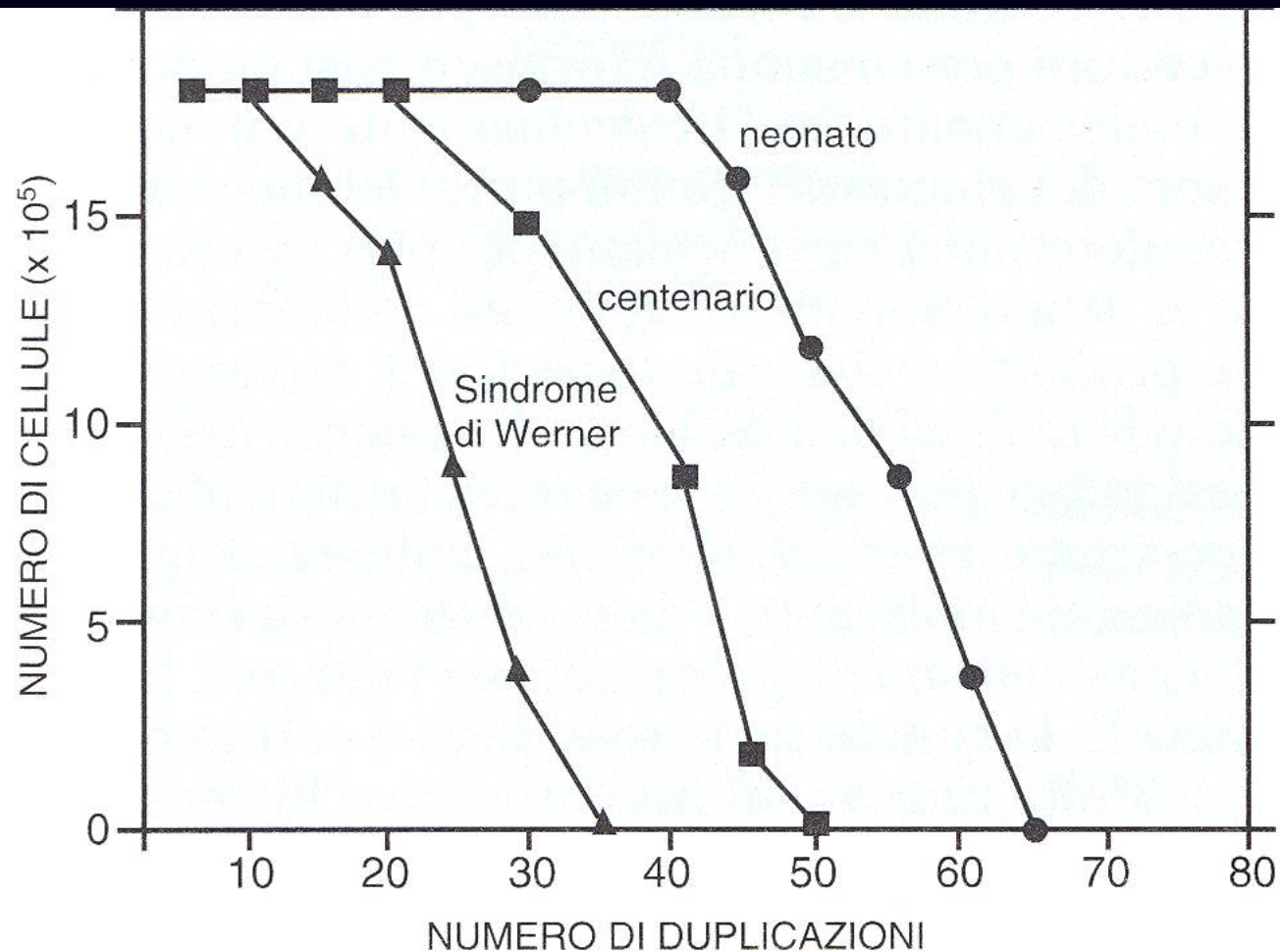


Figura 2-15. Popolazioni a termine di fibroblasti proliferanti provenienti da un neonato, da una persona di 100 anni e da un paziente di 20 anni con la sindrome di Werner. La capacità delle cellule di crescere alla confluenza sotto forma di un monostrato diminuisce con l'aumentare delle popolazioni che si duplicano. (da Dice JF: Cellular and molecular mechanisms of aging. *Physiol Rev* 73:150, 1993.)

Telomero

Il **telomero** è la regione terminale del cromosoma, da cui deriva il nome stesso, composta di DNA altamente ripetuto, che non codifica per alcun prodotto proteico. Ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi. La DNA polimerasi, infatti, non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione; se non ci fossero i telomeri, che quindi vengono accorciati ad ogni replicazione, la replicazione del DNA comporterebbe in ogni occasione una significativa perdita di informazione genetica.

