

Potranno le varie ricerche sui rischi epigenetici di patologie metaboliche condurre a nuove terapie preventive?

Il progressivo invecchiamento della popolazione è un dato epidemiologico che contraddistingue il 21° secolo. In base alle stime attuali si prevede che entro il 2050 la proporzione di anziani tenderà a raddoppiare, passando dall'11% al 22% della popolazione totale. Sebbene l'invecchiamento possa avvenire anche in assenza di malattie (es. nonagenari e centenari), l'età avanzata rappresenta il principale fattore di rischio per molte patologie cronico-degenerative. Tra queste rientrano le patologie metaboliche, come diabete di tipo 2 (DT2) ed obesità, le malattie cardio- e cerebro-vascolari, i disturbi neuropsichiatrici, tra cui la malattia di Alzheimer e le altre forme di demenza, ed il cancro. Di conseguenza, proporzionalmente alla crescita della popolazione nelle classi di età più avanzata, si è verificato un aumento sempre più sfavorevole del tasso di incidenza delle patologie ad essa correlate. Ciò ha avuto con una ricaduta significativa sull'onere socio-economico legato alla cura, all'assistenza e alle spese previdenziali destinate agli anziani, causando il cosiddetto *longevity shock*. In questo scenario, se da un lato l'aumento della longevità rappresenta una grande conquista per l'uomini, in quanto testimonia il miglioramento delle condizioni di vita ed i progressi della medicina, dall'altro costituisce una minaccia per l'immediato futuro, nel caso in cui non fosse controbilanciato da una programmazione di opportuni interventi di politica sanitaria che investano in ricerca, assistenza e benessere degli anziani, tenendo conto dell'evoluzione del concetto stesso di invecchiamento.

Nell'accezione corrente, l'invecchiamento è un processo multifattoriale caratterizzato dalla perdita progressiva delle capacità funzionali e da una crescente comorbidità, che si manifestano proporzionalmente all'avanzare dell'età e durante l'intero arco della vita. Sebbene si tratti di un processo fisiologico graduale, esso può manifestarsi in modi e tempi differenti in ciascun individuo. Il metabolismo ed il patrimonio genetico definiscono la lunghezza e la qualità della vita in ogni singolo soggetto, ma tali caratteristiche possono essere continuamente modificate attraverso una serie di meccanismi che incidono sfavorevolmente (es. malattie genetiche e/o acquisite) o favorevolmente (es. interventi terapeutici, medicina predittiva) su di esse, conducendo, rispettivamente, verso il declino di sistemi/apparati chiave dell'organismo (accezione negativa dell'invecchiamento) o verso la longevità (accezione positiva dell'invecchiamento). Attraverso il proprio stile di vita, inoltre, ciascuno di noi è in grado accelerare o rallentare tali processi. Pertanto, l'obiettivo che ci si deve prefiggere è quello di individuare ed attuare interventi di prevenzione in grado di minimizzare i principali fattori negativi e promuovere adeguati stili di vita in ogni età e per tutto l'arco della vita.

La ricerca sull'invecchiamento, ed in particolare l'identificazione dei fattori determinanti il successo dell'invecchiamento e la longevità, è in continua crescita negli ultimi decenni. Una delle domande principali in questo campo è la correlazione tra il *background* genetico e lo stile di vita nel determinare la possibilità individuale di un invecchiamento ritardato (preferibilmente senza malattie e disabilità) e la longevità. Studi in aggregati familiari e soprattutto su gemelli monozigoti hanno dimostrato che il genoma determina solo il 25% della variabilità della longevità umana, identificando i geni che regolano l'omeostasi cellulare ed il metabolismo energetico quali principali fattori genetici responsabili della variazione individuale del fenotipo dell'invecchiamento. Parallelamente, studi clinici sull'uomo hanno dimostrato che interventi nutrizionali (es. restrizione calorica), farmacologici (es. metformina) e terapeutici (es. chirurgia bariatrica), oltre che l'esercizio fisico, esercitando effetti benefici sul metabolismo energetico, sono in grado di aumentare la durata massima e la durata media della vita. Pertanto, è sempre più evidente che la plasticità dell'invecchiamento sia mediata da processi epigenetici poiché, in quanto reversibili, possono essere modificati dall'ambiente. Codesti rappresentano il meccanismo molecolare tramite cui i fattori ambientali possono modulare il *background* genetico individuale, senza indurre alcuna modifica della sequenza nucleotidica del DNA, ed indurre cambiamenti nel fenotipo. Quindi, l'epigenetica consente di spiegare il così detto problema della *missing heritability* legato alla longevità.

