



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA**

**TESI DI LAUREA**

**EFFETTI DELL'ATTIVITA' FISICA SU TELOMERI E INVECCHIAMENTO**

**RELATORE:**

**Prof.ssa Maria Teresa Conconi**

**LAUREANDO:**

**Riccardo Cazzola**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



# INDICE

1. CAPITOLO 1	1
1.1 INTRODUZIONE	1
2. CAPITOLO 2	2
2.1 PREDITTORI DELL'Età BIOLOGICA	2
2.2. L'orologio epigenetico	4
2.2.1. <i>DNAmAGE e mortalità</i>	5
2.2.2. <i>DNAmAGE e malattie dell'invecchiamento</i>	6
2.2.3. <i>DNAmAge e altri biomarcatori</i>	6
2.2.4. <i>Potenziati meccanismi</i>	7
2.3. Lunghezza dei telomeri	8
2.4. Predittori trascrittomici	9
2.5. Predittori proteomici	11
2.6. Predittori basati sulla metabolomica	11
2.7. Predittori con biomarcatori compositi	12
2.8. Predittori dell'età biologica negli animali	13
2.9. Considerazioni generali	14
3. CAPITOLO 3	17
3.1. Telomeri	17
3.2. Telomerasi	19
3.3. Patofisiologia	20
3.3.1. <i>Invecchiamento cellulare</i>	20
3.3.2. <i>Telomeri e stress ossidativo</i>	21
3.3.3. <i>Cancro</i>	21
3.3.4. <i>Immunoterapia contro il cancro mirata alla telomerasi</i>	22
3.4. Meccanismi associati all'accorciamento dei telomeri e attività fisica	22
3.4.1. <i>Attività della telomerasi</i>	23
3.4.2. <i>Stress ossidativo</i>	26
3.4.3. <i>Infiammazione</i>	27
3.4.4. <i>Diminuzione delle cellule satellite</i>	28
4. CAPITOLO 4	29
4.1. MANTENIMENTO DEI TELOMERI E ATTIVITA' FISICA	29
5. CAPITOLO 5	47
5.1. LUNGHEZZA DEI TELOMERI ED ESERCIZIO FISICO: FOCUS SUGLI ATLETI MASTER	47

6. CAPITOLO 6	57
6.1. TERT/ TELOMERASI ED ESERCIZIO FISICO	57
7. CONCLUSIONI	70
8. BIBLIOGRAFIA	71

# 1. CAPITOLO 1

## 1.1 INTRODUZIONE

Secondo l'OMS un anziano è una persona over 65 anni. L'invecchiamento è un processo fisiologico inevitabile e individuale; ciò significa che la modalità attraverso cui si invecchia è variabile a seconda dell'ambito sociale, economico, culturale in cui si vive, ma anche in base alle caratteristiche genetiche dell'individuo stesso. Quindi, vi sono soggetti che possono invecchiare in maniera diversa.

L'ISTAT mette a confronto la popolazione italiana negli anni 90 dove il 17% della popolazione aveva dai 0 ai 14 anni, il 69% della popolazione aveva dai 15 ai 64 anni e il restante 15 % della popolazione era anziana. Nel 2050 si stima che il 34% della popolazione sarà rappresentata da anziani over 65 anni.

La tendenza di aumento della popolazione anziana è in crescita sia in Italia che nel resto del mondo.

L'invecchiamento porta con sé un'alterazione fisiologica e questo è correlato ad un maggior consumo di farmaci e quindi ad una spesa sanitaria maggiore.

Nell'ultimo decennio, numerose ricerche si sono focalizzate sulla ricerca di biomarcatori molecolari e meccanismi coinvolti nell'invecchiamento biologico, al fine di rallentare tale processo e mantenere una buona qualità di vita. Tra i vari biomarcatori proposti, i telomeri sono tratti di DNA altamente ripetuto situati alle estremità di ciascun braccio cromosomico del DNA eucariotico. Questi cappucci sono una delle strutture più importanti che preservano l'integrità strutturale del DNA durante ogni ciclo di replicazione, poiché la DNA polimerasi non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione.

Numerosi studi hanno ipotizzato che il progressivo accorciamento dei telomeri ad ogni ciclo replicativo sia associato all'invecchiamento cellulare (fase di senescenza).

In questa tesi, dopo una panoramica dei potenziali biomarcatori candidati che possono essere considerati predittori dell'età biologica, verranno discussi l'importanza dei telomeri e dei meccanismi ad essi associati nel processo di invecchiamento, nonché gli effetti dell'attività fisica sul loro mantenimento.

## 2. CAPITOLO 2

### 2.1 PREDITTORI DELL'ETA' BIOLOGICA

Le informazioni riportate in questo capitolo sono tratte da Jylhävä et al. (2017).

L'età cronologica è un importante fattore di rischio per menomazioni funzionali, malattie croniche e mortalità. Tuttavia, esiste ancora una grande eterogeneità nei risultati sulla salute degli individui più anziani.

Alcuni individui appaiono fragili e richiedono assistenza nelle routine quotidiane già a 70 anni, mentre altri rimangono indipendenti dall'assistenza e sembrano sfuggire a gravi deterioramenti fisiologici fino a età molto avanzate. In linea con il tasso di crescita senza precedenti dell'invecchiamento della popolazione mondiale, vi è una chiara necessità di una migliore comprensione del processo di invecchiamento biologico e dei determinanti dell'invecchiamento in salute.

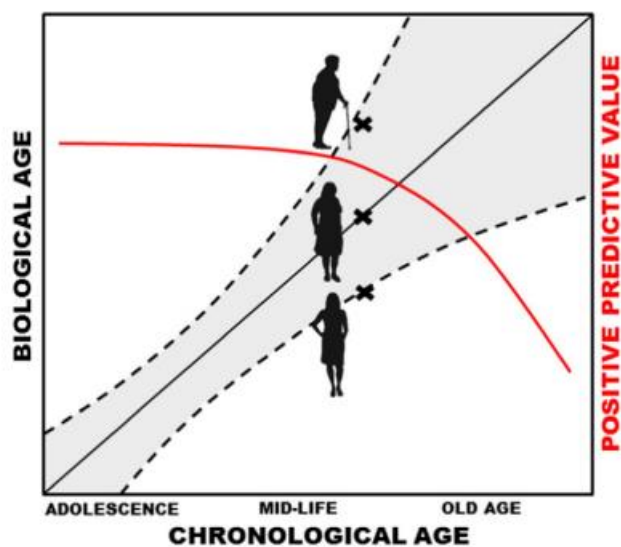
A questo scopo, è stata intrapresa una ricerca di marcatori biologici che traccino lo stato di invecchiamento biofisiologico e che forniscano informazioni sui meccanismi sottostanti.

Negli ultimi decenni, sono stati compiuti notevoli sforzi per identificare tali biomarcatori di invecchiamento che, secondo una definizione, sono "parametri biologici di un organismo che sia da soli o in un contesto multivariato, in assenza della malattia, prevedono la capacità funzionale in età avanzata, piuttosto dell'età cronologica". Successivamente, la Federazione americana per la ricerca sull'invecchiamento (AFAR) ha formulato i criteri per i biomarcatori dell'invecchiamento come segue:

1. Devono prevedere il tasso di invecchiamento. In altre parole, dire esattamente dove si trova una persona nella sua durata totale della vita. Devono essere predittori migliori della durata della vita rispetto all'età cronologica.
2. Devono monitorare il processo di base responsabile dell'invecchiamento, non gli effetti della malattia.
3. Devono poter essere testati ripetutamente senza nuocere alla persona. Ad esempio, un esame del sangue o una tecnica di imaging.
4. Devono funzionare nell'uomo e negli animali da laboratorio, come i topi. In tal modo possono essere testati su animali da laboratorio prima di essere convalidati nell'uomo.

L'esistenza di tali marcatori è stata messa in discussione, perché gli effetti di molte malattie croniche sono inseparabili dal normale invecchiamento. Il tasso di invecchiamento biologico può anche variare tra i diversi tessuti, e quindi potrebbe non essere fattibile ipotizzare un valore complessivo misurabile. D'altra parte, poiché manca il consenso sulla definizione, il termine "biomarker di invecchiamento" è stato ampiamente utilizzato in letteratura.

Di recente sono emersi diversi nuovi biomarcatori per l'invecchiamento biologico. Possono essere suddivisi in biomarcatori molecolari (basati su DNA, RNA ecc.) e biomarcatori fenotipici dell'invecchiamento (misure cliniche come pressione sanguigna, forza di presa, lipidi ecc). Di seguito, verrà riportata una panoramica dei nuovi predittori dell'età biologica, definiti come marcatori che predicono l'età cronologica, o che almeno possono distinguere "giovane" da "vecchio". Dovrebbero anche essere associati con un normale fenotipo di invecchiamento o una malattia legata all'età non trasmissibile indipendente dall'età cronologica nell'uomo (Fig. 1).



**Figura 1.** Il concetto dei predittori dell'età biologica. Un predittore dell'età biologica può essere definito come un biomarcatore correlato all'età cronologica (linea nera), che introduce informazioni aggiuntive nelle stime del rischio per condizioni legate all'età. Quindi, gli individui adulti della stessa età cronologica possono possedere rischi differenti per malattie associate all'età come valutato dalla loro età biologica (x nella figura). Di solito, un valore predittivo positivo (linea rossa) di un predittore dell'età biologica diminuisce dalla mezza età a causa dell'aumentata eterogeneità biologica nella vecchiaia (l'intervallo di confidenza visualizzato con la linea tratteggiata aumenta nella vecchiaia). (da Jylhävä et al, 2017)

Un elenco di predittori dell'età biologica discussi in questa tesi sono riportati in Tabella 1.

**Tabella 1.** Sommario dei predittori dell'età biologica (da Jylhävä et al, 2017)

Predictor	Method	Studies, N	Age-associated outcome
DNAmAge	DNA methylation	100+	Mortality, frailty, cognition, physical function, self-rated health, AD, PD, cancer
Telomere length	qPCR (T/S-ratio), Southern blot (bp)	1000+	Mortality, cancer, CVD, AD, physical function, cognition
Transcriptomic age	Gene expression	2	IL-6, urea, albumin, muscle strength, blood pressure, lipids, glucose, BMI, smoking
Glycan age	Glycans, proteomics	1	Fibrinogen, HbA1c, BMI, triglycerides, uric acid
Protein-derived age	Proteomics	1	Low birth weight, Framingham risk score
C-glyTrp	Metabolomics	1	Lung function, hip bone mineral density
Metabolic age score	Metabolomics	1	Mortality, kidney function, HbA1c, hyperglycemia
Composite biomarker	10 biomarkers combined	3	Mortality, IQ, physical function
Composite biomarker	19 biomarkers in a clustering approach	1	Mortality, cancer, CVD, T2D, physical function, cognition

AD, Alzheimer's Disease; PD, Parkinson's Disease; CVD, cardiovascular disease; T2D, type 2 diabetes; IL-6, interleukine 6; BMI, body mass index.

## 2.2 L'orologio epigenetico

Numerosi studi recenti hanno identificato come misura dell'età biologica la metilazione del DNA (DNAmAge), nota anche come orologio epigenetico, come un valido predittore dell'età biologica. Due di queste misure dell'orologio epigenetico, effettuate rispettivamente negli studi di (Horvath, 2013) e (Hannum et al., 2013), sono ad oggi probabilmente i risultati più importanti per i predittori dell'età cronologica. Entrambi mostrano correlazioni per quanto riguarda l'età avanzata ( $r = 0,96$  per Horvath e  $r = 0,91$  per Hannum) e piccole deviazioni medie dall'età cronologica (rispettivamente 3,6 e 4,9 anni) nelle corrispondenti coorti di validazione. Entrambi gli algoritmi sono stati sviluppati in grandi campioni ( $n = 8000$  per Horvath e  $n = 656$  per Hannum) che coprono l'intera durata della vita adulta e diverse etnie di popolazioni. L'orologio Horvath è un predittore multi-tessuto basato sui livelli di metilazione dei siti 353 CpG nell' Illumina 27 k array, mentre l'orologio Hannum utilizza solo i siti 71 CpG dall' Illumina 450 k array e offre prestazioni migliori utilizzando campioni di sangue intero. È stata effettuata la selezione dei siti CpG per entrambi i predittori utilizzando un modello simile di regressione penalizzato, ma hanno solo sei siti CpG in comune. Tuttavia, in studi indipendenti, le correlazioni tra gli orologi sembrano variare da abbastanza forti ( $r = 0,76$ ) a moderate ( $r = 0,37$ ).



### 2.2.1 DNAmAGE e mortalità

La caratteristica più sorprendente degli orologi Horvath e Hannum è la loro capacità di prevedere la mortalità per tutte le cause, indipendentemente dai classici fattori di rischio, quali età, indice di massa corporea (BMI), istruzione, fumo, attività fisica, consumo di alcol e alcune comorbidità.

Questo è stato verificato in una recente meta-analisi in 13 diverse coorti con una dimensione totale del campione di 13.089 soggetti.

Quando gli autori hanno suddiviso i campioni in sottogruppi per razza, sesso, tempo di follow-up, BMI, abitudine al fumo, attività fisica e determinate comorbidità sono stati in grado, con alcune eccezioni, di osservare associazioni di mortalità in gran parte simili tra i sottogruppi.

Inoltre, hanno dimostrato che una media ponderata dell'orologio Hannum basata sulla conta delle cellule del sangue associata all'invecchiamento superava le altre misurazioni dell'orologio in termini di associazioni statisticamente significative con la mortalità. Recentemente, due studi hanno affrontato la mortalità specifica per causa prevista dall'orologio epigenetico, in cui l'orologio è un predittore più forte per la mortalità da cancro rispetto a quella dovuta alle malattie cardiovascolari. In uno studio, i risultati suggerivano una relazione dose-risposta tra l'aumento del DNAmAge e l'incidenza e la mortalità da cancro; per ogni incremento di un anno della differenza tra età cronologica ed epigenetica (l'età  $\Delta$ ), c'era un aumento del rischio del 6% di sviluppare il cancro entro tre anni e un aumento del rischio del 17% di morire di cancro nei successivi cinque anni. Il fatto che i DNAmAge siano stati misurati nel sangue e non nel tessuto tumorale stesso rende questi risultati interessanti. Come hanno ipotizzato gli autori, l'effettivo legame potrebbe essere attribuito al ruolo delle cellule immunitarie (del sangue) nello sviluppo del tumore attraverso meccanismi infiammatori e processi pro-apoptotici, che possono entrambi accelerare l'invecchiamento epigenetico. Altri Autori hanno ottenuto risultati simili per la mortalità dovuta al cancro; tuttavia, hanno concluso che DNAmAge prevedeva anche la mortalità cardiovascolare, anche se l'analisi cardiovascolare aveva meno potenza ed era significativa solo per l'orologio di Horvath. Inoltre, in linea con le differenze di sesso nell'età complessiva di mortalità, sono state rilevate osservazioni coerenti di uomini con DNAmAge più elevati rispetto alle donne. Tuttavia, nonostante la forte evidenza epidemiologica, il problema principale è l'eventuale ruolo funzionale del DNAmAge nella mortalità. Mancano studi longitudinali che possano far luce sui cambiamenti del valore predittivo nel tempo.