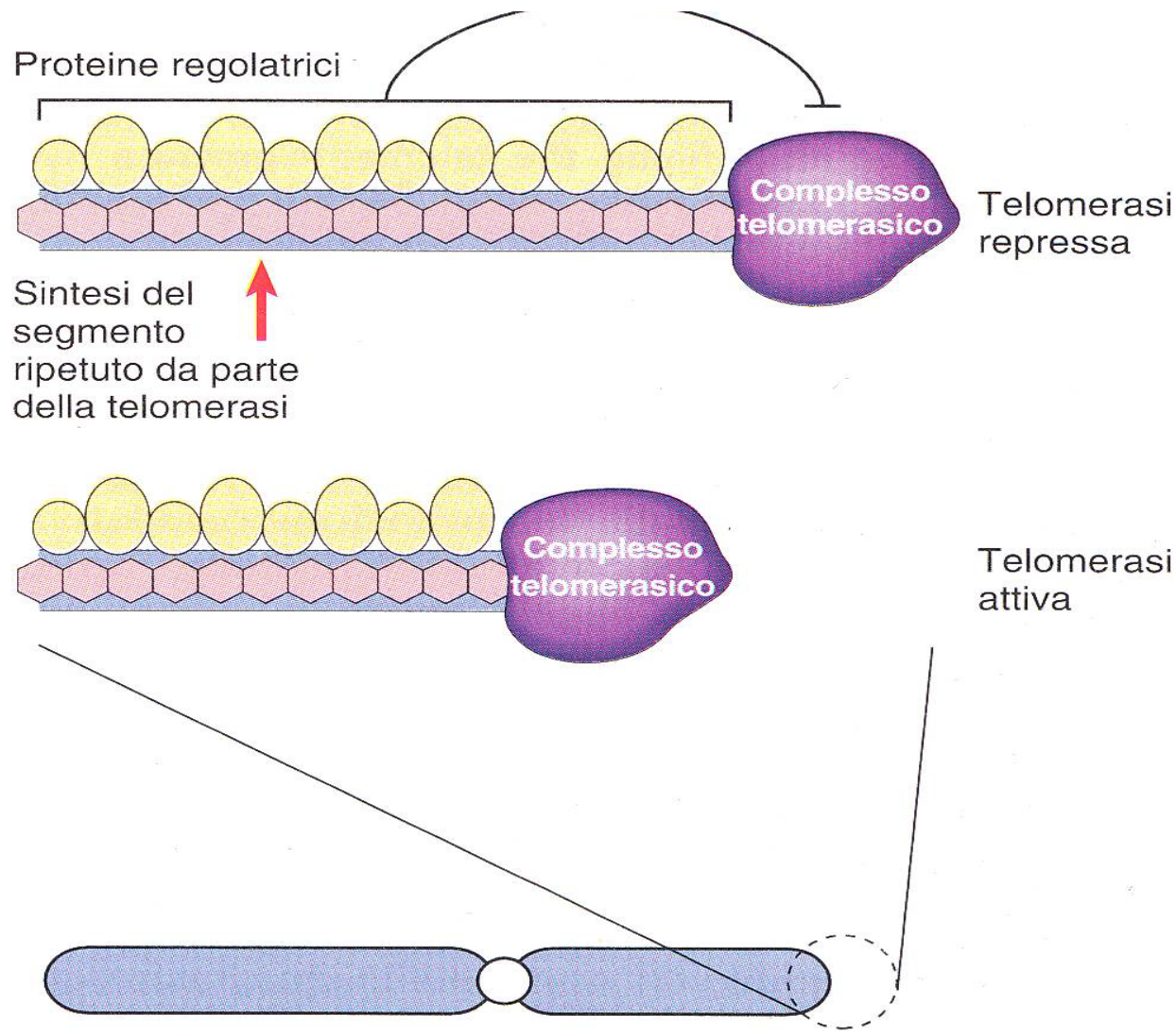


Figura 2-16. Telomeri (in basso) e meccanismi ipotizzati della determinazione della lunghezza mediante regolazione dell'attività telomerasica. La telomerasi attiva (nel mezzo) aggiunge sequenze ripetute e proteine regolatrici (in alto), che a loro volta reprimono l'attività telomerasica. (Modificato e riadattato con permesso da Shore D: Different means of common ends. *Nature*, 385:676, 1997. Copyright 1997, Macmillam Magazine Limited.)