I meccanismi epigenetici includono: modifiche post-traduzionali degli istoni, gli RNA non codificanti e la metilazione del DNA. Quest'ultima consiste nel legame covalente di un gruppo metilico sul carbonio 5 dei residui di citosina e causa silenziamento dell'espressione genica. Le modifiche della metilazione del DNA sono una delle maggiori e meglio caratterizzate alterazioni che intervengono durante il processo di invecchiamento e che contribuiscono alle disfunzioni metaboliche ad esso associate. Studi di associazione *epigenome-wide* ed approcci di studio gene-candidato, effettuati sull'uomo ed in modelli animali, dimostrano chiaramente che alterazioni dello stato di metilazione DNA concorrono a determinare il rischio individuale per malattie metaboliche, come obesità e DT2, associato all'esposizione a fattori nutrizionali

(*) Ha Collaborato la Dr.ssa Rosa Spinelli

(es. dieta ipercalorica, dieta ipoproteica, restrizione calorica). Infatti, tali modifiche epigenetiche sono in grado di ~~interferire~~ con l'espressione di geni necessari per il mantenimento della funzione di tessuti metabolicamente rilevanti, come il pancreas, il muscolo scheletrico, il tessuto adiposo ed il fegato. Studi in modelli murini, per esempio, hanno rivelato che una dieta ricca di grassi altera il profilo di metilazione del DNA del tessuto adiposo, in corrispondenza di regioni regolatorie associate ai geni che controllano il metabolismo. Il nostro gruppo di ricerca ha concentrato gli studi nell'uomo, utilizzando due popolazioni ad elevato rischio d'insorgenza del DT2, rappresentate da parenti di primo grado (FDR) di individui affetti da DT2, e da individui obesi. Gli studi *genome-wide* condotti negli individui FDR hanno portato alla generazione di un *dataset* contenente una completa profilazione epigenomica di questi soggetti, rispetto agli individui senza familiarità per il DT2. In aggiunta a questi *dataset*, abbiamo riscontrato alterazioni epigenetiche specifiche che influenzano la biogenesi mitocondriale (locus TFAM), la senescenza cellulare (locus ZMAT), il differenziamento adipocitario (locus HOXA5), che predispongono a disturbi neurodegenerativi (locus ADRA2), oltre a tre miRNA specifici che regolano l'espressione del gene IGF2. Molto recentemente, abbiamo anche dimostrato che, in individui obesi, la riduzione dell'espressione del gene *ANKRD26*, causata dall'ipermetilazione del suo promotore, è correlata all'aumento sia dell'indice di massa corporea che del rischio cardio-metabolico. Pertanto, l'alterata metilazione del gene *ANKRD26* rappresenta uno dei potenziali meccanismi tramite cui la dieta determina la suscettibilità a malattie cronic-degenerative, contribuendo alla loro patogenesi.