### *2.2.2 DNAmAge e malattie dell'invecchiamento.*

Sono stati condotti diversi studi sull'associazione tra malattie legate all'età e DNAmAge. Nello specifico, l'accelerazione dell'orologio di Horvath nella corteccia prefrontale dei pazienti con malattia di Alzheimer (AD) era associata alla presenza di placche, carico di amiloide e declino del funzionamento cognitivo globale, della memoria episodica e del processo di memorizzazione.

Non è stata osservata nessuna associazione con cognizione e memoria in individui non dementi nello stesso studio. Quest'ultimo risultato è in linea con i risultati di un recente studio su gemelli di mezza età in cui non è stata riscontrata nessuna associazione tra DNAmAge nel sangue e capacità cognitive. Tuttavia, sono state osservate associazioni dirette quando la cognizione è stata valutata utilizzando misure psicometriche.

In pazienti con malattia di Parkinson (MdP), sebbene questi mostrino una conta dei granulociti marcatamente elevata, il loro DNAmAge è ancora elevato rispetto ai controlli anche dopo aver normalizzato la composizione delle cellule del sangue. I risultati di questo studio supportano quindi l'ipotesi che le caratteristiche immunoinfiammatorie periferiche, osservate come causa dell'invecchiamento accelerato del mieloma delle cellule sanguigne, siano coinvolte nella MdP.

Per quanto riguarda il cancro, l'orologio di Hannum mostra un aumento dell'età epigenetica nei tessuti tumorali testati, mentre l'orologio di Horvath indica un aumento di DNAmAge solo in determinati tipi di cancro. Tuttavia, l'aumento di DNAmAge nel sangue ha dimostrato di predire l'incidenza del cancro ai polmoni, come anche la mortalità dovuta al cancro. Infine, nell'osteoartrite, l'orologio di Horvath è stato associato ad una maggiore età epigenetica nell' articolazione della cartilagine colpita, ma non nell'osso o nel sangue nelle vicinanze.

### *2.2.3 DNAmAge e altri biomarcatori*

Le correlazioni tra DNAmAge e lunghezza dei telomeri, così come con misure cliniche, sono state generalmente basse o non significative.

Il DNAmAge e la lunghezza dei telomeri sono associati all'età e alla mortalità indipendentemente l'uno dall'altro. Inoltre, l'orologio di Horvath aggiustato per il tipo di cellula non è associato a malattie comuni e fattori di rischio come l'uso di alcol,

fumo, diabete, ipertensione e livelli di lipoproteine ad alta e bassa densità, insulina, glucosio, trigliceridi, proteina C-reattiva (PCR) e creatinina (Horvath et al., 2016).

Un'altra caratteristica interessante dell'orologio epigenetico è che la prole di semi-supercentenari mostra un'età epigenetica inferiore rispetto ai controlli della stessa età.

Poiché i centenari sono un eccellente esempio di anziani sani che sono riusciti a sfuggire o rimandare l'insorgenza delle principali malattie dell'invecchiamento, il DNAmAge giovanile della loro prole potrebbe indicare che i fattori comuni (genetici o ambientali condivisi) sono di importanza per la protezione dalle malattie dell'invecchiamento e il mantenimento dei DNAmAge

#### *2.2.4 Potenziali meccanismi*

Attualmente non è del tutto chiaro quale aspetto(i) fisiologico o dell'invecchiamento cellulare rappresenta l'orologio epigenetico. Anche se gli studi originali sull'orologio epigenetico hanno dimostrato che la stima dell'orologio è prossima allo zero nelle cellule embrionali e staminali pluripotenti, questa stima è correlata con il numero di divisioni cellulari e la frequenza di ticchettio è più alta durante la crescita dell'organismo. Quindi non è puramente un orologio mitotico, poiché tiene traccia dell'età cronologica nel tessuto non proliferativo come anche nel cervello.

Recenti lavori sperimentali in cellule endoteliali primarie hanno dimostrato che le cellule che sono state costrette alla senescenza replicativa e alla senescenza indotta da un oncogeno, mostravano un aumento di invecchiamento epigenetico, misurato utilizzando l'orologio di Horvath, mentre le cellule la cui senescenza veniva indotta da un danno al DNA no. Quindi, gli autori hanno concluso che l'invecchiamento epigenetico è una proprietà intrinseca delle cellule cioè disaccoppiato dalla senescenza di per sé. Questa conclusione è in qualche modo in linea con l'interpretazione di Horvath secondo il quale la misura del DNAmAge rappresenta la funzione del sistema di mantenimento epigenetico. Anche i fattori ormonali possono svolgere un ruolo importante, dato che la menopausa tardiva è associata a un minore danno al DNA e la menopausa stessa sembra anche accelerare l'invecchiamento epigenetico.

Ad oggi solo uno studio di associazione genome-wide (GWAS) ha riportato le associazioni genetiche per l'orologio epigenetico. I risultati di questo GWAS suggeriscono che varianti vicino a un gene mTOR complex2 (*MLST8*) e in un gene puntativo dell'RNA-elicasi (*DHX57*) sono associate all'età epigenetica, ma solo nel

cervelletto. Inoltre, l'orologio intrinseco di Horvath è stato suggerito rappresentare la fragilità complessiva del corpo, mentre l'orologio di Hannum è più correlato alle risposte immunitarie.

Complessivamente, l'orologio epigenetico sembra essere associato ad un ampio spettro di esiti dell'invecchiamento e per lo più alla mortalità. La sua predittività è osservabile in diversi tessuti, suggerendo un meccanismo pervasivo a livello di sistema. Tuttavia, poichè il concetto di orologio epigenetico è ancora agli inizi, è probabile che molti risultati negativi non siano stati dichiarati. Inoltre, mancano prove per la previsione della mortalità da parte dell'orologio epigenetico in tessuti diversi dal sangue. Infine, il tasso di invecchiamento epigenetico in un tessuto può essere molto diverso da quello di un altro e, ai fini dei biomarcatori, non è realistico ottenere una combinazione di stime dell'età epigenetica in diversi tessuti. Insieme ai progressi nelle tecnologie e a una maggiore copertura degli array, è probabile che presto sarà raggiunta una migliore comprensione della metilazione del DNA.

Le restanti domande irrisolte sono se, e in caso affermativo come, l'orologio e la velocità di progressione siano modificabili e se le variazioni nella metilazione rilevate con l'età e nei fenotipi invecchiati guidino effettivamente i fenotipi, o se rappresentino semplicemente il risultato di un altro meccanismo di controllo genomico, come la regolazione degli istoni.

### **2.3 Lunghezza dei telomeri**

I telomeri sono sequenze ripetitive di DNA che ricoprono i cromosomi, che si accorciano ogni volta che le cellule si dividono; quindi, la lunghezza dei telomeri è un popolare marcatore di invecchiamento biologico. Una meta-analisi su 36.230 partecipanti e uno studio sulla popolazione (n = 105.539) hanno evidenziato che le donne in media hanno telomeri più lunghi rispetto agli uomini. Quindi, le donne hanno un'età biologica inferiore rispetto agli uomini come determinato dalle lunghezze dei telomeri, evidenza che è in accordo con le misure del DNAmAge. Questa osservazione potrebbe essere correlata alla maggiore longevità osservata nelle donne, ma è importante tenerlo a mente quando si prende in considerazione l'associazione tra lunghezza dei telomeri e malattia. Pertanto, le associazioni riportate di seguito sono state identificate in analisi aggiustate per età e sesso.

Sebbene non sia stata ancora riportata alcuna meta-analisi sulla mortalità, l'associazione tra telomeri corti e aumento del rischio di mortalità è stato dimostrato ripetutamente in molti studi, e recentemente in un'ampia coorte di studio (n =

64.637). A differenza dell'orologio epigenetico, la lunghezza del telomero sembra funzionare altrettanto bene per le previsioni di mortalità da cancro e da alterazioni del sistema cardiovascolare e come accennato in precedenza, l'effetto è indipendente dell'orologio epigenetico.

Tuttavia, una meta-analisi sulla lunghezza dei telomeri e il rischio complessivo di cancro (23.379 casi e 68.792 controlli) ha mostrato un risultato nullo, indicando che i telomeri possono svolgere ruoli diversi per tumori diversi. I telomeri corti sono risultati fattori di rischio solo per i tumori gastrointestinali, della testa e del collo. Inoltre, la breve lunghezza dei telomeri è stata descritta come un fattore di rischio per malattie coronariche, come evidenziato da una meta-analisi di 43.725 partecipanti (8400 eventi) e da uno studio osservazionale su larga scala. In effetti, è stato suggerito che questa relazione sia causale dovuta a interferenze genetiche. Allo stesso modo, nei pazienti con malattia di Alzheimer (AD), la lunghezza dei telomeri si è dimostrata più breve, sia in studi osservazionali che randomizzati.

Per la MdP esistono solo piccoli studi con risultati inconcludenti. Anche i telomeri sono stati associati a molti tratti legati all'età come la cognizione e la funzione fisica. Tuttavia, gli studi e persino gli sforzi di meta-analisi sono stati spesso piccoli e con conclusioni limitate.

Un bias tecnico nella misurazione delle lunghezze dei telomeri può anche contribuire alla mancanza di risultati coerenti.

Per concludere, l'evidenza epidemiologica che suggerisce un ruolo causale dei telomeri nelle malattie dell'invecchiamento sta sfidando le attuali conoscenze e necessita di ulteriori approfondimenti, preferibilmente in studi longitudinali. La discussione su causa o conseguenza è valida non solo per i telomeri, ma per tutti i biomarcatori di invecchiamento ed è importante per le prospettive future di un invecchiamento in salute.

## **2.4 Predittori trascrittomici**

Ad oggi, sono stati creati due set di profili di espressione genica basati sul sangue che soddisfano i criteri per un predittore di età trascrittomico.

Il primo profilo è un predittore a cinque trascritti presentato da Holly e colleghi che lo hanno sviluppato troncando il loro precedente modello a sei trascritti che poteva distinguere gli individui più giovani (<65 anni) dai più vecchi ( $\geq 75$  anni) nella coorte InCHIANTI. Il predittore a cinque trascritti è stato testato in due ulteriori coorti (Exeter

10.000, n = 95) e nel San Antonio Family Heart Study (SAFHS, n = 1240) insieme al set di dati InCHIANTI (n = 698).

Gli autori hanno dimostrato che livelli più bassi di interleuchina-6 (IL-6) e di urea nel sangue, così come livelli più alti di albumina sierica e forza muscolare, sono stati riscontrati nel gruppo biologicamente giovane rispetto al resto. Tuttavia, non sono state osservate differenze per la funzione fisica, CRP, pressione arteriosa sistolica ed ematocrito.

Il secondo predittore trascrittomico era basato sui livelli di espressione di 1497 trascritti nelle popolazioni di discendenza europea. Il modello è stato testato in 7074 campioni di sangue umano da sei coorti indipendenti. Le analisi sono state aggiustate per sesso, conta cellulare, fumo e digiuno (ove disponibile). Il predittore è stato replicato in 7909 campioni di sangue da sette coorti indipendenti e un alto accordo ( $r = 0,972$ ) è stato osservato tra i risultati della prima analisi e dei set di replicazione.

Le correlazioni tra età trascrittomico ed età cronologica all'interno delle coorti variavano da 0,348 a 0,744 e le differenze medie assolute tra l'età trascrittomico prevista e l'età cronologica variavano da 4,84 a 11,21 anni (media = 7,8 anni).

Tuttavia, vi è stata solo una parziale sovrapposizione nella direzione del cambiamento nei 1497 trascritti tra cervelletto, corteccia frontale e distinti sottotipi di cellule del sangue, così come è successo con campioni di sangue di altri tentativi passati.

Ciò non sorprende dato che i profili di espressione genica tendono ad essere tessuto-specifici. Nell'analisi combinata di tutte le coorti, è stato osservato un  $\Delta$  età più elevato, che riflette un aumentato invecchiamento biologico/trascrittomico, direttamente associato a livelli più elevati di pressione arteriosa sistolica e diastolica, colesterolo totale, colesterolo HDL, livelli di glicemia a digiuno e BMI.

Anche i fumatori esibivano  $\Delta$  età più elevate anche dopo l'aggiustamento per il BMI.

È interessante notare che gli autori hanno anche esaminato le correlazioni tra il loro predittore trascrittomico e gli orologi epigenetici di Horvath e Hannum in due delle coorti.

Le correlazioni tra i predittori trascrittomici ed epigenetici variavano da 0,10 a 0,33 e, oltre al rapporto vita-fianchi, non hanno mostrato associazioni simili con i fenotipi di invecchiamento esaminati.

Quindi, sembra che l'età trascrittomico e l'orologio epigenetico descrivano diversi aspetti dell'invecchiamento biologico.

Quando si esaminano simultaneamente più coorti i cui profili trascrittomici sono prodotti utilizzando diverse piattaforme di array, è fondamentale controllare le variabili tecniche e la progettazione della sonda per accertare se i profili sono veramente indipendenti dalla piattaforma. Tuttavia, i predittori di età trascrittomici attendono ancora una convalida più ampia in studi di coorte indipendenti.

## **2.5 Predittori proteomici**

Negli ultimi due decenni, diversi studi hanno dimostrato gli effetti dell'invecchiamento sulla glicosilazione proteica misurata nel siero o nel plasma umano. Tuttavia, la maggior parte degli studi si basava su approcci non mirati in singole coorti, rendendo impossibile la validazione tra i diversi studi. Di recente, uno studio ha combinato quattro coorti europee per studiare la glicosilazione delle IgG nell'invecchiamento.

Un modello di previsione per l'età basato su tre singoli glicani, il GlycanAge, è stato costruito in una coorte e replicato bene nelle altre (tra cui era incluso TwinsUK). L'indice GlycanAge è stato associato a variabili di salute come fibrinogeno, HbA1c, BMI, trigliceridi e acido urico dopo la correzione per età e sesso.

Allo stesso modo, sono stati condotti studi individuali per studiare l'effetto dell'età sul proteoma nel plasma umano e nel fluido cerebrospinale.

L'unico tentativo finora di sviluppare un predittore di età è stato fatto da Menni e collaboratori che hanno calcolato una variabile di età derivata da quattro proteine, associate all'età trovate nel plasma (PTN, CHRDL1, MMP12 e IGFP6). Il predittore (formato sui dati di TwinsUK) è stato validato in coorti indipendenti e una delle proteine, CHRDL1, era associata a basso peso alla nascita, al punteggio di rischio di Framingham e ad altri fattori di rischio cardiometabolico. Tuttavia, questa variabile proteica non è stata testata per associazioni con esiti di salute.