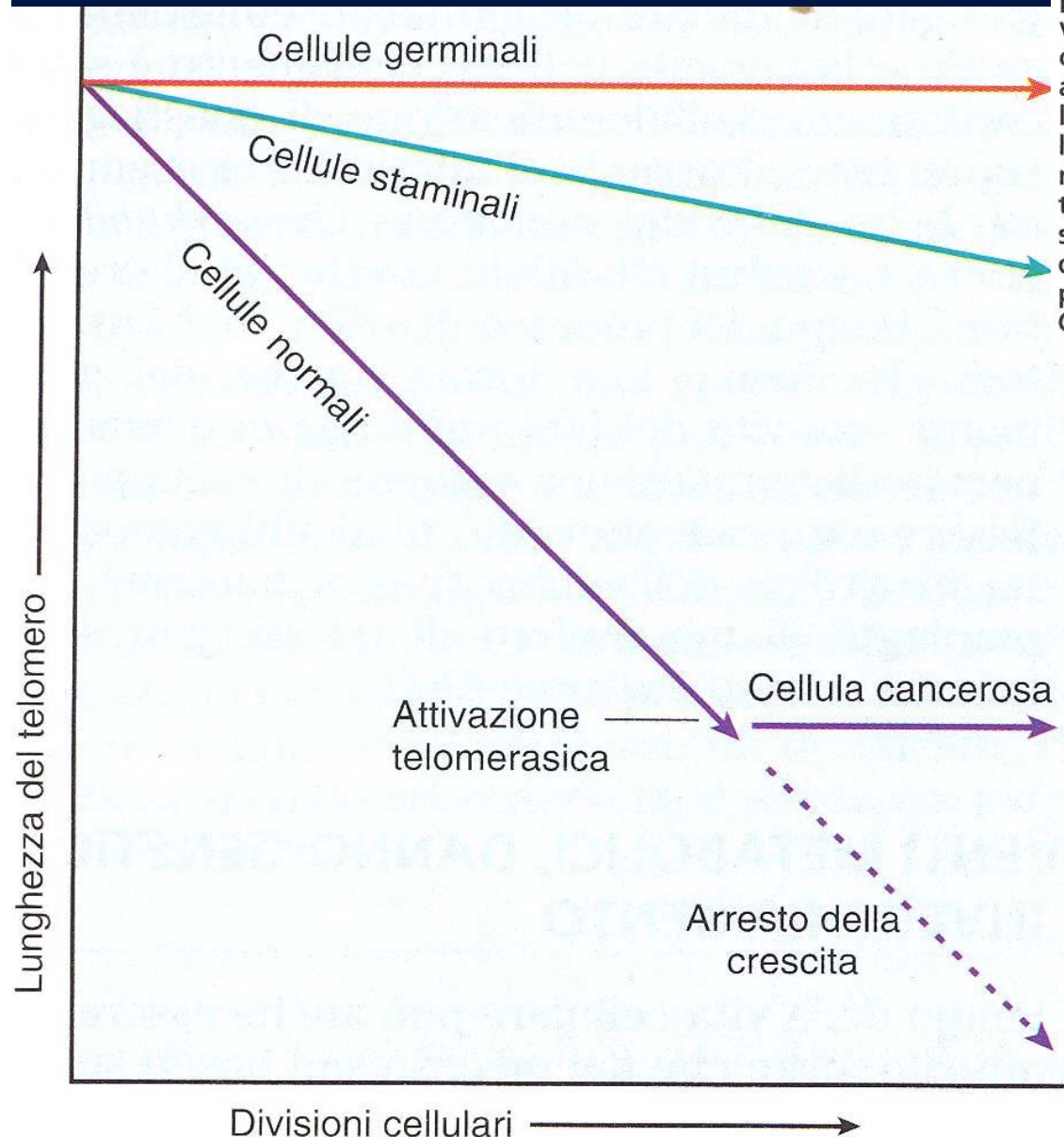


Figura 2-17. Ipotesi telomero-telomerasi e capacità proliferativa. La lunghezza del telomero è messa in grafico rispetto al numero di divisioni cellulari. Nelle cellule normali somatiche, non c'è attività telomerasica e i telomeri progressivamente si accorciano con l'aumentare delle divisioni cellulari fino al verificarsi dell'arresto della crescita, o della senescenza. Le cellule germinali e staminali hanno attività telomerasica, ma solo le cellule germinali hanno livelli sufficienti di enzima da stabilizzare completamente la lunghezza dei telomeri. L'attivazione delle telomerasi nelle cellule cancerose inattiva l'orologio basato sulle telomerasi che limita la capacità proliferativa delle cellule somatiche normali (Modificato e riadattato con permesso da Holt SE, et al: Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. Nature Biotech 4:836, 1996. Copyright 1996, Macmillan Magazines Limited.)

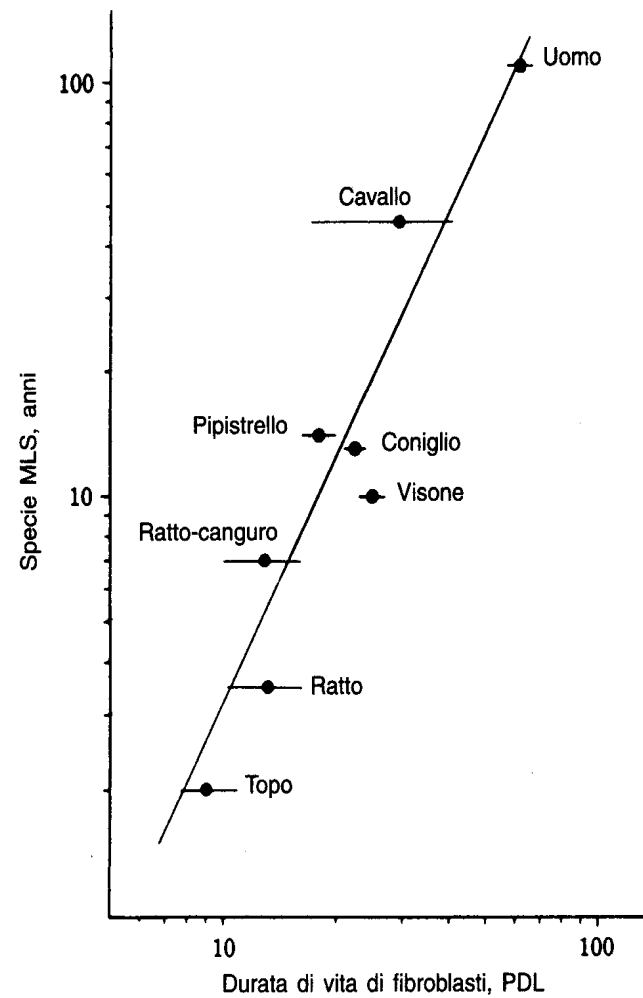


Figura 5.4. Logaritmo della durata di vita di fibroblasti in coltura nel corso dei raddoppi di popolazione (PDL) e logaritmo della durata di vita delle specie donatrici. (Riproduzione autorizzata, da Rohme 1981.)

Mutazioni somatiche e Riparazione DNA

Con l'aumentare dell'età si accumulano mutazioni nelle cellule somatiche di cui i principali responsabili sono le radiazioni.

Parallelamente si assiste ad un declino età dipendente dell'efficienza di riparazione del DNA.

Mutazioni  + Riparazione  = **Invecchiamento**

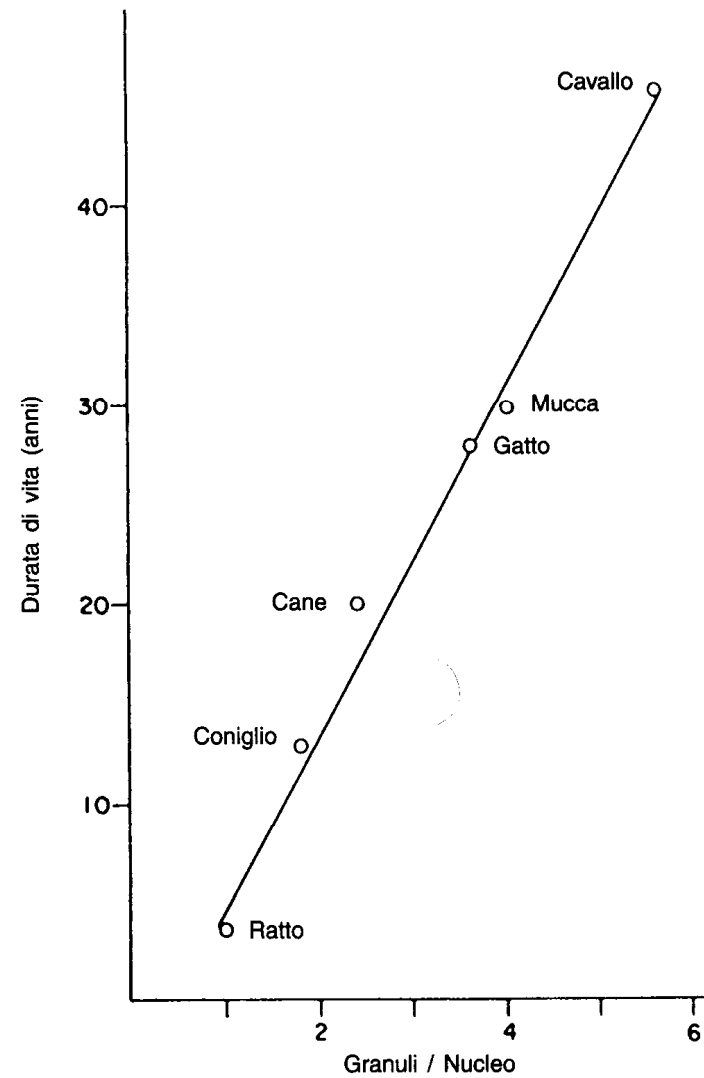


Figura 7.3. Entità della sintesi di riparazione di DNA dopo esposizione alla luce UV in cellule epiteliali primarie di cristallino e durata di vita del donatore. (Ridisegnata, da Treton e Courtois 1982.)