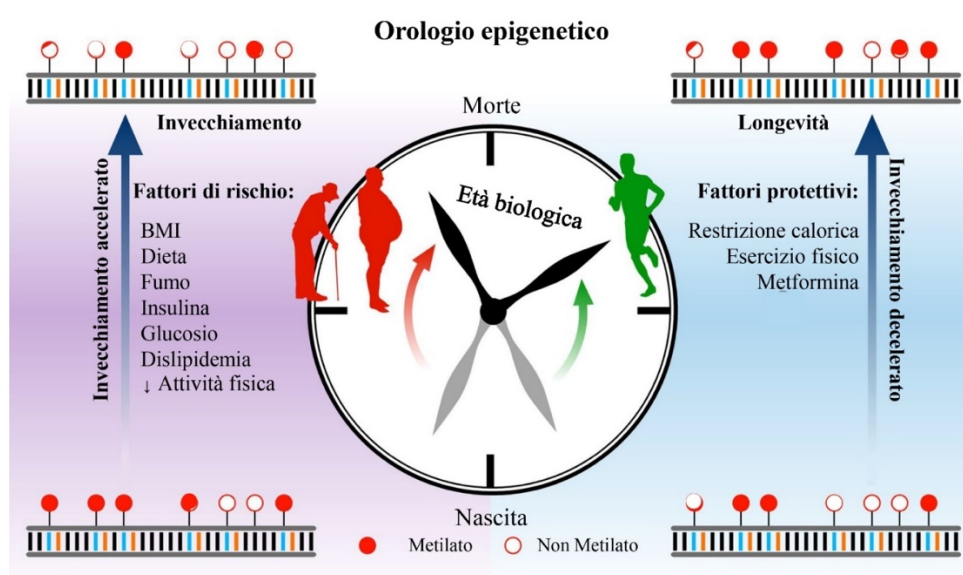
Quelli riportati in questa rassegna sono solo alcuni esempi di studi epigenetici. Negli ultimi decenni, l'impiego di piattaforme per analisi epigenetiche su larga scala, ha offerto la possibilità di ampliare il numero di epigenotipi specificamente associati all'invecchiamento ed alle malattie cronic-degenerative associate. A tal proposito, studi di metilazione del DNA *genome-wide* hanno messo in luce che le cellule di soggetti giovani presentano un genoma in cui la maggior parte dei siti CpG hanno citosine in forma metilata. Con l'avanzare dell'età, si osserva una perdita generalizzata di metilazione mentre alcuni specifici loci vanno incontro a ipermetilazione. La perdita di metilazione è più marcata nelle zone di DNA caratterizzate da sequenze ripetute, come gli elementi definiti Alu. L'ipometilazione degli elementi *Alu* è una caratteristica dell'invecchiamento ed è associata alla gravità di malattie tipiche dell'età avanzata, come il DT2, le patologie cardiovascolari e la malattia di Alzheimer. I figli di nonagenari e centenari, invece, mostrano un'ipometilazione ritardata degli elementi *Alu* rispetto ai controlli di pari età reclutati *random* dalla popolazione generale. Questo potrebbe spiegare il ritardo nell'insorgenza di malattie legate all'età e la prolungata sopravvivenza nei figli dei nonagenari e centenari. Recenti studi clinici sull'uomo hanno dimostrato che la metilazione del DNA di elementi *Alu* può essere specificamente aumentata dall'alimentazione, ovvero un consumo di cibi ricchi in fibre ed antiossidanti. Pertanto, interventi dietetici mirati potrebbero essere utili per revertire l'invecchiamento dell'epigenoma e promuovere la longevità.

Studi di associazione *epigenome-wide* hanno identificato centinaia di siti sparsi lungo l'intero genoma in cui i livelli di metilazione del DNA differiscono tra i soggetti giovani e quelli più anziani. Questi cambiamenti di metilazione del DNA sono talmente riproducibili da essere considerati, attualmente, i migliori candidati per lo sviluppo di biomarcatori di invecchiamento. Ciò ha consentito di elaborare i così detti "orologi epigenetici", ovvero degli algoritmi in grado di: *i.* stimare l'età anagrafica; *ii.* fornire una misura dell'età biologica, definita dallo stato fisiologico di un individuo e legata all'invecchiamento; *iii.* prevedere il rischio di insorgenza malattie legate all'età e di mortalità per tutte le cause. Questi algoritmi di predizione sono basati sulla percentuale di metilazione in corrispondenza di specifici siti CpG, il cui numero varia da un minimo di 3 ad un massimo di 1030, a seconda dell'orologio epigenetico considerato.

Uno degli orologi epigenetici più conosciuti ed utilizzato è quello sviluppato da Steve Horvath, poiché ha capacità di prevedere l'età in tutti i tipi di cellule e tessuti umani (escluso lo sperma) diversamente dagli altri orologi epigenetici, che possono essere applicati solo a un singolo tessuto. La differenza tra il valore vero dell'età anagrafica e quello stimato con gli orologi epigenetici, ovvero l'età del DNA metilato (*DNAm age*), riflette l'età biologica che è considerata un indicatore del tasso di invecchiamento umano. Pertanto, gli individui sono classificati come: *i.* biologicamente anziani, se la *DNAm age* è superiore all'età anagrafica; *ii.* biologicamente giovani, se è vero il contrario; *iii.* biologicamente compatibili, se la *DNAm age* e l'età anagrafica corrispondono. Coerentemente, i centenari risultano biologicamente giovani, mentre il rischio di mortalità è aumentato nei soggetti biologicamente anziani.