## **2.6 Predittori basati sulla metabolomica**

Relativamente pochi studi hanno analizzato le associazioni con l'età nel metaboloma e questi studi sono stati condotti utilizzando diverse tecniche di misurazione. In uno studio è stato utilizzato un metodo di spettrometria di massa mirato a identificare 131 metaboliti nel siero a digiuno, dove 11 erano indipendentemente associati con l'età nelle femmine, in fase sia di scoperta (KORA F4) che di replicazione (TwinsUK), dopo gli aggiustamenti del BMI. Successivamente, gli stessi gruppi hanno combinato analisi

di spettrometria di massa non mirata ed età utilizzando la piattaforma Metabolon. Qui, TwinsUK è stata la coorte di scoperta, la quale ha trovato i 22 metaboliti indipendenti associati all'età, principalmente lipidi e amminoacidi.

Un metabolita selezionato, C-glyTrp, è stato ulteriormente replicato in KORA F4 e associato a tratti legati all'età come funzione polmonare e densità minerale ossea dell'anca dopo gli aggiustamenti per l'età.

Un altro studio, in un'indagine spettroscopica di risonanza magnetica nucleare (<sup>1</sup>H NMR) nell'urina umana, ha quantificato 59 metaboliti nei campioni. La costruzione di un Metabolic Age Score includeva tutti i metaboliti come predittori e l'età come risultato. Il punteggio dell'età metabolica è stato validato e replicato in due coorti indipendenti ed è risultato associato a esiti clinici indipendenti dall'età, ad esempio disfunzione renale, livelli elevati di HbA1c e iperglicemia.

È importante sottolineare che l'analisi della sopravvivenza ha mostrato che gli individui nel primo terzile del punteggio (età biologica inferiore) avevano tassi di sopravvivenza più alti per tutte le cause e che la previsione ha aggiunto valore rispetto ai fattori di rischio comunemente noti.

## **2.7 Predittori con biomarcatori compositi**

Altri tentativi di identificare i biomarcatori legati all'età si concentrano sulla combinazione di più biomarcatori in un predittore biologico dell'età. In uno studio, dieci biomarcatori significativamente associati all'età cronologica (CRP, creatinina sierica, emoglobina glicata, pressione sistolica, albumina sierica, colesterolo totale, fosfatasi alcalina sierica, volume di espirazione forzato e azoto ureico sierico) sono stati combinati in un predittore di età biologica nello studio NHANES III (n = 9389). La maggior parte dei biomarcatori era significativa anche nelle analisi stratificate per sesso e non sono state riportate differenze di sesso per il predittore di età. Usando i rischi proporzionali Cox, l'ultimo predittore di età a dieci biomarcatori era associato alla mortalità indipendentemente dall'età cronologica. Lo stesso modello di predizione è stato ulteriormente convalidato nello studio Dunedin, che è una coorte di età più giovane (n = 1037) seguita longitudinalmente.

Nelle analisi trasversali all'età di 38 anni, i partecipanti con età biologica più elevata hanno ottenuto un punteggio peggiore nei test del QI e nelle misure delle funzioni fisiche come equilibrio, forza e coordinazione motoria.

Risultati simili sono stati trovati per i cambiamenti longitudinali dell'età biologica, misurata su 12 anni, e della salute. Un approccio un po' diverso è stato recentemente



presentato in un altro studio, dove sono stati utilizzati 19 biomarcatori correlati all'età per raggruppare 4704 partecipanti della coorte LLFS basata su famiglie in 26 cluster diversi indipendentemente dall'età e dal sesso. La convalida è stata effettuata nello Studio FHS in cui la classificazione dei 26 cluster aveva una sensibilità compresa tra il 36% e il 100%, che era migliore di quella casuale. Inoltre, sono state trovate significative correlazioni dei profili dei biomarcatori con cambiamenti longitudinali nella funzione fisica e cognitiva, così come sono stati trovati significativi i rischi proporzionali per le malattie accidentali e la mortalità.

Uno studio di follow-up includeva misure sull'orologio epigenetico e la lunghezza dei telomeri in combinazione con il predittore biomarcatore composito di Levine nello studio Dunedin. Le correlazioni tra il predittore composito e Horvath e Hannum DNAmAge erano deboli (rispettivamente  $r = 0,08$  e  $r = 0,15$ ) ma significative. Tuttavia, nessuna correlazione con la lunghezza dei telomeri è stata osservata. Risultati sulla salute come QI e funzione fisica misurati nei partecipanti di Dunedin sembrano essere previsti meglio dal biomarcatore composito dell'età, poi dal DNAmAge e per niente dalla lunghezza del telomero. Nel complesso, un tipo di predittore dell'età biologica è correlato debolmente con altri tipi di predittori, indicando quindi che gli effetti sono per lo più indipendenti l'uno dall'altro, o almeno non misurabili con questi metodi.

Infine, uno studio che utilizza i dati di TwinsUK ha applicato un approccio multi-omico per indagare le relazioni tra i diversi biomarcatori dell'invecchiamento. Diversi predittori di età biologica sono stati studiati in quei dati, come discusso sopra, e qui i dati epigenetici, le misure metabolomiche, trascrittomiche e glicomiche sono state combinate in modelli grafici. Sfortunatamente, invece di utilizzare predittori dell'età predefiniti sono stati usati nei modelli più marcatori singoli, rendendo i confronti con studi precedenti di difficile interpretazione.

Tuttavia, collegare molti tipi di dati diversi e districare la relazione tra i diversi predittori dell'età biologica può far luce sul processo di invecchiamento e fornire un'ulteriore comprensione di ciò che contribuisce ad un sano invecchiamento.

## **2.8 Predittori dell'età biologica negli animali**

Sebbene i criteri AFAR per i biomarcatori dell'invecchiamento includano anche lavori su modelli animali, questa non è ancora una realtà.

Per l'orologio epigenetico, esistono alcune evidenze della sua funzionalità nelle grandi scimmie, ma non in specie con genomi più divergenti da quelli umani. Per quanto

riguarda la lunghezza dei telomeri ci sono stati principalmente studi nei roditori, ma anche negli uccelli, animali selvatici e *C. elegans* per citarne alcuni.

Tuttavia, nei topi il sistema di mantenimento dei telomeri funziona in modo diverso rispetto all'uomo e i topi hanno telomeri più lunghi che non raggiungono le stesse lunghezze critiche nonostante la loro breve durata di vita.

Gli studi trascrittomici sono stati eseguiti ampiamente nei topi e nei ratti, alcuni anche con l'obiettivo di trovare geni associati con l'invecchiamento. Inoltre, non sono stati studiati e testati predittori dell'età biologica. I confronti tra uomo e roditori sono sempre problematici a causa dei diversi array utilizzati e della mancanza di sequenze geniche omologhe. Allo stesso modo, la maggior parte delle analisi dei dati omici soffre delle stesse difficoltà. Pertanto, considerando i criteri di selezione di validazione indipendente e previsione degli esiti di salute, nessuno dei predittori di età biologica proposti è valido in nessun tipo di modello animale.

Pur non rientrando nella definizione di predittori dell'invecchiamento biologico, va notato che ci sono molte evidenze, ad esempio, sui marcatori dell'asse insulina/fattore di crescita insulino-simile che dimostrano utilità come marcatori di longevità e invecchiamento in salute sia nell'uomo che in tutto il regno animale.

## **2.9 Considerazioni generali**

In questo capitolo, le attuali conoscenze sui predittori dell'età biologica sono state riassunte e i diversi tipi di dati utilizzati sono stati discussi. Ci sono diversi predittori esistenti, dove i candidati più plausibili sono l'orologio epigenetico e la lunghezza dei telomeri. Entrambi sono stati testati in diversi tessuti e validati in molte coorti indipendenti, come indicato dal numero di studi nella Tabella 1. Tuttavia, funzionano tutti fornendo ulteriori prove sull'invecchiamento individuale indipendentemente dall'età cronologica e predicono con successo esiti di salute come funzione fisica, cognizione, morbilità e mortalità.

Nel tentativo di fare una panoramica delle conclusioni, è stato illustrato il numero di studi rispetto alla forza nella previsione della mortalità da parte dei predittori dell'età biologica, ove applicabile (Fig. 2). In breve, la lunghezza dei telomeri è ampiamente validata ma ha scarso potere predittivo. Il biomarcatore composito non è sufficientemente convalidato ma ha il potenziale per essere un predittore più forte dei telomeri, così come il Metabolic Age Score.

L'orologio epigenetico attualmente è più efficiente considerando entrambi gli aspetti. Altri predittori dell'età biologica possono rivelarsi utili, ma richiederebbero

un'ulteriore convalida. Altri ancora, come miRNA e ncRNA, possono emergere come una nuova classe di marcatori di invecchiamento una volta che ci saranno più dati; la conoscenza corrente di questi marcatori si basa in gran parte sul loro ruolo di regolazione nello sviluppo.

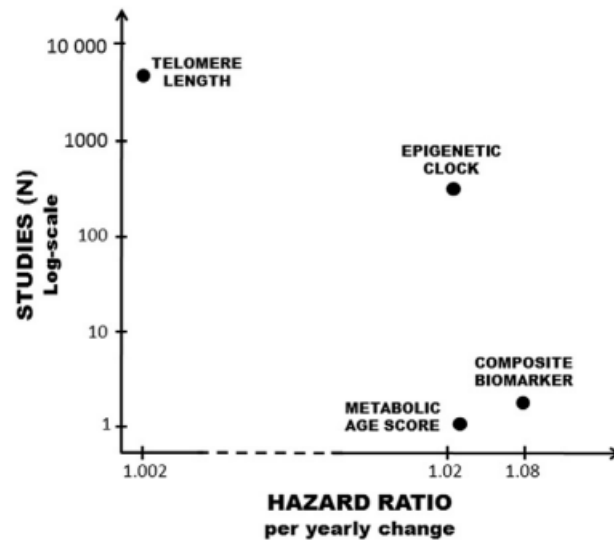
Non ci sono dubbi sul crescente interesse per la previsione dell'età biologica. Dato il fenomeno dell'invecchiamento globale, questa tendenza non si fermerà. È imperativo trovare un insieme validato di marcatori che possano prevedere la durata dello stato di salute, piuttosto che concentrarsi solo sulla mortalità e sulla durata della vita. Ciò potrebbe includere combinazioni di marcatori, ad es. un insieme di determinanti fisiologiche, genomiche ed ematiche, che predicano gli anni nei quali i soggetti non abbiano fragilità prima della morte. Idealmente, questa combinazione di marcatori sarebbe un indicatore utile sia a metà che a tarda età. Ci sono, tuttavia, una serie di sfide nell'identificare i biomarcatori nell'uomo, al di là dei problemi tecnici sopra menzionati e dell'eterogeneità dovuta al conteggio delle cellule. Questi includono il nostro accesso a dati longitudinali, la grande variabilità che vediamo tra gli esseri umani e il potenziale di confusione.

Tuttavia, finora abbiamo pochi indizi sul funzionamento dei meccanismi che predicano l'età biologica.

Ci sono state discussioni intorno agli aspetti sottostanti dell'orologio epigenetico, se essi descrivano il ticchettio cellulare o qualcos'altro.

Tuttavia, non sappiamo ancora quale sia la causa o la conseguenza dell'orologio epigenetico. Uno studio recente ha suggerito che l'adiposità provoca cambiamenti epigenetici e non il contrario.

D'altra parte, quando si tratta di altri predittori dell'età biologica, è stato suggerito che la lunghezza dei telomeri abbia un effetto causale sulla salute, e non è solo un indicatore di essa. Ulteriori dati longitudinali sono necessari per confermare ulteriormente la natura causale. Inoltre, i dati suggeriscono anche che la maggior parte dei predittori dell'età biologica che sono stati discussi hanno poca o nessuna interazione insieme. Pertanto, gli effetti sono indipendenti l'uno dall'altro e possono quindi descrivere diverse parti del processo di invecchiamento. Una combinazione di marcatori aumenterebbe il potere predittivo e dovrebbe essere ulteriormente studiata in campioni più grandi. In sintesi, combinazioni di predittori di età biologica possono essere utilizzate per monitorare il volto dell'invecchiamento, con il generale obiettivo di aumentare la durata della salute individuale e diminuire il fardello dell'assistenza sanitaria.



**Figura 2.** Numero di studi vs rischi di mortalità per i predittori dell'età biologica. Panoramica di 4 predittori dell'età biologica: lunghezza dei telomeri, orologio epigenetico, punteggio di età metabolica e biomarcatori compositi. Il rapporto di rischio per variazioni annuali nell'accelezione/decelerazione dell'età biologica per ciascun predittore è presentato sull'asse x. L'asse y presenta un'approssimazione del numero di studi su scala logaritmica dove il predittore è stato usato. (da Jylhävä et al, 2017)

## 3. CAPITOLO 3

Le informazioni riportate in questo capitolo sono tratte da Lee e Pellegrini (2021) e da Arsenis et al. (2017).

### 3.1 Telomeri

Il telomero è la regione terminale di un cromosoma composta di DNA altamente ripetuto che protegge l'estremità del cromosoma stesso, durante ogni ciclo di replicazione cellulare. I telomeri impediscono che le estremità dello stesso filamento o di due filamenti diversi di DNA si leghino tra loro, consentendo una replicazione completa dei cromosomi e fungendo da timer molecolare controllando la durata della vita di una cellula eucariotica. I telomeri impediscono inoltre che le estremità libere del cromosoma appaiano come rotture del doppio filamento del DNA, fatto che protegge le estremità da una riparazione accidentale del DNA.

Il telomero ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi, poiché la DNA polimerasi non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione. Se non vi fossero i telomeri la replicazione del DNA comporterebbe il rischio di una significativa perdita di informazione genetica ad ogni replicazione. Ad ogni replicazione i telomeri vengono tagliati, o accorciati. Diversi studi ipotizzano che il progressivo *accorciamento* dei telomeri ad ogni ciclo replicativo sia associato all'invecchiamento cellulare (fase di senescenza); essi, dunque, fungono da timer molecolare controllando la durata della vita di una cellula eucariotica. Dal punto di vista patologico, l'espressione disregolata del meccanismo di sintesi dei telomeri causa l'immortalità cellulare, portando a potenziale oncogenesi e tumorigenesi.

La struttura dei telomeri è costituita da basi azotate non codificanti (5'-TTAGGG-3'). Tuttavia, recenti scoperte hanno dimostrato che la struttura telomerica produce dei trascritti detti TERRA, che si ipotizza siano implicati nella regolazione della telomerasi. Nei mammiferi, i telomeri sono altamente conservati, indicando che questa sequenza nucleare rimane relativamente invariata nel corso della biologia evolutiva. Negli esseri umani, la lunghezza del segmento telomerico è compresa tra 5.000 e 15.000 paia di basi azotate. Questo lungo tratto di sequenze di DNA ripetitive è caratterizzato da una sporgenza a filamento singolo all'estremità 3', che si infila nell'estremità del

cromosoma, creando una conformazione chiamata *T-loop*. Da notare che la struttura biochimica del *T-loop* è termodinamicamente sfavorevole. Pertanto, sono necessarie delle proteine per la produzione e il mantenimento del *T-loop*, queste proteine sono chiamate complesso Shelterin.