Catastrofe da Errori

Il processo di sintesi delle proteine è complesso, cosicchè si può verificare la sintesi di proteine “errate”. Questo problema potrebbe essere superato dal normale ricambio delle proteine

Quando le proteine che contengono errori sono quelle coinvolte nel meccanismo di sintesi delle proteine, si potrebbe verificare un’amplificazione che porterebbe ad un elevato numero di proteine alterate incompatibili con le normali funzioni cellulari.

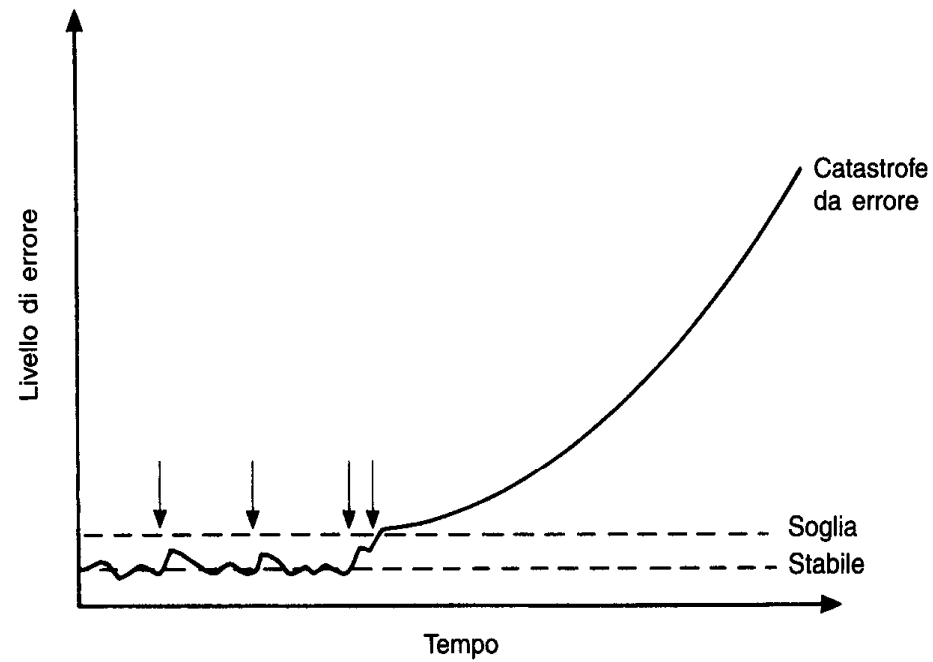


Figura 4.3. *In circostanze normali il livello di errore rimane sotto un valore di soglia, cosicché esiste un livello di stato stazionario, con perturbazioni casuali. Vi è una data probabilità che possano presentarsi errori cruciali (nella RNA polimerasi ad esempio); questo destabilizzerebbe il meccanismo della sintesi proteica e porterebbe a un aumento irreversibile del livello di errore.*

Alterazioni delle proteine e del turnover proteico

Le proteine sono alterate da numerosi processi tra cui la glicazione e l'ossidazione. E' stato ipotizzato che l'accumulo di proteine alterate (dopo la sintesi) possa contribuire al fenomeno dell'invecchiamento.

Questo accumulo di alterazioni potrebbe anche essere secondario ad una maggiore emivita delle molecole che avrebbero così maggiore probabilità di essere danneggiate.

Esiste una notevole evidenza sperimentale di un declino età associato dei processi di degradazione proteica che permetterebbero quindi un maggior accumulo di proteine alterate.

Tabella 4.2 Possibili alterazioni proteiche durante l'invecchiamento

-
1. Errori fondamentali nella trascrizione e nella traduzione
 2. Deamidazione dei residui asparaginile e glutaminile
 3. Glicosilazione non enzimatica; prodotti terminali di un'avanzata glicazione (AGE)
 4. Ossidazione
 5. Legami crociati di residui di lisina
 6. Scissione proteolitica, senza ulteriore degradazione
 7. Denaturazione parziale (verso un più basso livello energetico)
 8. Racemizzazione di L-aminoacidi
 9. Fosforilazione anormale
 10. Metilazione anormale
 11. Ribosilazione dell'ADP
-

Nota: Vedi il testo e, per una più recente rassegna, Rattan, Derventzi e Clark (1992)