Questi dati hanno supportato l'idea che l'orologio epigenetico potesse realmente offrire una misurazione intrinseca dell'età biologica, divenendo nel giro di pochi anni un valido strumento per determinare se l'accelerazione della *DNAm age* si verifica in determinate malattie o in risposta a fattori ambientali, e soprattutto se può essere manipolata per rallentare l'invecchiamento biologico. A tal proposito, è stato dimostrato che malattie dell'età avanzata come obesità, DT2 ed alcuni tipi di cancro, sono associate ad un'accelerazione della *DNAm age*. Coerentemente, fattori ambientali identificati come fattori di rischio per le suddette patologie (consumo di una dieta ipercalorica, elevato indice di massa corporea, elevate concentrazioni sieriche di insulina, glucosio, trigliceridi e colesterolo totale; fumo, scarso numero di ore di sonno, stile di vita sedentario) accelerano la *DNAm age*, favorendo l'invecchiamento biologico. Al contrario, fattori protettivi che promuovono la longevità (restrizione calorica, esercizio fisico) rallentano la *DNAm age*, sfavorendo l'invecchiamento biologico. Un interessante studio clinico sull'uomo, condotto recentemente da Steve Horvath, ha rivelato che l'invecchiamento biologico non solo può essere

rallentato ma persino invertito. Lo studio aveva lo scopo di indagare la possibilità di utilizzare l'ormone della crescita umano ricombinante (rhGH) per prevenire o invertire gli effetti dell'invecchiamento sul sistema immunitario in una corte di soggetti di età compresa tra i 51 ei 65 anni, che rappresenta la fascia di età che appena precede il declino del timo e la riduzione nella produzione delle cellule T del sistema immunitario. Il rhGH è stato utilizzato sulla base delle prove precedenti scondo cui ha effetti di ricostituzione immunitaria e timotrofica negli animali e nei pazienti affetti da HIV. Tuttavia, questo ormone può causare iperinsulinemia. Pertanto, nel tentativo di limitare l'effetto "diabetogeno" del GH, la somministrazione di rhGH è stata combinata con quella di deidroepiandrosterone (DHEA) e metformina. Il DHEA migliora la sensibilità insulinica, opponendosi agli effetti deleteri sul metabolismo del normale invecchiamento. La metformina è un farmaco ipoglicemizzante usato per il DT2 ed agisce come potente mimetico della i restrizione calorica. Nello studio in questione 10 volontari sani hanno assunto, per un anno, un mix di rhGH, DHEA e metformina. Il risultato finale è stato una diminuzione media di circa 2,5 anni della loro età biologica, misurata mediante l'impiego di quattro diversi orologi epigenetici. Anche il sistema immunitario dei partecipanti ha mostrato un complessivo ringiovanimento. Gli effetti del trattamento si sono protratti nel tempo, come dimostrato dalle analisi condotte nei volontari sei mesi dopo l'interruzione della somministrazione dei farmaci. Sebbene si tratti di risultati preliminari, ottenuti con una sperimentazione che ha potuto contare su un numero ridotto di volontari, non si può non considerare gli enormi risvolti che essi potrebbero avere per studi sull'invecchiamento in generale. Infatti, la metformina viene da tempo testata come potenziale molecola anti-invecchiamento, per il suo potere protettivo contro le patologie legate all'età, come il DT2 e le patologie cardiache. Anche il cancro potrebbe essere un bersaglio della metformina in quanto è noto che le cellule tumorali abbiano un metabolismo prettamente glicolitico e che la frequenza di determinati tumori sia correlata con i livelli di glicemia.



Poiché gli orologi epigenetici forniscono una misura accurata dell'età biologica, ci si aspetta che trovino un largo impiego come biomarcatori di invecchiamento nella ricerca biomedica e nella medicina clinica. In questi ambiti potrebbero essere utilizzati per: I° testare la validità di differenti teorie sull'invecchiamento biologico; II° prevedere/pronosticare l'insorgenza di varie malattie legate all'età avanzata; III° valutare l'efficacia di interventi finalizzati a rallentare o invertire il processo di invecchiamento (adozione di uno stile di vita sano, interventi terapeutici di "ringiovanimento"). In altre parole, ci si aspetta che gli orologi epigenetici siano utili per studiare cosa causa l'invecchiamento e cosa si può fare contro di esso.

Referenze

- Spinelli R, Parrillo L, Longo M, et al. Molecular basis of ageing in chronic metabolic diseases. *J Endocrinol Invest.* 2020 Oct;43(10):1373-1389.
- Giacconi R, Malavolta M, Bürkle A, et al. Nutritional Factors Modulating Alu Methylation in an Italian Sample from The Mark-Age Study Including Offspring of Healthy Nonagenarians. *Nutrients.* 2019 Dec 6;11(12):2986.
- Salameh Y, Bejaoui Y, El Hajj N. DNA Methylation Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Front Genet.* 2020 Mar 10;11:171.
- Field AE, Robertson NA, Wang T, Havas A, Ideker T, Adams PD. DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Mol Cell.* 2018 Sep 20;71(6):882-895.

Fahy GM, Brooke RT, Watson JP, et al. Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans. *Aging Cell*. 2019 Dec;18(6):e13028.