Il complesso Shelterin è formato da 6 proteine che aiuta a creare la struttura del cappuccio terminale del cromosoma. Collettivamente, queste proteine proteggono le estremità del cromosoma da ricombinazioni, da instabilità e da segregazione cromosomica anormale. Le proteine Shelterin sono descritte come segue: TERF1 o TRF1 regola la lunghezza dei telomeri. TERF2 o TRF2 stabilizza il T-loop. POT1 inibisce la risposta al danno al DNA a livello della sporgenza a singolo filamento del telomero. Il fattore di reclutamento della telomerasi (ACD o TPP1) facilita il legame di POT1 al DNA telomerico a singolo filamento. TIN2 o TINF2 lega POT1 e ACD a TERF1 e TERF2. TIN2 è anche responsabile della stabilizzazione di TERF2 al telomero. TERF2 o RAP1, oltre alle proteine sopra menzionate, sono responsabili della regolazione della lunghezza dei telomeri.

Le funzioni principali di un telomero sono mantenere la stabilità cromosomica e prevenire la degradazione cromosomica. Inoltre, i telomeri proteggono le estremità del cromosoma dall'unione delle estremità del DNA, dalla risposta al danno al DNA e dalla ricombinazione accidentale del DNA.

La sporgenza più lunga dell'estremità ricca di G 3' che forma il *T-loop* protegge l'estremità di quel cromosoma dall'apparire come una rottura a doppio filamento nel filamento di DNA, prevenendo così la riparazione indesiderata del DNA. Per questi motivi, i telomeri e il loro necessario mantenimento sono essenziali per la stabilità genomica eucariotica e la longevità delle informazioni cellulari.

La replicazione del DNA è data dalla DNA polimerasi. Questo enzima è in grado di sintetizzare un filamento di DNA utilizzando come stampo un altro filamento di DNA e generando quindi un filamento complementare al primo. La DNA polimerasi ha la capacità di sintetizzare il DNA nella direzione da 5' a 3', la replicazione del DNA inizia con un primer a RNA, che viene sintetizzato dalla primasi, il primer a RNA consente al DNA di localizzare l'area del cromosoma in cui inizierà la replicazione. Il primer a RNA si appaia al DNA stampo per fornire un gruppo 3'-OH libero dove vengono aggiunti nuovi nucleotidi. Durante la sintesi del filamento principale, che va nella direzione da 5' a 3', è necessario un solo primer affinché la sintesi in questa posizione sia continua, questo porta all'aggiunta di nuovi nucleotidi in direzione della forca di replicazione. Allo stesso tempo, la sintesi del filamento di DNA avviene in modo discontinuo nella direzione da 3' a 5'. Sono necessari più primer a RNA per il filamento ritardato, questo perché la DNA polimerasi sintetizza piccoli segmenti di DNA chiamati frammenti di

Okazaki. Questi frammenti vengono poi uniti dalla DNA ligasi che forma il filamento continuo di DNA. Il problema nasce all'estremità 5' del filamento ritardato, dove si perde un tratto di DNA delle dimensioni del primer a RNA. Questo "problema della replicazione dell'estremità" si verifica quando il primer a RNA finale viene rimosso al termine della replicazione. La DNA polimerasi non può sintetizzare l'estremità del filamento ritardato a causa della mancanza di un gruppo 3'-OH dopo aver rimosso il primer a RNA. Pertanto, a causa delle proprietà intrinseche della DNA polimerasi, dopo ogni fase S della divisione cellulare, i telomeri si accorciano di 50-150 paia di basi.

### 3.2 Telomerasi

La sintesi di un telomero coinvolge una trascrittasi inversa chiamata telomerasi, che funziona come una DNA polimerasi RNA-dipendente. La telomerasi è presente nelle cellule germinali e staminali e ha una maggiore attività nelle cellule tumorali (nella maggior parte non tutte, si stima circa un 90% nei tumori umani). Questo enzima è responsabile dell'allungamento dei telomeri mediante l'aggiunta "*de novo*" di sequenze TTAGGG alle estremità 3' del cromosoma per prevenire la senescenza cellulare replicativa. La telomerasi è una struttura ribonucleoproteica che comprende due parti: un componente funzionale a RNA e un componente catalitico della trascrittasi inversa. Il componente a RNA ospita un modello per la sintesi del DNA telomerico. Negli esseri umani, il componente funzionale a RNA è chiamato hTERC o hTR. È codificato dal gene TERC situato nella regione 3q26 del cromosoma. Il componente della trascrittasi inversa è chiamato hTERT ed è codificato dal gene TERT situato nel cromosoma 5p13.33.

Sebbene il complesso centrale della telomerasi sia costituito principalmente dai due componenti principali, hTERC e hTERT, esistono proteine di supporto essenziali per il corretto funzionamento dell'intera struttura della telomerasi. Tcab1, Gar1, Nhp2, Reptin e Pontin sono proteine necessarie per l'assemblaggio della telomerasi e il corretto reclutamento dei cromosomi. Successivamente, le proteine responsabili della stabilizzazione della struttura della telomerasi sono TEP1 e Dyskerin. Infine, le subunità proteiche aggiuntive, Es1p ed Es3p, aiutano nell'assemblaggio e nella maturazione del complesso catalitico.

### 3.3 Patofisiologia

#### 3.3.1 Invecchiamento cellulare

I telomeri svolgono un ruolo cruciale nella senescenza cellulare e, quindi, nell'invecchiamento biologico. La senescenza cellulare si riferisce alla perdita irreversibile della capacità di divisione cellulare. Il problema della replicazione delle estremità, che comporta la perdita di coppie di basi durante ogni fase S, può esporre le estremità del DNA di una cellula somatica, attivando un processo chiamato risposta al danno del DNA (DDR). Lo scopo di questo fenomeno è prevenire la fusione anormale delle estremità cromosomiche esposte e l'instabilità cromosomica. Senza l'allungamento dei telomeri, dovuto alla telomerasi, che è caratteristico della maggior parte delle cellule somatiche, i telomeri si accorciano. La telomerasi ha la capacità di allungare le strutture dei telomeri; tuttavia, con l'attivazione persistente della risposta al danno del DNA telomerico, oltre al danno al DNA, verrà suscitato un segnale di inizio della senescenza. La senescenza cellulare, o senescenza replicativa, inizierà anche quando il telomero si accorcia al di sotto di una lunghezza critica.

La DDR coinvolge molteplici vie di segnalazione cellulare che attivano i punti di controllo del ciclo cellulare per prevenire la formazione di mutazioni potenzialmente patofisiologiche. Nelle cellule tumorali, come descritto più avanti, la capacità illimitata di auto-rinnovamento viene acquisita attraverso l'attivazione non inibita della telomerasi.

Quindi il continuo accorciarsi dei telomeri è correlato alla senescenza delle cellule della linea somatica, questo perché i telomeri agirebbero come una sorta di *orologio biologico*, legato cioè ad un numero massimo di mitosi e di repliche del DNA, al termine del quale la cellula sarebbe *troppo vecchia* per essere mantenuta in vita e prenderebbe la via dell'apoptosi ovvero la morte cellulare programmata. Questo è un meccanismo biologico che l'evoluzione ha selezionato come arma contro lo sviluppo dei tumori proprio per la sua capacità intrinseca di bloccare la crescita cellulare.

Il meccanismo molecolare attraverso cui i telomeri troppo corti possono portare alla morte cellulare sembra essere legato alla perdita del loro corretto ripiegamento naturale (evento legato ad una loro dimensione troppo ristretta). Secondo alcune teorie comunemente accettate, la cellula è infatti in grado di riconoscere questo diverso ripiegamento come danno al DNA, avviando il *pathway* dell'apoptosi sulla base dell'attività di molecole come p53. Tale processo di morte cellulare può anche essere avviato da una fusione tra cromosomi.



### 3.3.2 Telomeri e stress ossidativo

I fattori di stress del DNA includono numerosi fattori endogeni ed esogeni come la disfunzione mitocondriale, il fumo di sigaretta, il consumo di alcol, l'infiammazione, una dieta ricca di grassi e altri stili di vita e fattori ambientali.

Gli induttori della senescenza cellulare includono anche la chemioterapia e le radiazioni. Ancora più importante, la relazione tra questi induttori e la senescenza cellulare è la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ricercatori ritengono che i telomeri ricchi di G siano particolarmente suscettibili allo stress ossidativo. Inoltre, i telomeri hanno una risposta al danno del DNA repressa, che porta a una riparazione del DNA inefficiente se esposti a danno ossidativo.

L'obesità è altamente associata all'infiammazione cronica e all'aumento dei livelli di ROS nel tessuto adiposo. I pazienti con un indice di massa corporea (BMI) più elevato sono associati a un volume sanguigno più elevato, che porta a una maggiore proliferazione delle cellule del sangue, tutte correlate all'accorciamento dei telomeri. È stato anche riportato che la lunghezza dei telomeri è inversamente correlata con i pazienti che soffrono di stress psicosociale e disturbo depressivo maggiore a causa dell'aumento dello stress ossidativo e dei fattori infiammatori.

In particolare, è stato riportato che coloro che fanno attività fisica regolare hanno telomeri più lunghi.

### 3.3.3 Cancro

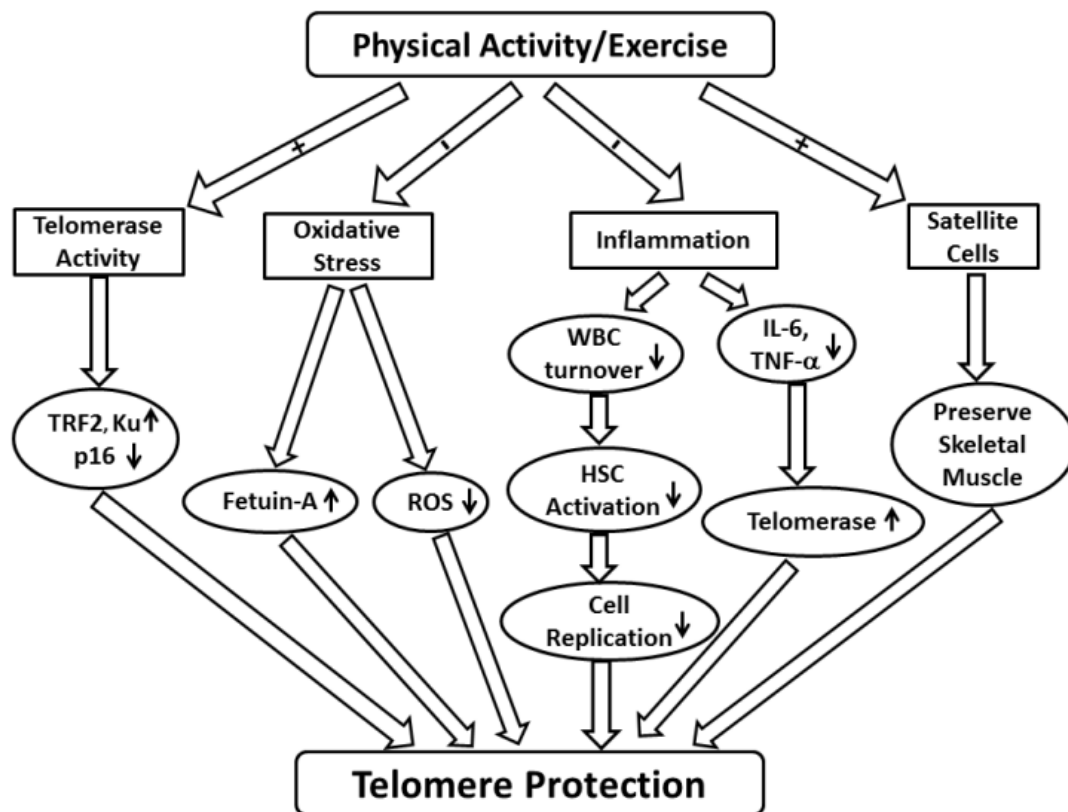
Al contrario della sintesi dei telomeri da parte della trascrittasi inversa, la telomerasi, è assente nella maggior parte delle cellule somatiche umane, si trova in più del 90% delle cellule tumorigeniche e delle cellule immortalizzate *in vitro*. La telomerasi acquisisce una funzione oncogenica quando la sua espressione è disregolata nelle cellule somatiche umane. L'amplificazione del gene hTERT, che deriva da una rottura nei siti del DNA o da fusioni cromosomiche anormali, provoca una sovraregolazione patologica dell'attività della telomerasi. L'immortalizzazione delle cellule tumorali tramite il coinvolgimento di hTERT può avvenire anche mediante metilazione del promotore di hTERT. La metilazione impedisce il legame dei repressori trascrizionali che bloccano il meccanismo di trascrizione. Le mutazioni del promotore TERT sono state implicate anche nelle cellule di tumori, tra cui uroepiteliale, vescicale, tiroideo, melanoma cutaneo, carcinoma a cellule basali, carcinomi a cellule squamose e glioblastoma.

### *3.3.4 Immunoterapia contro il cancro mirata alla telomerasi*

Poiché l'attività della telomerasi sovraregolata è significativa nelle cellule tumorali, hTERT rappresenta un antigene tumorale attraente per l'immunoterapia contro il cancro mirata alla telomerasi. Esistono diversi approcci, inclusi gli inibitori formati da oligonucleotidi, gli approcci immunoterapeutici e la terapia genica diretta dalla telomerasi. Gli inibitori a oligonucleotidi sono acidi nucleici modificati che sono in grado di inibire la telomerasi, inducendo così l'accorciamento dei telomeri e la senescenza cellulare forzata e l'apoptosi. Gli approcci immunoterapeutici utilizzano linfociti T ad alta avidità che sono reattivi contro l'enzima catalitico. Infine, la terapia genica diretta alla telomerasi comporta l'uccisione selettiva delle cellule tumorali prendendo di mira i promotori della telomerasi.

### **3.4 Meccanismi associati all'accorciamento dei telomeri e attività fisica**

Sia le malattie croniche che il processo di invecchiamento sono note per essere associate alla diminuzione della lunghezza dei telomeri, ma potrebbe essere possibile preservare la lunghezza dei telomeri con l'esercizio fisico. Anche se la letteratura esistente non fornisce prove sperimentali adeguate a stabilire pienamente la relazione meccanicistica tra esercizio fisico e la lunghezza dei telomeri, esistono i seguenti potenziali meccanismi per spiegare come l'attività fisica possa influenzare la lunghezza dei telomeri: attività della telomerasi, stress ossidativo, infiammazione e contenuto di cellule satellite del muscolo scheletrico (Figura 3).