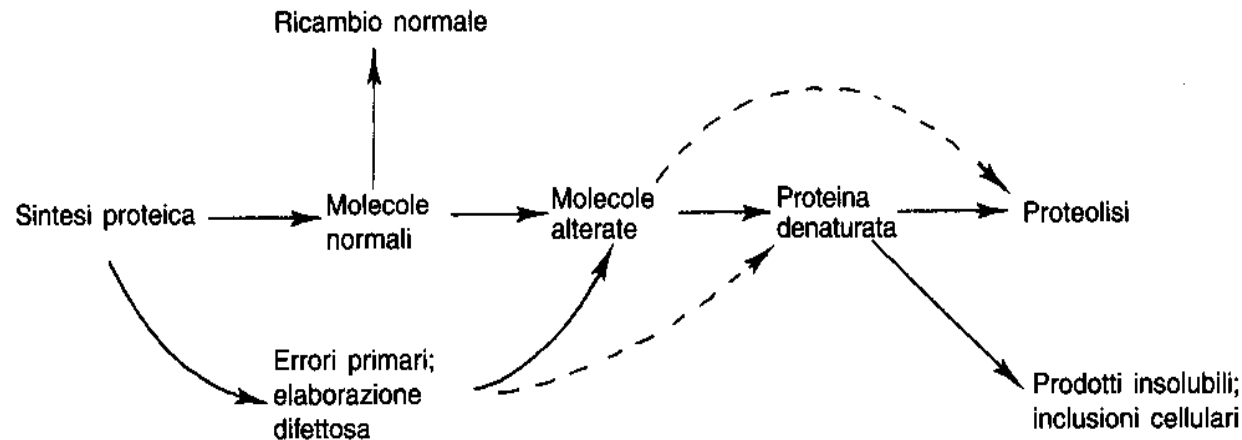
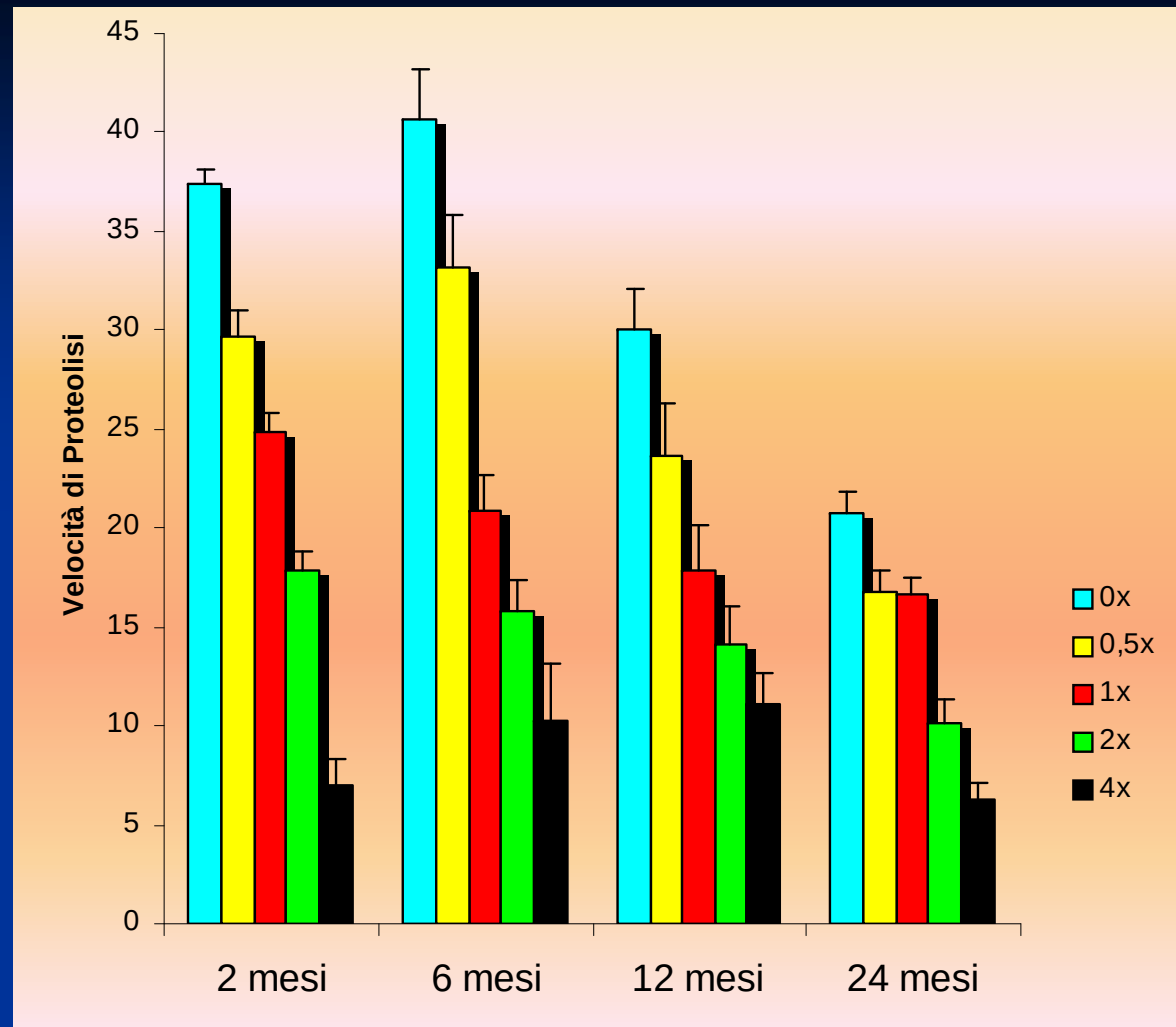


Figura 4.4. Teoria della modificazione delle proteine nell'invecchiamento. Enzimi alterati possono conservare l'attività, ma perdono la stabilità. Essi possono, d'altra parte, srotolarsi parzialmente e dar luogo a molecole inattive che reagiscono con l'anticorpo contro l'enzima. Sono possibili svariati tipi di modificazioni proteiche (v. Tabella 4.2). Tutte queste molecole sono soggette a proteolisi, allo stesso modo delle molecole totalmente denaturate. In condizioni normali vi è un equilibrio tra formazione e rimozione di proteine alterate, ma nel corso dell'invecchiamento è possibile un aumento della loro formazione senza un aumento di proteolisi. Vi potrebbe essere, altrimenti, una riduzione della proteolisi. In entrambi i casi lo stato stazionario o di equilibrio sarebbe alterato e vi sarebbe un accumulo di molecole alterate. (Basato su Rothstein 1975.)



Declino dell'autofagia, uno dei principali meccanismi di turnover proteico, durante l'invecchiamento

Radicali Liberi (Stress Ossidativo) e DNA mitocondriale

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS, anione superossido, perossido di idrogeno, radicale idrossile) sono semplicemente il sottoprodotto del metabolismo aerobio indispensabile per la vita.

Il danno provocato da questi radicali è progressivo con l'aumentare dell'età e probabilmente correlato ad un calo contemporaneo delle difese antiossidanti.