**Figura 3.** Rappresentazione schematica dei potenziali effetti dell'attività fisica e dell'esercizio sulla lunghezza dei telomeri. (da Arsenis et al, 2017)

### 3.4.1 Attività della telomerasi

Sebbene la lunghezza dei telomeri mostri un progressivo accorciamento correlato all'età, la telomerasi ha dimostrato un modello bifasico di espressione. È stato osservato che dai 4 ai 39 anni si ha una progressiva diminuzione sia della lunghezza dei telomeri che dell'attività della telomerasi. Tuttavia, in individui di età pari o superiore a 40 anni, dove la lunghezza dei telomeri continua a diminuire progressivamente, il 65% degli individui presenta un'attività telomerasica stabile ma bassa, e il restante 35% non ha attività telomerasica.

L'attività fisica potrebbe svolgere un ruolo in questi processi.

In uno studio sono stati confrontati individui che praticavano atletica leggera con adulti sedentari e si è riscontrata una sovraregolazione di TRF2 (Telomeric repeat-binding factor 2) negli atleti (sia giovani che di mezza età). Questa proteina svolge un ruolo importante nella protezione dell'accorciamento dei telomeri. Nei giovani atleti, non vi è stato alcun cambiamento nell'espressione di p16, un regolatore negativo

della progressione del ciclo cellulare, né delle proteine Ku, che fanno parte del percorso di riparazione del DNA. Tuttavia, negli atleti di mezza età, c'era una sottoregolazione della p16 e una sovraregolazione dell'mRNA di Ku. Questi risultati suggeriscono che parallelamente alla regolazione di TRF2, altre proteine associate come le proteine p16 e Ku possono svolgere un ruolo importante nella protezione dei telomeri in risposta all'esercizio fisico, negli individui di mezza età. Non è stata osservata alcuna differenza nella lunghezza dei telomeri dei leucociti tra giovani atleti e giovani individui sedentari. Tuttavia, gli adulti sedentari di mezza età avevano telomeri più corti rispetto agli atleti di mezza età (Tabella 2). Ciò concorda con la sovraregolazione osservata di TRF2 negli atleti giovani e di mezza età, nonché con la sovraregolazione osservata delle proteine Ku negli atleti di mezza età.

**Tabella 2.** Effetti dell'attività fisica/esercizio sulla lunghezza dei telomeri nei leucociti: studi osservazionali. (da Arsenis et al, 2017)

Study, Year	Participants	Physical Activity/Exercise Type	Influence on Telomere Length
Cherkas et al., 2008	2401 white twin adults	Self-reported physical activity (4 groups based on physical activity levels)	Longer leukocyte telomere length with increasing physical activity level.
Ludlow et al., 2008	69 adults	Various aerobic exercise (divided into quartiles based on exercise energy expenditure: 0-990, 991-2340, 2341-3540, and 93541 kcal/wk)	Longer leukocyte telomere length in 2 <sup>nd</sup> quartile vs. 1 <sup>st</sup> and 4 <sup>th</sup> quartile. Same telomere length in 2 <sup>nd</sup> quartile vs. 3 <sup>rd</sup> quartile.
Werner et al., 2009	58 young and 46 older adults (47 healthy non-athletes, 57 middle and long-distance runners)	Young athletes: 73±4.8 km/wk Older athletes: 80±7.5 km/wk; 35±2.7 years of training experience	Longer leukocyte telomere length, higher telomere-stabilizing proteins, lower telomere erosion in athletes vs. non-athletes. Longer telomere length in older athletes vs. older non-athletes. Same telomere length in young athletes vs. young non-athletes.
LaRocca et al., 2010	25 healthy young and 32 older adults (30 sedentary subjects, 27 endurance exercisers)	Vigorous aerobic exercise ≥5 days/week, >45 min/day, ≥5 years	Same leukocyte telomere length in older athletes vs. older sedentary subjects Same telomere length in young athletes vs. young non-athletes.
Song et al., 2010	80 healthy adults	Self-reported physical activity	Self-reported physical activity was not associated with leukocyte telomere length, but was associated with accumulation of DNA damage.
Krauss et al., 2011	944 adults with stable coronary heart disease	Self-reported physical activity	Self-reported physical activity was associated with shorter telomere length, but not after multivariate adjustment
Du et al., 2012	7,813 adult women	Eight possible physical activities, usual walking pace, and the number of flights of stairs climbed daily.	Calisthenics/aerobics-associated increase in leukocyte telomere length (0.10-SD) was observed when comparing the most to the least active women.
Kim et al., 2012	44 healthy postmenopausal women (21 sedentary subjects, 23 habitual exercise participants)	Aerobic and resistance exercise for 60+ minutes, > 3 times per week, for > 12 months	Longer leukocyte telomere length in exercise participants vs. sedentary subjects.
Denham et al., 2013	123 males (56 healthy non-marathon runners, 67 ultra-marathon runners)	Ultra-marathon running, average distance 40-100 km/week, ≥2 years	Longer leukocyte telomere length in runners vs. non-runners.
Mathur et al., 2013	32 middle-aged adults (15 healthy sedentary subjects, 17 marathon runners)	Marathon running, 32±9 miles/week, 14±11 years	Same leukocyte telomere length in runners vs. sedentary subjects.
Borghini et al. 2015	62 adults (20 athletes, 42 sedentary controls)	Endurance training	Longer salivary telomere length in endurance athletes vs. sedentary controls.
Loprinzi et al 2015	6503 adults	Movement-based behaviors (moderate-intensity and vigorous intensity physical activity, walking/cycling for transportation, and muscle-strengthening activities)	A clear dose-response relation was observed between movement-based behaviors and leukocyte telomere length.

Soares-Miranda et al 2015	582 older adults	Self-reported physical activity	Cross-sectional and longitudinal analyses showed no significant associations between physical activity and leukocyte telomere length
Saßenroth et al 2015	815 older adults	Self-reported physical activity	Physical activity was positively associated with leukocyte telomere length. Practicing a sport for > 10 years associated with longer telomeres.
Silva et al 2016	46 older adults (15 intensively trained, 16 moderately trained, 15 untrained)	Intensive training: training $\geq$ 5 days/week (>50 km/week); moderate training: playing volleyball, basketball, or running less than 6 km, 2-3 days/week	Longer leukocyte telomere length in trained vs. untrained older adults.
Latifovic et al 2016	477 healthy adults	Self-reported physical activity	More vigorous physical activity was associated with longer leukocyte telomere length.
Loprinzi et al 2016	6474 adults	Self-reported physical activity	Meeting physical activity guidelines for running, but not other modes, was associated with longer leukocyte telomere length.
Kanel et al 2016	203 African and Caucasian school teachers	Objectively measured physical activity	Habitual physical activity was not associated with leukocyte telomere length.

### 3.4.2 Stress ossidativo

L' eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno può causare stress ossidativo nelle cellule, tessuti o organi, portando a danni al DNA, senescenza cellulare o apoptosi. E' stato evidenziato che lo stress ossidativo è collegato sia con il logoramento dei telomeri che con l' invecchiamento biologico. Inoltre, livelli diminuiti di fetuin-A, una glicoproteina prodotta dal fegato, sono stati associati ad accorciamento telomerico dei leucociti e aumento del rischio di cancro al colon-retto e anche ad un rischio maggiore di malattie cardiovascolari.

Lo stress ossidativo costante può compromettere i meccanismi di riparazione del DNA telomerico, è stato proposto che l'esercizio fisico cronico può ridurre lo stress ossidativo e quindi proteggere i telomeri dall'accorciamento dovuto a un eccesso di ROS. Anche se lo stress ossidativo può essere dannoso per i telomeri, livelli adeguati di ROS possono avere un effetto protettivo. Ad esempio, uno studio recente ha riportato che i telomeri dello sperma vengono allungati da un lieve stress ossidativo e sono accorciati da un intenso stress ossidativo. Dunque, sembra che la relazione tra la lunghezza dei telomeri e lo stress ossidativo sia finemente bilanciata, per cui una certa quantità di ROS può aiutare nel mantenimento dei telomeri, ma questo livello deve essere inferiore ad alcune soglie per non essere dannoso. Fattori dello stile di vita diversi dall'esercizio fisico svolgono un ruolo potenzialmente importante nella modulazione della lunghezza dei telomeri attraverso l'alterazione dello stato redox.

Per esempio, diete ad elevato contenuto di antiossidanti presenti nelle verdure e nei cereali integrali migliorano il mantenimento dei telomeri. Gli acidi grassi omega-3 sono emersi come una strategia promettente ma poco studiata per combattere il logoramento dei telomeri nel tempo.

### *3.4.3 Infiammazione*

Gli effetti dell'attività fisica oltre ad avere un effetto protettivo sui telomeri, attenuano l'infiammazione cronica. Ad esempio, l'infiammazione sistemica cronica aumenta il turnover cellulare dei globuli bianchi (WBC), che incrementa il tasso di logoramento dei telomeri. Con l'aumento del turnover dei WBC, la divisione delle cellule staminali ematopoietiche si attiva, aumentando la replicazione cellulare e questo successivamente porta ad un accorciamento dei telomeri.

Il (TNF)- $\alpha$  può causare l'accorciamento dei telomeri sottoregolando la telomerasi. I telomeri accorciati dei leucociti possono essere collegati a concentrazioni elevate sia di interleuchina (IL)-6 che di TNF- $\alpha$ . Inoltre, individui

con concentrazioni elevate sia di IL-6 che di TNF- $\alpha$  hanno maggiori probabilità di avere telomeri leucocitari accorciati rispetto a quelli con alte concentrazioni di una sola di queste molecole. Da notare, però, che, nello stesso studio, la proteina C-reattiva (CRP) non era associata alla lunghezza dei telomeri, sebbene altri studi abbiano osservato una relazione negativa tra la lunghezza dei telomeri e livelli di CRP tra i pazienti con diabete di tipo 2.

È stato riportato che i pazienti con malattia polmonare ostruttiva cronica (BPCO) possiedono una lunghezza dei telomeri leucocitari mediamente più breve rispetto ai controlli sani; questo può essere collegato allo stato di infiammazione cronica in questi pazienti. In particolare, i livelli di IL-6 erano inversamente correlati con la lunghezza dei telomeri nella BPCO. In uno studio è stata descritta la complessa interrelazione tra invecchiamento, infiammazione e lunghezza dei telomeri. Le seguenti proteine potrebbero essere coinvolte nell'induzione dell'infiammazione e nella disfunzione dei telomeri: fattore nucleare kappa B, poly (ADP ribosio) polimerasi 1, Wnt, proteina attivatore-repressore 1 e trascrittasi telomerica inversa. La manipolazione di queste proteine come strategia terapeutica è promettente per combattere l'infiammazione e le malattie legate all'invecchiamento.

L'attività fisica è negativamente correlata ai livelli di marcatori infiammatori circolanti e l'allenamento fisico contribuisce alla riduzione dei livelli di marcatori infiammatori negli individui con elevata infiammazione cronica.

#### *3.4.4 Diminuzione delle cellule satellite*

Le cellule satelliti sono precursori delle cellule muscolari scheletriche che possono rigenerare le cellule muscolari o le cellule satellite aggiuntive in risposta a lesioni muscolari. Dopo i 70 anni, il numero di cellule satellite diminuisce. Ciò potrebbe contribuire alla riduzione della massa muscolare osservata negli individui sedentari, in particolare durante l'invecchiamento. Si stima che circa il 40% del tessuto muscolare venga perso a partire dai 70 anni negli individui sedentari. Nelle donne anziane è stata segnalata una correlazione positiva tra la quantità di cellule satellite e la lunghezza dei telomeri del muscolo scheletrico, e le cellule satellite possono fungere da meccanismo attraverso il quale l'attività fisica può preservare il muscolo scheletrico negli anziani. L'attività fisica agisce stimolando il pool di cellule satelliti, che contrasta il declino delle stesse che si verifica con l'invecchiamento. Pertanto, il contenuto delle cellule satellite rappresenta un altro fattore modificabile che può essere alterato in risposta a diversi livelli di attività fisica e quindi assume un potenziale ruolo nell'associazione tra lunghezza dei telomeri e attività fisica. È stato suggerito che l'accorciamento dei telomeri delle cellule satelliti possa portare ad una ridotta capacità di replicazione nelle cellule satelliti stesse. Questo meccanismo può essere importante per spiegare la perdita di massa muscolare correlata all'età.



## 4. CAPITOLO 4

### 4.1 MANTENIMENTO DEI TELOMERI E ATTIVITÀ FISICA

Nella revisione di Gardner et al. (2019) sono stati identificati ed esaminati 43 articoli, relativi a studi controllati randomizzati (RCT), studi osservazionali e studi interventistici. Per l'analisi della biologia dei telomeri (TL), il TL è stato determinato principalmente nei leucociti mediante qPCR. In qualche caso, specialmente negli studi RCT e interventistici, sono stati analizzati diversi tipi di campioni come saliva, sperma e biopsie muscolari; venivano anche studiati diversi tipi di cellule leucocitarie e potenziali marcatori genetici nella regolazione della biologia dei telomeri.

Gli RCT (n = 8) hanno mostrato risultati incoerenti riguardante l'aumento della lunghezza del TL con l'attività fisica, ad esempio, in donne obese in post-menopausa. Rispetto a uno stile di vita prevalentemente sedentario, gli studi osservazionali (n=27) hanno mostrato un TL significativamente più lungo con esercizi di intensità da moderata a vigorosa; tuttavia, non c'erano dati sulla durata e sul tipo di attività fisica e sulle modalità di allenamento. Anche gli studi interventistici (n=8) hanno mostrato risultati simili con TL significativamente più lunghi dopo l'esercizio; tuttavia, questi studi avevano un numero minore di partecipanti iscritti (principalmente atleti esperti) e l'attività fisica copriva un intervallo di intensità da lieve-moderato-vigorous. Tra gli studi selezionati, l'allenamento aerobico di intensità da moderata a vigorosa era il più diffuso.

Complessivamente, un regolare allenamento aerobico di intensità da moderata a vigorosa sembra aiutare a preservare il TL. Tuttavia, l'intensità ottimale, la durata dell'attività fisica e il tipo di esercizio devono ancora essere ulteriormente chiariti. Il livello di forma fisica dei partecipanti, il tipo di attività fisica, le modalità di allenamento insieme al TL o all'attività della telomerasi dovrebbero essere valutati in momenti diversi negli studi futuri, pianificando un follow up a lungo termine. Riducendo l'attività sedentaria si può avere un effetto positivo nel preservare e aumentare il TL.

E' necessaria un'ulteriore caratterizzazione molecolare della biologia dei telomeri in diversi tipi di cellule e tessuti per trarre delle conclusioni definitive su come l'attività fisica influisce sul TL e sull'invecchiamento.

### **Studi RCT**

Gli studi RCT (n=8) erano incoerenti nei loro risultati, con cinque di essi che supportavano la conservazione o l'allungamento della lunghezza dei telomeri (TL) con l'attività fisica (Tabella 3). Le discrepanze tra i tre RCT rimanenti possono essere attribuite a differenze nelle caratteristiche fisiche dei partecipanti (ad esempio età, obesità, genere e livello di attività fisica). Era stato condotto uno studio RCT su una popolazione di 212 donne fisicamente inattive, in post-menopausa. Questo studio prevedeva un intervento di esercizio aerobico al 70-80% della capacità di frequenza cardiaca per dodici mesi e la misurazione del TL rispetto alle coetanee inattive. I risultati non hanno mostrato cambiamenti significativi nel TL dei leucociti. Gli autori hanno ipotizzato che la dinamica dell'effettivo impatto dell'esercizio sui telomeri dipendesse da diversi fattori basali dei partecipanti, come l'indice di massa corporea (BMI) o le abitudini nutrizionali. In un altro studio RCT su una popolazione più ampia di 439 donne in sovrappeso in post-menopausa, non sono stati trovati cambiamenti significativi nel TL dopo dodici mesi di esercizio aerobico rispetto ai controlli sedentari. In contrasto, alcuni degli studi RCT selezionati hanno mostrato un aumento del TL o dell'attività telomerasica con l'esercizio. Una possibile spiegazione per questa discrepanza potrebbe essere attribuita alla durata dell'esercizio da sei a dodici mesi circa, il che potrebbe essere anche un breve lasso di tempo per provocare qualsiasi cambiamento significativo a lungo termine nel TL. Studi di coorte su una popolazione di atleti potrebbero fornire alcune preziose informazioni in questo contesto, poiché possono essere considerati gli effetti di un regolare esercizio fisico e di un volume di allenamento elevato per un maggior periodo di tempo.

References	Subjects	Telomere analysis: cell type	Measurement method	Physical activity	Main findings
Mason et al. [53]	439 women, postmenopausal, overweight or obese (50–75 years) n = 105 diet n = 106 aerobic exercise n = 108 diet + aerobic exercise n = 79 sedentary	TL: Leukocytes	qPCR	Aerobic PA at 225 min/week (5 sessions/week, 45 min/session) for 12 months; intensity of training reached at 70–85% of HR <sub>max</sub> , moderate to vigorous exercise	No significant difference in TL detected in any of the intervention group versus sedentary controls
Sjögren et al. [118]	n = 49 men and women randomly selected from previous RCT on PA intervention versus sedentary lifestyle (68 years, 14 men)	TL: Whole blood	qPCR	PA of moderate- and low-intensity with pedometer tracking steps at 210 min/week exercise (30 min/d) for 6 months	↑ Significant association of increased TL with reduced sedentary/sitting time; No significant difference in TL with steps per day or increased exercise duration
Tosevska et al. [87]	105 men and women, elderly, sedentary lifestyle n = 23–30 RT exercise (82 ± 6 years) n = 21–23 RT exercise + protein supplement (81 ± 8 years) n = 20–26 sedentary group with cognitive training (84 ± 5 years)	TL: Whole blood	qPCR	RT at 2 sessions/week (elastic bands, chairs, body weight exercises), with 1 set of 15 repetitions for 4 weeks then progressive; increase of 2 sets light exercises to 2 sets heavy exercises, for 6 months	No significant difference in TL in any of the groups
Friedenreich et al. [52]	212 women, postmenopausal, healthy, physically inactive n = 99 exercise (60.4 years) n = 113 sedentary (60.0 years)	TL: Leukocytes	qPCR	Aerobic PA at 225 min/week (5 sessions/week, 45 min/session) for 12 months; intensity of training reached at 70–80% of HR reserve	Increase in TL in the exercise group but not statistically significant due to inadequate sample size at follow-up
Puterman et al. [55]	68 men and women, caregivers n = 34 exercise (59.3 ± 5.7 years, 4 men) n = 34 sedentary (63.3 ± 6.4 years, 9 men)	TL: Leukocytes Telomerase: PBMC	TL: qPCR Telomerase: ddPCR	Aerobic PA at 60 min/week of lower moderate intensity 40% of HR reserve for 9 weeks; then 120–150 min/week of upper moderate intensity for 15 weeks	↑ Significant increase in rTL in the exercise group versus sedentary controls No significant difference in telomerase activity between groups
Eigendorfer et al. [97]	291 women, sedentary lifestyle n = 146 ET exercise (53 ± 5 years) n = 145 sedentary (53 ± 5 years)	TL: PBMC	qPCR	ET at 210 min/week (> 3 sessions/week) for 6 months; intensity of training reached at individualized HR	↑ Significant increase in TL in the ET exercise group versus sedentary controls No effect on TL with aerobic exercise; only subjects of lowest aerobic fitness showed significant increase in TL
Werner et al. [57]	124 men and women, healthy, sedentary lifestyle n = 34 RT (48.1 ± 7.5 years, 14 men) n = 29 IT (48.4 ± 6.5 years, 10 men) n = 26 AET (49.5 ± 7.0 years, 9 men) n = 35 sedentary (50.2 ± 7.4 years, 12 men)	TL: MNCs, Leukocytes Telomerase: MNC	FACS, FISH, qPCR	PA training at 135 min/week (3 sessions/week, 45 min/session) for 6 months IT: 4 × 4 method, high-intensity AET: intensity at 60% heart rate RT: 8 machine-based exercises, 20 repetitions/TL and Telomerase; at 0 and 6 months	↑ Significant increase in rTL and telomerase activity with AET after 6 months ↑ Significant increase in rTL with IT after 6 months No significant increase in TL or telomerase activity within RT or sedentary group after 6 months
Hooshmand et al. [58]	30 men, elderly, healthy, any level of regular physical activity n = 15 RT exercise (66.33 ± 3.35 years) n = 15 sedentary (66.13 ± 3.04 years)	Telomerase: Blood serum	ELISA	RT at 3 sessions/week (15 repetitions/exercise) for 12 weeks; intensity reached at 60% with 30-s of rest, starting at 60% of repetition maximum with 5% increment in repetitions	↑ Significant increase in telomerase activity in the RT exercise group versus sedentary controls

**Tabella 3.** (da Gardner et al. 2019)

### ***Studi interventistici***

Come mostrato nella Tabella 4, molti studi interventistici di coorte che hanno effettuato studi sui telomeri negli atleti ad alte prestazioni descrivono un'associazione positiva del TL con una regolare ed estesa attività fisica. Tuttavia, uno studio riporta un TL significativamente più corta dell'8,1% nei giovani nuotatori d'élite rispetto ai loro coetanei attivi a livello ricreativo, con un maggior accorciamento dei telomeri osservato tra le atlete. Questi risultati contrastanti potrebbero essere attribuiti a differenze per quanto riguarda l'intensità dell'esercizio, il volume di allenamento eccessivo o persino nel tipo di attività sportiva stessa. Inoltre, il genere dell'atleta sembra avere un impatto su queste variabili. In effetti, alcuni studi suggeriscono variazioni genere-specifiche nella dinamica dei telomeri, e che queste differenze sembrano avere un impatto sugli effetti indotti dall'esercizio sul TL. Da segnalare che lo studio ha coinvolto una coorte abbastanza giovane di atleti (età media 20 anni); quindi, non è chiaro se questi risultati possano essere estrapolati alla popolazione adulta e anziana. Inoltre, il TL è relativamente stabile fino alla giovane età adulta e il logoramento dei telomeri si verifica prevalentemente in età avanzata. Molteplici fattori come età, BMI, genere, volume di allenamento, modalità di allenamento, durata dell'attività fisica e metodo di analisi del TL possono tutti influenzare la misurazione dei telomeri.

References	Subjects	Cell type	Measurement method	Exercise intervention	Main results
Laye et al. [107]	8 men and 1 woman, endurance athletes (44 ± 2 years, 7 male)	Tl, Telomerase (hTERT, hTERC) and shelterin complex proteins (eg. TRF2); PBMC and skeletal muscle	qPCR	Endurance athletes: completed ≥ 1 ultra-marathon of ≥ 60 km PA: daily marathon distances, total 183 miles over 7 days TL & telomerase: blood samples and muscle biopsy pre- (2 wks before) and post- (22-24 h after) competition	No significant difference in TL or telomerase activity with ultra-endurance PA (telomerase activity not detectable in skeletal muscle) Significant increase in mRNA expression of shelterin complex proteins in PBMCs Higher TRF2 found in skeletal muscle versus PBMCs
Borghini et al. [47]	62 men and women n=20 endurance athletes (45.4 ± 9.2 years) n=42 sedentary controls (45.9 ± 9.5 years)	Tl; Saliva	qPCR	Endurance athletes: history of 59.4 km/week ultra-trail running for 13.15 years, ages grouped into tertiles PA: 330 km trail with incline of 24,000 m, duration of < 150 h TL: samples at baseline (1-2 d before race), intermediate point (148 km), and race completion (< 1 h) Controls: healthy, inactive, no competitive sports history	↓ Significantly reduced rTL in group of endurance athletes with PA (at intermediate point and at race completion) versus baseline ↑ Significantly longer TL in endurance athlete group (pre-PA) versus controls largest difference of TL in older (≥ 53 years) group (pre-PA) versus age-matched controls
Dilman et al. [131]	10 men, healthy, moderately active (20 ± 0.6 years) n=5 low-intensity group n=5 high-intensity group	TERRA, Skeletal muscle	qRT-PCR	PA: 45 min cycling, with target of 50% VO <sub>2</sub> peak (low-intensity) and 75% VO <sub>2</sub> peak (high-intensity) of endurance exercise TERRA: biopsies before, immediately after, and 2.5 h after PA	↑ Significant increase of TERRA levels immediately after and 2.5 h after PA versus before PA, for in both high- and low-intensity groups
Cluckey et al. [127]	19 men and women, healthy n=11 young group (22 ± 2 years) n=8 older group (60 ± 2 years)	Telomerase (hTERT and TRF2); PBMC	qRT-PCR	PA: 30 min cycling, varied workloads, with target of 30% VO <sub>2</sub> max (high-intensity) TL: blood samples pre-PA, and at 30, 60, and 90 min post-PA	↑ Significant increase in relative hTERT levels with high-intensity PA versus pre-PA (greater increase in young group) Highest post-PA hTERT levels at 60 min for the older group and at 90-min for younger group ↑ Significantly greater increase in hTERT and TRF2 expression in men versus women, independent of age
Gagnon et al. [98]	25 men and women n=15 expedition group (23.5 ± 7.4 years) n=10 controls (31.1 ± 10.8 years)	Tl; Leukocytes	qPCR	PA: 260 km canoeing expedition (6-9 h/d) low to moderate intensity, for 14 days TL: blood pre- (24 h before) and post- (3 h after) expedition	No significant change in TL between the expedition and control groups

References	Subjects	Cell type	Measurement method	Exercise intervention	Main results
Denham et al. [167]	34 men, healthy (31 ± 10 years)	Tl: sperm	qPCR	Cardiopulmonary exercise test to exhaustion Intervention: 3 sessions/week of sprint intervals for 6 wks, vigorous intensity; conducted by a subset (n = 10) Tl: sperm donation before the test (n = 34); post-PA intervention (n = 10)	No significant correlations between Tl, fitness or exercise performance Positive correlation between Tl and improvements in cardiorespiratory fitness after intervention
Brandao et al. [56]	20 women, premenopausal, obese (20–40 years)	Tl: Leukocytes	qPCR	PA: 165 min/week (55 min/session, with 3 sessions/week) for 8 wks PA intensity: 75–90% HR <sub>max</sub> and increasing multiple HI Tl: blood samples pre- and post-PA intervention	↑ Significant increase in rTL with post-PA versus pre-PA ↑ Significant inverse correlation between Tl and waist circumference post-PA versus pre-PA
Hernando et al. [123]	149 men and women, healthy, non-smoking (19–67 years) n = 96 ultra-trail runners n = 53 sedentary controls	Tl: Blood: SOD2, r4480; Saliva	qPCR	Endurance athletes: history of ≥ 1 ultra-marathon of ≥ 50 km PA: 107 km ultra-trail race Tl: blood samples pre- (1 d before) and post- (1–2 d) competition	↑ Significantly longer Tl in older/elderly runners (≥ 40 years) versus age-matched controls Significant association of shorter rTL with SOD2 r4480 polymorphism No difference in rTL with previous race training

Tabella 4. (da Gardner et al, 2019)

### ***Studi osservazionali***

Tra i 27 studi osservazionali selezionati (Tabella 5), diversi studi trasversali evidenziano una correlazione positiva tra esercizio e biologia dei telomeri. Åstrom et al. hanno utilizzato la Helsinki Birth Cohort per indagare sulla correlazione tra prestazioni fisiche e TL negli anziani con un'età media di 61 anni. Le prestazioni fisiche sono state valutate utilizzando il Senior Fitness Test all'inizio dello studio e a circa dieci anni di follow-up. Prestazioni fisiche inferiori, nelle donne, erano correlate con un accorciamento telomerico statisticamente significativo dopo dieci anni. Parecchie altre indagini trasversali hanno mostrato effetti simili, statisticamente significativi, dell'esercizio fisico sulla dinamica dei telomeri. Sebbene i risultati degli studi trasversali sembrano promettenti, tali studi epidemiologici sono limitati dalle caratteristiche nella loro progettazione (es. autovalutazione dell'attività fisica tramite questionario).

Inoltre, valutare i cambiamenti del TL dovuti all'attività fisica attraverso uno studio trasversale è limitante dalle misurazioni condotte in un unico momento. Così, al fine di valutare se l'esercizio fisico contrasti il logoramento dei telomeri dovuto all'età, è richiesto un migliore consenso tra studi osservazionali e/o studi prospettici con prove di qualità superiore per dimostrare la causalità.