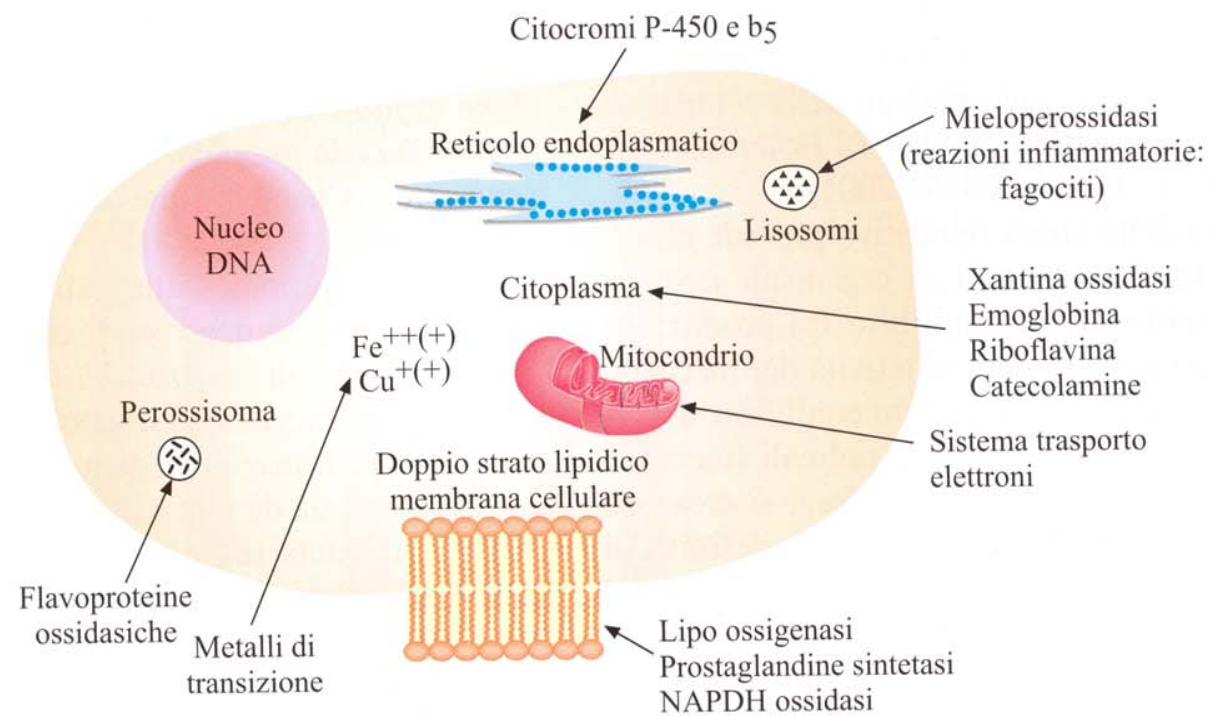


FIGURA 3.14 Sedi intracellulari di produzione dei radicali liberi (Kehrer J.P., Smith C., 1994, mod.).

TABELLA 3.2 Stima dell'emivita di differenti tipi di radicali e specie ossidanti che possono avere un ruolo importante nei processi biologici

Radicale	Nome	Substrato	Emivita
HO•	Radicale idrossile	LH	10^{-9} sec
LO•	Radicale lipoalcossile	LH	10^{-6} sec
LOO•	Radicale lipoperossido	LH	7 sec
L•	Radicale lipidico centrato su atomo di C	O ₂	10^{-8} sec
H ₂ O ₂	Perossido di idrogeno	—	minuti
O ₂ • ⁻	Anione superossido	—	10^{-5} sec
O ₂ ⁻	Ossigeno singoletto	H ₂ O	10^{-6} sec
HQ•f	Radicale semichinone	O ₂	giorni
NO	Ossido nitrico	—	~ 1 sec

LH = lipide polinsaturo con un atomo di H terminale

TABLE 5.3
Production of Hydrogen Peroxide by Isolated Cell Fractions

Organelle	Oxidant Source	H₂O₂ Production (% of total)
Mitochondria	Electron transport leak	15
Peroxisomes	Product formation	35
Endoplasmic Reticulum	Mixed function oxidations	45
Cytosol	Xanthine oxidation	5

TABLE 5.4
Effects of Hydrogen Peroxide on Cells

H_2O_2 Dose	Effect on HA-1 Cells
3 to 5 μM	25 to 45% growth stimulation
120 to 150 μM	Temporary growth arrest, adaptation to H_2O_2
250 to 400 μM	Permanent growth arrest without loss of function
0.5 to 1 mM	Apoptosis (nuclear condensation, DNA “laddering”)
5 to 10 mM	Necrosis (membrane disruption, protein denaturation)

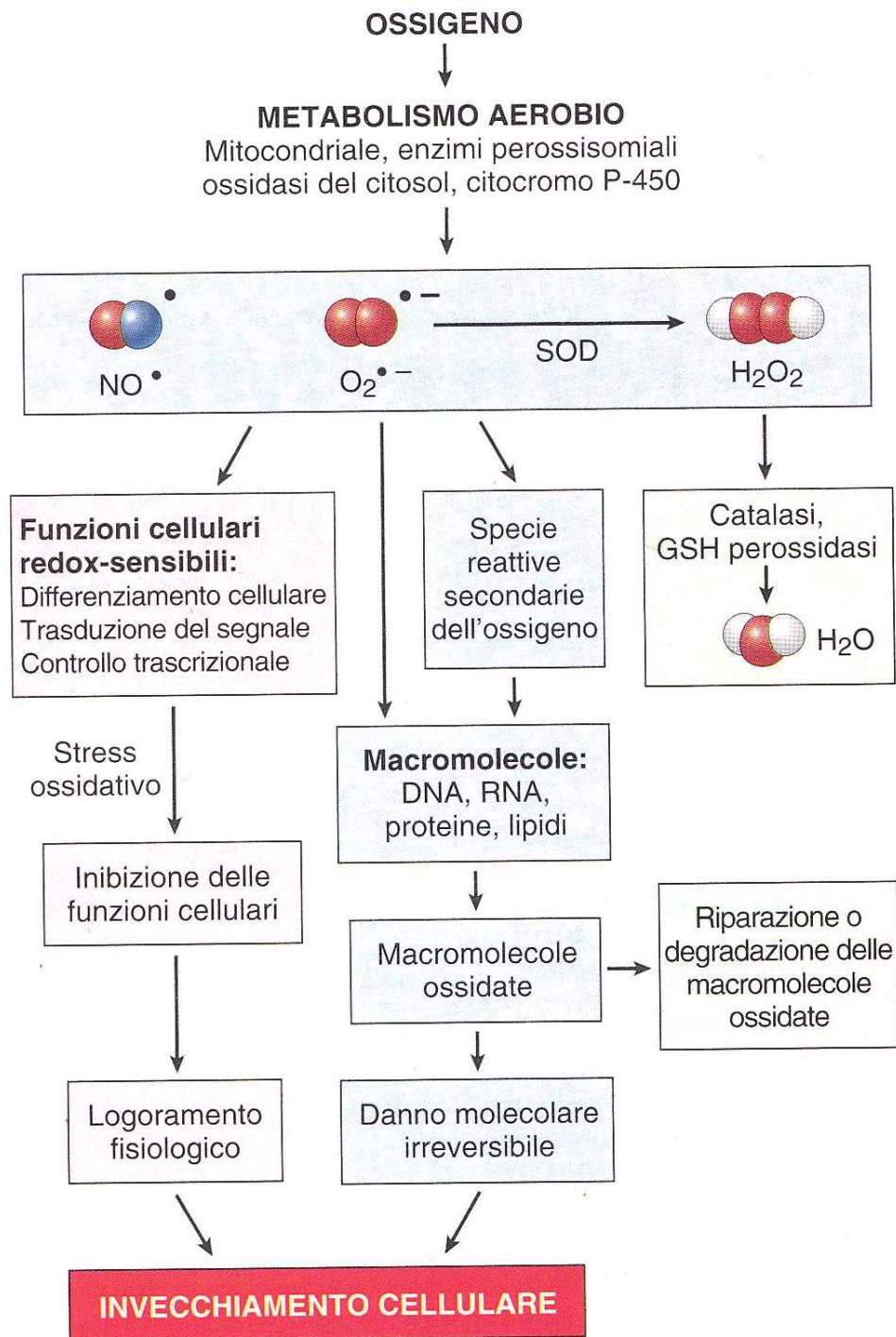
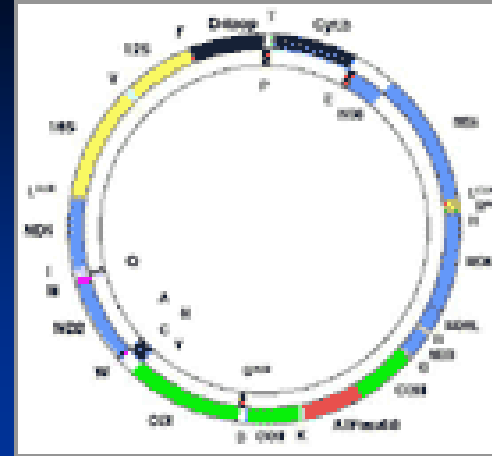
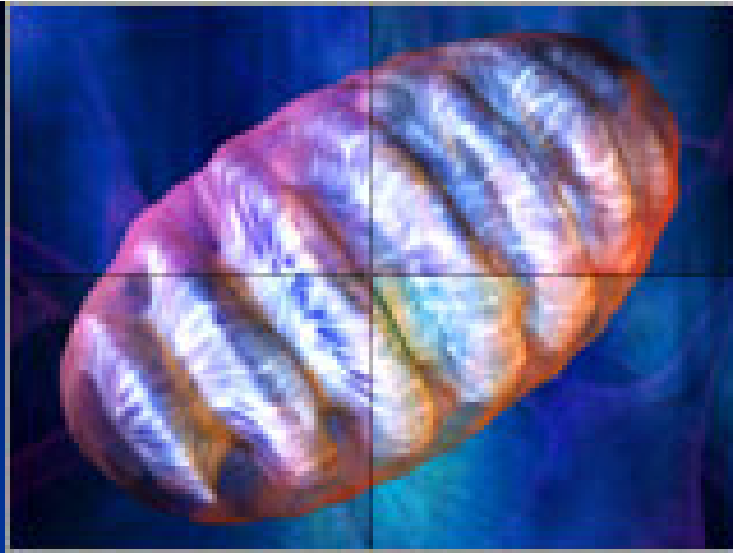