References	Subjects	Telomere analysis: cell type	Measurement method	Physical activity	Main findings
Du et al. [76]	7813 women (43–70 years) from Nurses' Health Study (1988 to 1992)	T1: Leukocytes	qPCR	PA: Moderate- or vigorous intensity; $\geq 3$ MET hrs/week Controls: sedentary lifestyle TL: blood collected in 1989 to 1990	↑ Significant increased TL in greater moderate and vigorous intensity activity group (calisthenics or aerobics) versus sedentary group
Savola et al. [77]	204 men (now 76 years) from Helsinki Businessmen Study (1974)	T1: Leukocytes	Southern blot	LTPA: mainly sedentary, low, moderate, and high LTPA, assessed at baseline and at 29 yr follow-up TL: blood samples from a random sub-cohort of survivors at follow-up in 2003	↑ Significantly longer TL in moderate LTPA group versus low- or high-PA groups Significantly lower proportion of short telomeres in the moderate PA group versus low or high PA group
Denham et al. [63]	123 men, healthy n=67 ultra-marathon runners (44 ± 9 years) n=56 inactive (43 ± 9 years)	T1: Leukocytes	qPCR	PA: Completion of 2-ultra marathons and average training distance of 40–100 km/week for a minimum of two years Controls: inactive, healthy	↑ Significantly longer TL in ultra-marathon runners versus age-adjusted controls, biological age difference of 16.2 years
Weischer et al. [50]	4576 men and women (20–100 years) from Copenhagen City Heart Study (1991 to 94)	T1: Leukocytes	qPCR	PA: $\geq 4$ h/week of exercise, inactivity $< 4$ h/week, and other lifestyle factors, at baseline in 2001–2004 (control) and at 10-yr follow-up TL: blood sampling in 1991 to 94 and at follow-up in 2001 to 03, TL grouped into quartiles	Significant association of shorter TL with physical inactivity (and with several other lifestyle factors) at baseline and at 10-yr follow-up No significant association with TL change at baseline versus 10-yr follow-up
Laine et al. [120]	599 men (72 ± 6 years) n=392 former elite athletes (64 endurance, 221 mixed sport, and 107 power sport athletes) n=207 controls	T1: Leukocytes	qPCR	LTPA assessed for each former elite athlete group over past 3 months, MET-h/week calculated Controls: PA not described	No significant difference in TL between each former elite athlete group and controls No significant differences in TL amongst the different former elite athlete groups
Loprinzi et al. [80]	6503 men and women (20–84 years) from NHANES (1999 to 2002)	T1: Leukocytes	qPCR	4 types of PA: moderate, vigorous intensity, transportation PA, and muscle-strengthening, for 30 days MBB index: total number of participated PA types (0 to 4) TL: from blood collected in 2001 to 2003, TL grouped into tertiles	↑ Significant association of longer TL in higher tertile TL group with higher MBB index Dose-response relation between MBB and TL
Sallinen et al. [70]	814 men and women (61–82 years) from Berlin Aging Study II (n=452 current PA, n=223 currently inactive)	T1: Leukocytes	qPCR	Current PA: intensive PA, RT, endurance, or other type of sport, with $< 10$ years physical inactivity Controls: currently inactive, with $\geq 10$ years physical inactivity	No dose-response relation between TL and muscle-strengthening ↑ Significantly longer TL with current PA versus currently inactive group ↑ Significantly longer TL with endurance PA and intensive PA group ↑ Significantly longer TL with group of PA $\geq 10$ years versus inactive group
Latifovic et al. [71]	477 men and women (20–50 years)	T1: Leukocytes	qPCR	Total amount of PA assessed by IPAQ, grouped into quartiles TL: blood collected from in 2006 to 2008	↑ Significantly longer TL in highest quartile group versus lowest quartile group with vigorous activity



References	Subjects	Telomere analysis: cell type	Measurement method	Physical activity	Main findings
Loprinzi et al. [82]	6474 men and women (64 ± 0.31 years) from NHANES (1999 to 2002)	TL: Leukocytes	qPCR	9 types of MVPA ≥ 2000 MVPA MET-min-month, for 30 days (basketball, bicycling, dance, running, stair climbing, swimming, walking, weight lifting) TL: from blood collected in 2001 to 2003	↑ Significant association of longer TL only with running
Sillanpää et al. [81]	386 women, twins, elderly (63–76 years) from the Finnish Twin Study on Aging (FITSA) n = 186 monozygotic twins n = 200 dizygotic twins	TL: Leukocytes	qPCR	PA level: modified Grimby scale (from inactivity to competitive sports weekly) at baseline, 3- and 11-yr follow-up Fitness: maximum distance walked in 6 min, at baseline and at 3-yr follow-up (data missing at 11-yr follow-up) TL: blood collected from 2000 to 2001	↑ Significantly longer TL, with higher PA level (and not distance walked) at 3-yr follow-up versus baseline
Denham et al. [59]	122 men and women, healthy (18–55 years) n = 61 endurance athletes in cycling, triathlon, or middle-/long-distance n = 61 controls	TL: Leukocytes	qPCR	Endurance athletes: competition at national/international level PA: at least 3 trainings/week, for ≥ 1 yr Controls: recreationally active	↑ Significantly longer TL in endurance athletes (7.1%) and higher TERT expression (twofold) versus age-adjusted controls Resting heart rate was an independent predictor for TL
Denham et al. [40]	84 men and women, healthy (18–55 years) n = 44 endurance athletes (2 ± 10 years) in cycling, triathlon, or middle-/long-distance n = 40 controls (30 ± 10 years)	TL: PBMC, Leukocytes	qPCR	Endurance athletes: competition at national/international level PA: at least 3 trainings/week, for ≥ 1 yr Controls: recreationally active	↑ Significantly longer TL in endurance athletes versus age-adjusted controls, biological age difference of 10.4 years
Dankel et al. [72]	4881 men and women (36–85 years) from NHANES study (1999 to 2002) and WATCH paradigm, placed into 6 groups (active or inactive; normal weight or overweight/obese; and normal weight or overweight/obese 10 years ago)	TL: Leukocytes	qPCR	PA: Sports-, exercise-, and recreational-related activities, ≥ 2000 MVPA MET-min-month over past 30 days Control: active, normal weight TL: blood collected from 1989 to 1990	↑ Significant increased odds of longer TL with physical activity in all groups except if overweight/obese for ≥ 10 years versus multi-variate adjusted controls (age, gender, race/ethnicity, CRP, and change in physical activity level) ↑ Significantly increased odds of shorter TL with inactivity in all groups
Edwards et al. [73]	1268 men and women (20–49 years) from NHANES (1999 to 2002)	TL: Leukocytes	qPCR	PA: ≥ 1835 MVPA MET-min-month for 30 days CRF: VO <sub>2</sub> max of ≥ 39 mL/kg/min Sedentary behaviour: ≥ 2 h/day of sitting for 30 days TL: blood collected from 2001 to 2003	↑ Significant association of longest TL with greater physical activity, higher cardiorespiratory fitness and less sedentary behavior Only MVPA was independently associated with longer TL

References	Subjects	Telomere analysis: cell type	Measurement method	Physical activity	Main findings
Ogawa et al. [59]	6,933 men and women (20–84 years) from NHANES (1999 to 2002)	Tl: Leukocytes	qPCR	3 groups of moderate PA: < 150 min/week, 150–300 min/week, and ≥ 300 min/week for ≥ 150 min/week moderate to vigorous PA for 30 days (household/yard work, transportation PA, moderate and vigorous LTPA) Tl: from blood collected in 2001 to 2003	↑ Significant association of longer TL with increment of 1 h/week of moderate PA, vigorous LTPA, or household/yard work ↑ Significant association of longer TL with moderate PA ≥ 300 min/week
Shadyab et al. [74]	1,476 African American and white women, postmenopausal (50–79 years) from Women's Health Initiative Study (2012–13) with follow-up in the Long Life Study (2012 to 2013)	Tl: Leukocytes	Southern blot	PA: total amount; light, MWPA hr/week calculated via hip-worn accelerometer ≥ 10 h/day for 7 days Tl: blood collected from 2012 to 2013	↑ Significantly longer TL with ≥ 2.5 h/week MWPA group versus < 2.5 h/week MWPA group
Shadyab et al. [79]	1,476 African American and white women, postmenopausal (50–79 years) from the Women's Health Initiative Study (1974 to 1978) with follow-up in the Long Life Study (2012 to 2013)	Tl: Leukocytes	Southern blot	TPA: light, moderate, vigorous, with MET-h/week calculated based on total PA Tl: blood collected from 2012 to 2013	↑ Significantly longer TL with higher MET-h/week of LTPA ↑ Significantly longer TL in ≥ 17 MET-h/week group versus < 1.25 MET-h/week group Significant linear association of moderate to vigorous PA with TL; no association between light PA and TL Associations of TL with PA did not vary by race/ethnicity
Fretts et al. [75]	2,312 American Indians (40 ± 16 years) from Strong Heart Family Study (2001 to 2003)	Tl: Leukocytes	qPCR	PA: Steps/day via pedometer, with ≥ 3 days of recorded steps, grouped into quartiles Control: lowest quartile of measured steps/day Tl: blood collected from 2001 to 2003	↑ Significant correlation between longer TL and greater number steps/day in all 3 upper quartile groups versus control group
Colon et al. [60]	14 men, healthy n = 7 competitive triathletes (35.11 ± 5.66 years) n = 7 recreationally active controls (34.14 ± 10.29 years)	Tl: Whole blood	qPCR	Competitive triathletes: competition at the national/international level Controls: recreationally active	↑ Significant association of longer TL in competitive triathletes versus controls
Aguilar et al. [61]	32 men, healthy n = 21 master athletes (51.62 ± 8.19 years) n = 11 recreationally active controls (45.41 ± 10.34 years)	Tl: Leukocytes	qPCR	Master athletes: competition at the national/international level (in 100 m to marathon distance events) Controls: recreationally active	↑ Significantly longer TL in master athletes versus controls

References	Subjects	Telomere analysis: cell type	Measurement method	Physical activity	Main findings
Sterbäck et al. [65]	700 men and woman (68.9±0.6 years) from City of Oulu Finland health survey follow-up (2013 to 2015)	TL: Whole blood	qPCR	PA: total steps calculated via wrist-worn accelerometer for 2 weeks, and questionnaire of PA intensity (light, moderate or vigorous), PA history (at 15, 30, 50, and current age), and sedentary time, grouped into quartiles TL: blood collected from 2013 to 2015	↑ Significant positive correlation of longer TL with higher volume of steps in men, not in women ↑ Significantly longer rTL in the highest quartile moderate PA exercise versus lower three quartiles Significantly longer rTL in women versus men at 69 but no differences at 68 and 70 years of age No association between current rTL and PA in earlier years (age of 15, 30, 50)
Aström et al. [78]	1,035 men (n=453) and women (n=582) elderly, healthy (61 years at baseline) from the Helsinki Birth Cohort Study (2001 to 2004)	TL: Leucocytes	qPCR	PA: SFT (strength, flexibility, and endurance) at baseline in 2001–2004 (control) and at 10-years follow-up TL: blood collected from 2001 to 2004 and from 2011 to 2013	↑ Significant association of longer TL with better physical performance in women at follow-up Shorter TL and greater TL attrition associated with poorer physical performance in women at follow-up
Rosa et al. [95]	60 men, healthy n=31 athletes (18 endurance 53±8 years, 13 sprinter 50±9 years) n=29 controls (12 middle-aged 45.5±10 years, 17 young 22.7±4 years)	TL: Serum ADMA	ELISA	Athletes: ≥20 years continuous training, current competition at national and international level in endurance (10,000 m to marathon) and sprint (60 m to 400 m) events Controls: inactive TL: control: blood sample from one young male	No difference in rTL between endurance athletes and sprinter athletes ↑ Significantly longer rTL in sprinter athletes versus middle-aged controls
Bastos et al. [66]	53 men, elderly, healthy (66–75 years) n=23 low physical fitness n=7 moderate physical fitness n=23 high physical fitness	TL: T-cells (CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , CD28 <sup>+</sup> )	MACS, FACS, Flow-FISH	PA: VO <sub>2</sub> max as per ACSM TL: control: 1301 (human T-cell leukemia) cell line	↑ Significant association of longer TL in CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> cells of the moderate physical fitness group versus cell-line control)
Hagman et al. [62]	140 healthy men n=35 young, elite football players (35±0.5 years) n=35 elderly, football players (72±0.5 years) n=35 young, untrained (35±0.6 years) n=35 elderly, untrained (70±0.7 years)	TL & Telomerase: MNC	FISH, qPCR, TRAP assay	PA of young footballers ≥2nd Division in Denmark, ≥4 football sessions/week, and ≥10 years of regular football training PA of elderly footballers >40 years of regular football training and still ≥1 football session/week Controls: no regular physical exercise for ≥1 yr or no history of participation in sports at a high level earlier in life	↑ Significant increase in TL in the elderly football players group versus elderly untrained control group ↑ Significant increase in telomerase activity and expression of telomerase-binding proteins in young football players versus young untrained controls

Reference s	Subjects	Telomere analysis: cell type	Measurement method	Physical activity	Main findings
Jantunen et al. [49]	1014 men and women, elderly (66–69 years) from Helsinki Birth Cohort Study (2001 to 2004)	Tl: Leukocytes	qPCR	LTPA assessed over past 12 months, MET-h/week calculated in 2001 to 2004 (baseline LTPA), grouped into quartiles Tl: baseline and 10 yr follow-up rTl: blood collected from 2001 to 2004 and at follow-up from 2011 to 2013	No significant association of TL (at baseline and at follow-up) with LTPA at baseline No significant association of rTL with LTPA at baseline for men Significant inverse relationship in change in rTL with amount of LTPA at baseline in women
Nickels et al. [48]	107 men and women (20 ±5 years) n= 51 swimmers (22 female, 29 male) n= 56 controls (29 female, 27 male)	Tl: Buccal cells	qPCR	Swimmers: competing at the national/international level Controls: recreationally active, with ≥ 150 min/week moderate PA or ≥ 75 min/week of vigorous PA	↓ Significantly shorter TL in female swimmers versus female controls No significant difference in TL between male swimmers and male controls No correlation in TL between swimming performance, weekly training distance or competing level with TL

**Tabella 5.** (da Gardner et al, 2019)

Dagli studi RTC, interventistici e osservazionali presi in considerazione non può essere né affermata né respinta una relazione causale dell'attività fisica sul TL.

Diversi aspetti riguardanti la modalità e il tipo di allenamento, l'intensità e la durata dell'attività fisica nelle dinamiche dei telomeri devono essere ulteriormente chiarite e sono di seguito discusse.

La modalità di allenamento sembra essere un fattore importante per quanto riguarda la sua influenza sulla dinamica dei telomeri. In uno studio RCT, è stato confrontato l'impatto di diverse modalità di esercizio (ad es. allenamento di resistenza o RT, allenamento di resistenza e allenamento a intervalli) sul TL e sull'attività della telomerasi. Allenamenti di resistenza e ad intervalli hanno aumentato il TL e l'attività della telomerasi; tuttavia, l'RT non ha registrato tali differenze.

Per quanto riguarda il tipo di esercizio, uno studio osservazionale ha dimostrato che dal confronto di diverse attività fisiche con vario dispendio metabolico (ad es. sollevamento pesi, pallacanestro, ciclismo, corsa) solo la corsa potrebbe essere positivamente correlata con la conservazione del TL. Questa associazione tra la conservazione del TL e la corsa potrebbe anche aiutare a spiegare gli effetti protettivi dell'esercizio aerobico sull'incidenza delle malattie cardiovascolari e mortalità per tutte le cause e che diverse malattie croniche sono associate al logoramento dei telomeri. Una possibile spiegazione per i risultati incoerenti dell'RT sul TL potrebbe essere che l'esercizio aerobico (che non è tipico nel RT classico) è legato a una media e a un massimo di frequenza cardiaca più alti, che porta a un maggiore sforzo vascolare. Dal momento che l'ossido nitrico (NO) sintasi e l'attività della telomerasi sono associati con una protezione vascolare indotta dall'esercizio, gli elevati livelli di NO rilasciati dalla parete vascolare potrebbero contribuire ad alterazioni nella dinamica dei telomeri.

Da notare che un più alto indice muscolo scheletrico appendicolare (ASMI) è correlato a telomeri più lunghi. Dal momento che l'RT mira ad aumentare la massa muscolare, è stato suggerito che la conservazione del muscolo scheletro aiuti a ritardare il logoramento dei telomeri e attenuare l'invecchiamento biologico.