Figura 2-18. Stress ossidativo e invecchiamento. Il metabolismo aerobio genera metaboliti reattivi dell'ossigeno come il perossido di idrogeno, l'anione superossido e l'ossido d'azoto. Queste specie reattive possono essere inattivate dalle difese antiossidanti dell'organismo, o dare origine ad una varietà di metaboliti secondari reattivi dell'ossigeno (p.e. perossinitrito). Le interazioni tra le specie reattive e le macromolecole possono causare modificazioni ossidative sia reversibili che irreversibili. L'accumularsi del danno ossidativo irreversibile può essere un fattore causale nell'invecchiamento e in particolari malattie. I meccanismi di difesa antiossidanti comprendono il glutatione, la vitamina E, la vitamina C e gli urati. SOD, superossido dismutasi. (Modificato e riadattato da Weindruch R, Sohal RS: Caloric intake and aging. N Engl J Med 337:986, 1997.)



In tempi recenti è stato visto che il DNA mitocondriale (mtDNA) è maggiormente soggetto al danno da parte dei ROS, vista la sua vicinanza al sito di produzione (membrana mitocondriale) e alla minor efficienza riparativa.



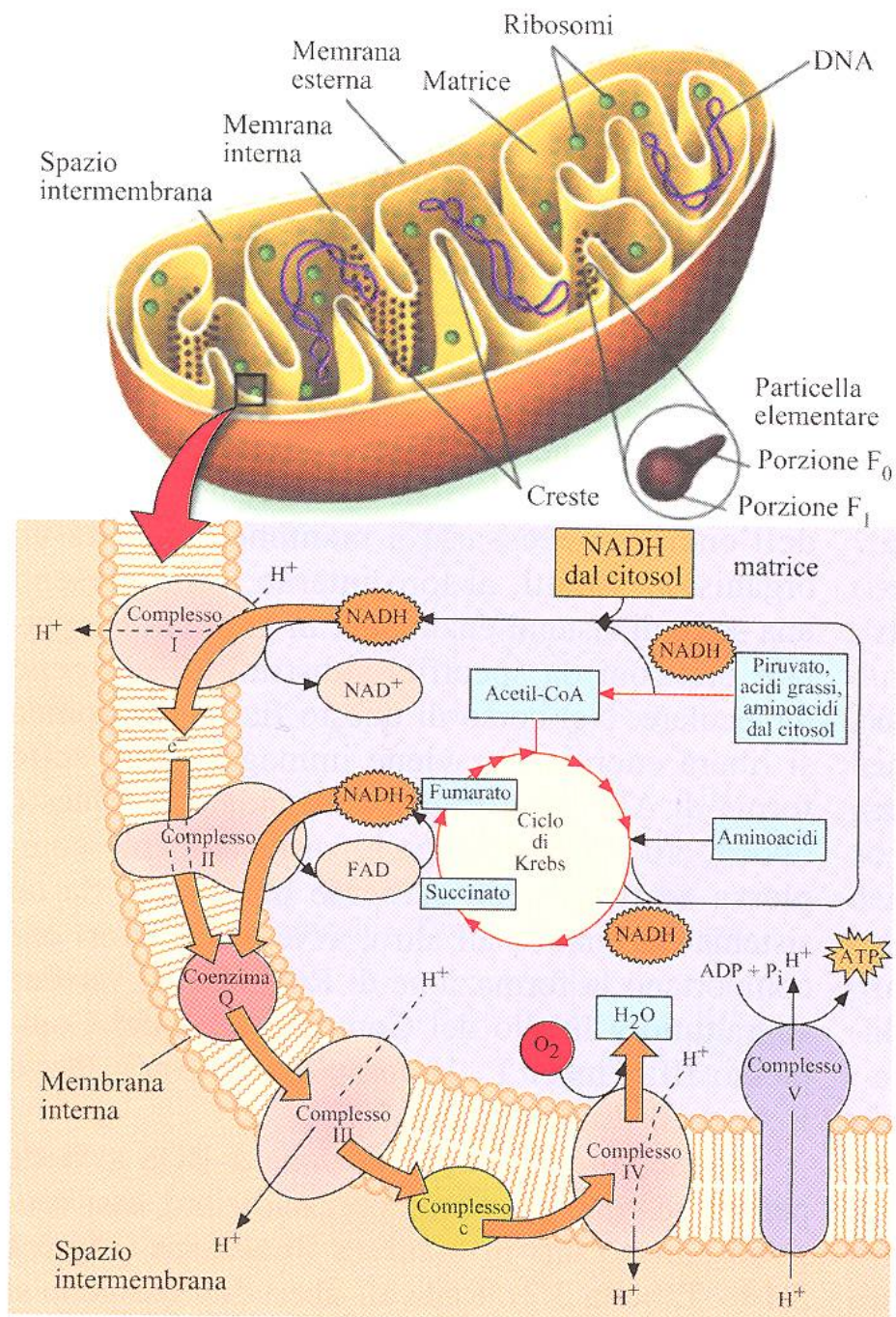


FIGURA 3.13 Complessi enzimatici della catena della fosforilazione ossidativa mitocondriale (da Brooklyn College City University of New York, 2005, mod.).

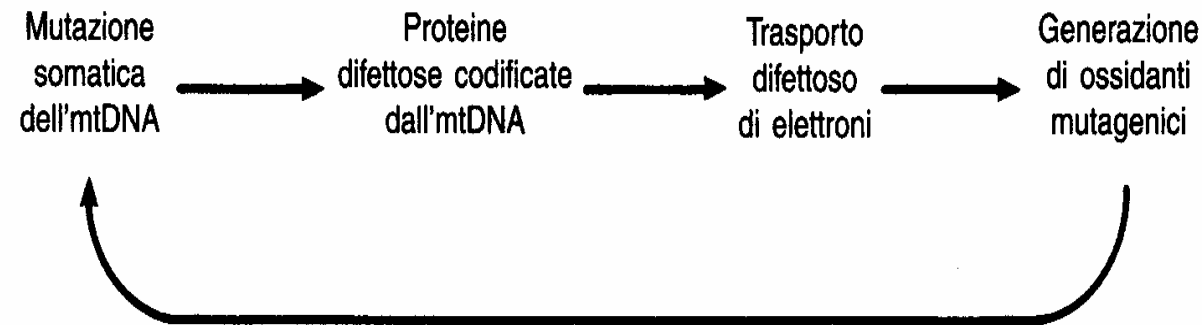


Figura 4.5. *Circolo vizioso retroattivo che coinvolge il metabolismo mitocondriale. Il DNA mitocondriale presenta un'elevata frequenza di mutazioni, che darà luogo a proteine alterate. Ciò potrebbe aumentare la formazione di radicali liberi dell'ossigeno, con ulteriore danno al DNA. (Riproduzione autorizzata da Beckman, Hagen e Ames 1992).*

Table III. Evidence supporting the “free radical” theory

- Oxidative damage increases with age.
 - Dietary restriction increases free radical defenses and reduces damage.
 - Short lifespan is associated with greater susceptibility to oxidative stress.
 - High metabolic rate is associated with short lifespan.
 - Fruit flies engineered to have high free radical defenses live longer.
-

J Lab Clin Med
October 2001

Volume 138, Number 4

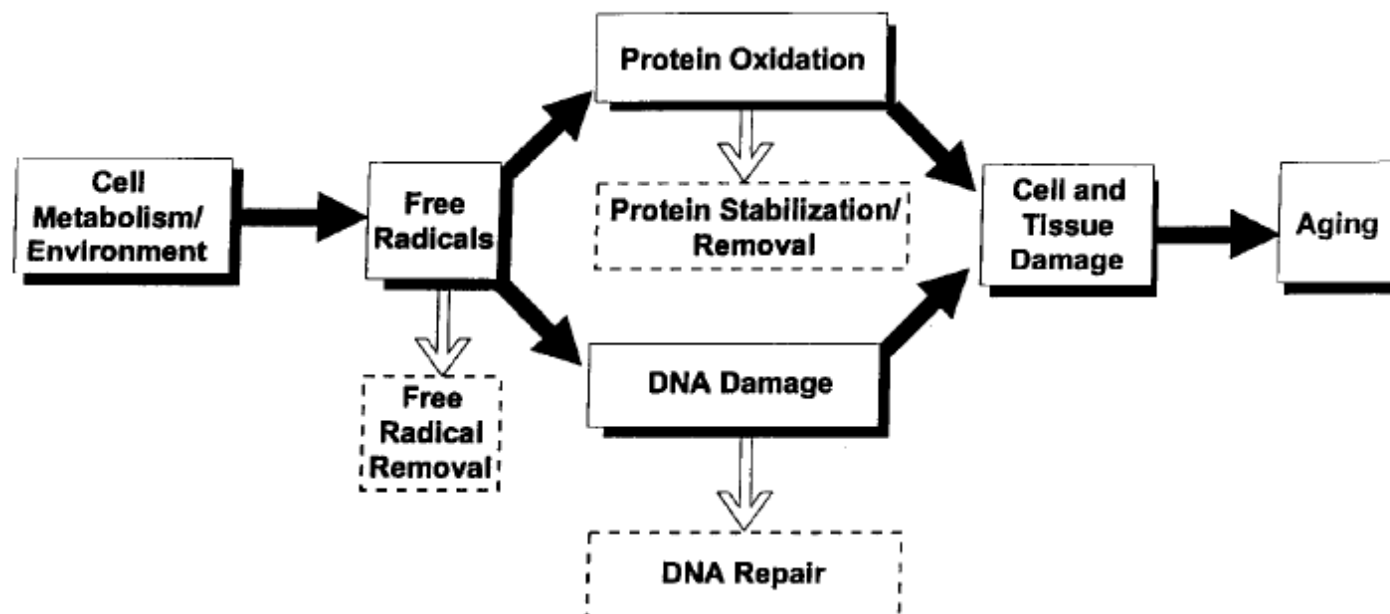


Fig 1. A unified theory of aging. *Solid boxes* indicate the major components of the “free radical” theory of aging. *Dashed boxes* indicate the major mechanisms for blunting the action of free radicals in the body. These mechanisms may be determined genetically.