Rispetto all'allenamento di resistenza, l'esercizio aerobico emerge come un intervento promettente per aiutare a mantenere o addirittura allungare il TL. In uno studio RCT, l'esercizio aerobico per sei mesi ha portato un TL significativamente più lunghi negli anziani che erano precedentemente inattivi e molto stressati rispetto ai controlli sedentari. Da notare che non è stato rilevato nessun aumento dell'attività della telomerasi, anche se un tale incremento dovrebbe aiutare a stabilizzare e potenzialmente allungare i telomeri. Un motivo per spiegare questo aumento del TL (in assenza di una maggiore attività della telomerasi) è che la coorte di studio era composta da soggetti cronicamente stressati e individui inattivi, e tali caratteristiche sono associate a livelli più elevati di stress ossidativo e infiammazione. Ridurre i livelli

di infiammazione e stress ossidativo con l'esercizio aerobico può provocare l'allungamento dei telomeri.

L'esercizio di resistenza era fortemente collegato a telomeri più lunghi in una popolazione di atleti in studio: i runner che percorrevano grandi distanze avevano i leucociti con telomeri dell'11% più lunghi rispetto ai loro coetanei, il che equivale a circa 16 anni di accorciamento dei telomeri correlato all'età.

Nel complesso, l'esercizio di resistenza è la modalità di allenamento più studiata ed è principalmente associata ad effetti positivi sulla biologia dei telomeri.

Uno studio osservazionale, che poneva in confronto velocisti master e runner di resistenza, ha rivelato un miglior profilo dei biomarcatori dell'invecchiamento nei velocisti, tra cui una tendenza ad avere un TL più lungo. Gli atleti di resistenza hanno avuto un miglior profilo di NO (ossido nitrico), che è considerato un marcatore della funzione endoteliale, mentre i velocisti possedevano un miglior bilanciamento redox e profilo delle citochine. In futuro gli studi dovrebbero chiarire se l'esecuzione stessa o l'intensità associata alla corsa influisce sulla dinamica dei telomeri.

L'intensità dell'allenamento è un fattore cruciale non solo nei programmi di allenamento ma anche nella regolazione della biologia dei telomeri e dell'invecchiamento. Tuttavia, gli studi selezionati presentano risultati incoerenti sul fatto che l'esercizio moderato o molto intenso abbiano un impatto benefico sulla dinamica dei telomeri. Du et al. hanno esaminato partecipanti iscritti in un grande studio "Nurses' Health Study" e hanno mostrato che un esercizio moderato (definito come un'esposizione energetica di 3 MET o più) è già sufficiente per preservare il TL dei leucociti nelle donne. Questi risultati sono in linea con i risultati di un altro studio.

Al contrario, un livello basso e alto di attività fisica era associato a telomeri più corti. Inoltre, un moderato livello di attività fisica probabilmente contrasta l'immunosenescenza dipendente dall'età e previene l'accorciamento dei telomeri in specifiche popolazioni di cellule T.

Questi risultati suggeriscono che sono possibili effetti positivi dell'esercizio fisico sul sistema immunitario in età adulta e che il livello di intensità dell'esercizio più vantaggioso in questo contesto è l'esercizio a intensità moderata.

In uno studio condotto su atleti di triathlon ad alto livello, è stato evidenziato che il TL era conservata meglio attraverso un allenamento ad alta intensità rispetto a un esercizio a intensità moderata. Come tale, tra i triatleti, il protocollo di allenamento applicato potrebbe non aver raggiunto l'intensità richiesta associata ad effetti protettivi per il TL come visto in altri studi che coinvolgono non atleti.

In un altro studio, gli atleti di ultrasostenibilità possedevano telomeri dell'11% più lunghi (un aumento approssimativo di 324-648 bp) rispetto ai controlli sani inattivi, che corrisponde a una differenza di 16,2 anni nell'età biologica. Recenti studi sottolineano anche l'importanza dell'intensità dell'esercizio sulla biologia dei telomeri, e sono in

linea con i risultati di uno studio che prendeva in esame i partecipanti ad una spedizione in canoa di più giorni (viaggio di sei ore al giorno per 2 settimane) ad intensità da bassa a moderata, dove il TL è rimasto invariato rispetto ai controlli di pari età; tuttavia, c'era però un significativo miglioramento dei profili metabolici e ossidativi. L'aumento dell'attività antiossidante enzimatica è stato paragonabile ai benefici del bilanciamento redox indotto da diversi mesi di esercizio fisico. Tuttavia, lo stimolo dato dall'esercizio potrebbe non essere stato sufficiente per influenzare il TL, poiché l'attività fisica era di intensità da bassa a moderata. In sintesi, gli studi selezionati appaiono contraddittori su quale intensità di esercizio abbia la maggiore influenza sulla dinamica dei telomeri. Inoltre, il livello di attività fisica (ad es. basso, moderato o alto/vigoroso) non è sempre chiaro o descritto dettagliatamente in termini di parametri (ad es. intensità, durata e frequenza) per consentire il confronto.

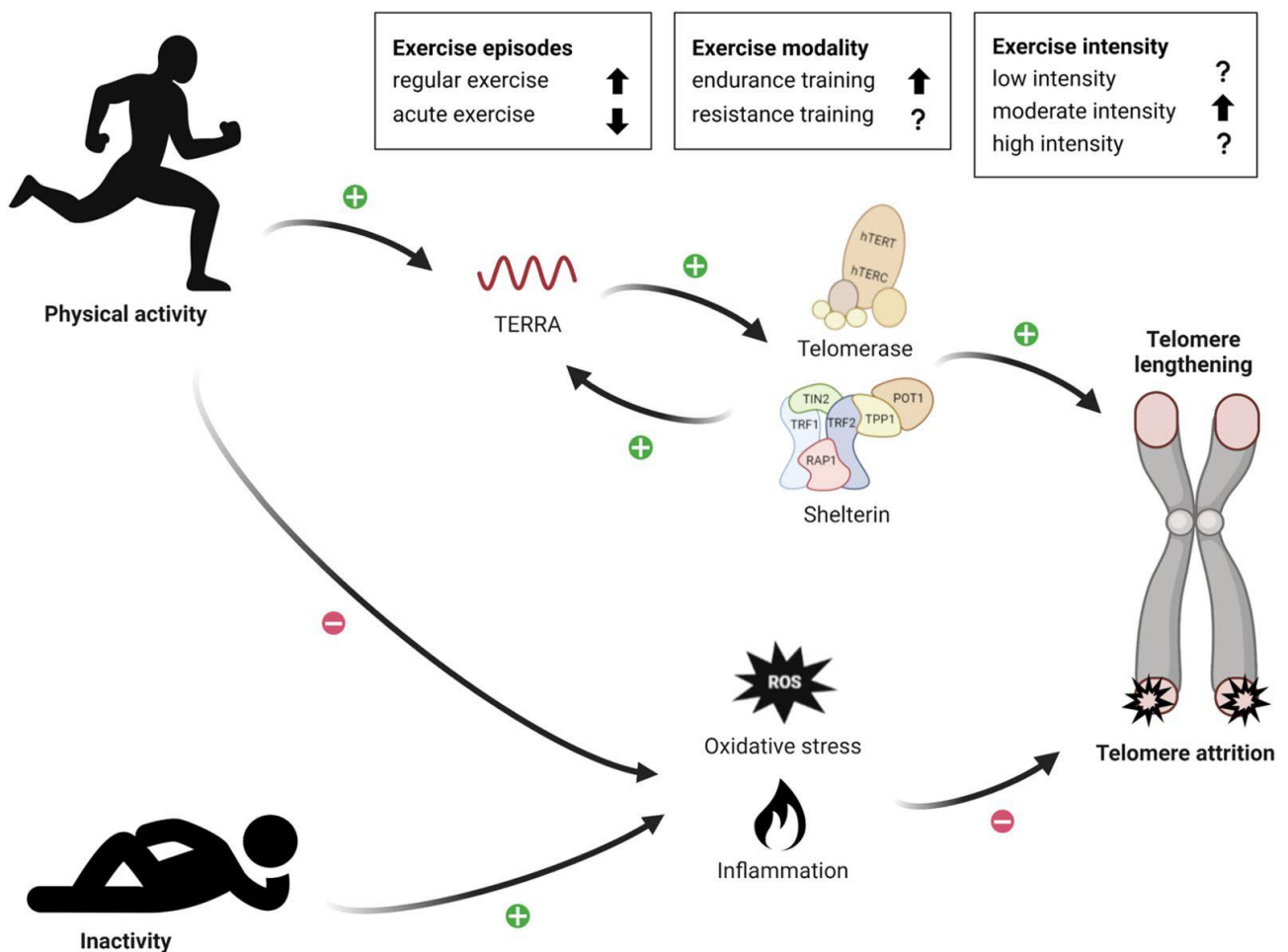


Figura 4. (da Gardner et al, 2019)

Precedenti ricerche suggeriscono che l'esposizione acuta a un intenso esercizio fisico induce un aumento dello stress ossidativo. Il danno al DNA da stress ossidativo è stato dimostrato verificarsi anche dopo poche ore di esposizione ad un esercizio aerobico ad alta intensità. Lo stress ossidativo è anche fortemente associato al logoramento

dei telomeri inibendo l'attività della telomerasi, come mostrato in Fig 4. Uno studio ha riportato una rTL significativamente ridotta negli atleti durante e dopo aver completato una gara di resistenza basata su una corsa ultralunga (330 km) a causa del danno ossidativo del DNA. Tuttavia, negli atleti il TL era conservata meglio rispetto a controlli sedentari; quindi, questi risultati implicano che un regolare esercizio di resistenza ha ancora effetti benefici sul TL rispetto all'inattività. I meccanismi antiossidanti potrebbero essere sufficienti per gestire un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) durante l'esercizio di resistenza regolare, dovuto all'adattamento nel tempo; tuttavia, tali meccanismi di regolazione dei ROS potrebbero essere sopraffatti da un aumento dello stress ossidativo dovuto ad un episodio acuto di esercizio ad alta intensità.

Da notare che il TL è stata analizzato nelle cellule mononucleate del sangue periferico o nelle biopsie del muscolo scheletrico. Come in precedenza citato, tale mancata variazione potrebbe essere imputata al livello di forma fisica, superiore alla media, degli atleti. Questi atleti ad alte prestazioni potrebbero essere meno affetti dai ROS, fatto che potrebbe essere correlato con un minor effetto dello stress ossidativo sulla biologia dei telomeri. Quindi, questi risultati potrebbero non tradursi nella normale popolazione formata da non atleti. Sebbene alcune prove suggeriscano che un periodo di allenamento acuto ha un effetto immediato e dannoso sul TL, l'esposizione prolungata all'esercizio di resistenza sembra attenuare il logoramento dei telomeri, contribuendo al loro mantenimento, o promuovendone anche l'allungamento tramite un minor effetto dei ROS.

L'inattività e il comportamento sedentario influenzano la biologia dei telomeri, con una forte associazione con esiti di salute peggiori e un rischio più elevato di malattie cardiovascolari. Soprattutto nei paesi occidentali, dove la partecipazione formale all'esercizio fisico è aumentata, uno stile di vita sedentario è diventato più diffuso. Oltre al rischio cardiovascolare, c'è anche un rischio elevato per altre malattie croniche associate a uno stile di vita sedentario (es. sindrome metabolica, diabete di tipo 2), indipendentemente dal tempo dedicato all'esercizio.

Il comportamento sedentario è anche legato alla riduzione della massa muscolare e bassa forza muscolare. Inoltre, l'attività sedentaria prolungata porta ad un aumento dell'infiammazione e livelli di stress ossidativo più elevati, contribuendo successivamente al logoramento dei telomeri. In uno studio RCT che coinvolgeva soggetti anziani, sedentari e in sovrappeso, è stato riportato un significativo allungamento dei telomeri riducendo il tempo di inattività. Un altro studio sottolinea inoltre l'importanza del movimento su base regolare; i partecipanti allo studio che accumulavano più passi al giorno avevano un TL significativamente più lungo. Questo studio trasversale è indubbiamente valido poiché misurava l'attività fisica dei partecipanti con un contapassi giornaliero invece che usare questionari auto-segnalanti.



Gli ex atleti sono associati con un profilo metabolico più sano e una minore prevalenza di sviluppare fattori di rischio cardiovascolare.

Avere una storia di attività fisica continuata è persino associato ad una maggiore longevità rispetto alla popolazione generale.

Nonostante l'esercizio di resistenza estrema sia associato a livelli elevati di stress ossidativo, il TL era meglio preservato negli atleti di ultra-resistenza rispetto ai loro coetanei inattivi, questo era particolarmente evidente negli atleti anziani che si erano allenati regolarmente per molti anni.

In confronto, non c'erano differenze significative tra i giovani atleti e i loro controlli inattivi della stessa età nella lunghezza dei telomeri, molto probabilmente a causa del minor numero di anni impegnati in una formazione regolare.

Impegnarsi nell'esercizio fisico regolare supporta il mantenimento dei telomeri negli anziani, indipendentemente dall'attività fisica nella prima età adulta. L'esercizio sembra avere un impatto più forte sulla conservazione del TL in età avanzata, dal momento che il logoramento del TL stesso si manifesta maggiormente in età avanzata, soprattutto dopo i 70 anni di età, in associazione ad una senescenza aggravata.

L'impatto dell'esercizio sul TL potrebbe dimostrare un effetto benefico più pronunciato nei soggetti da 44-45 anni in su, poiché diversi fattori che accelerano il logoramento dei telomeri sono anche associati all'invecchiamento. Uno di questi fattori influenzanti potrebbe essere il cambiamento nella composizione della massa corporea con una diminuzione della massa magra e un aumento di quella adiposa con l'età. L'esercizio fisico contribuisce sia al mantenimento della massa muscolare scheletrica che a ridurre il grasso corporeo. Poiché l'aumento della composizione di grasso corporeo è legata al logoramento dei telomeri, i benefici dell'esercizio fisico sono duplici. Questa scoperta è in linea con uno studio osservazionale che ha evidenziato una correlazione inversa tra grasso corporeo e TL in atleti master di mezza età rispetto a controlli di pari età non allenati.

Nell'ambito del progetto Genotype Tissue Expression (GTEx) sui tessuti post mortem, è stato dimostrato che la lunghezza dei telomeri è negativamente correlata con l'età nella maggior parte degli oltre 20 diversi tessuti esaminati. Questa associazione inversa del TL con l'età era maggiore tra i tessuti dell'aorta, dello stomaco, del sangue intero e del rene.

Tuttavia, il TL dei muscoli non era correlata né positivamente né negativamente con l'età. Inoltre, tra diversi campioni di tessuto dello stesso organo e dello stesso individuo, il TL può variare di un fattore di sei volte o più. Il sangue intero può essere un candidato attraente per l'analisi del TL, in base alla sua accessibilità e processabilità: tuttavia, è anche un tessuto che è incline a disturbi della biologia dei

telomeri (TBD) che sono caratterizzati da mutazioni funzionali nei geni che mantengono i telomeri con conseguente accorciamento degli stessi.

Quasi tutti gli studi selezionati hanno analizzato il TL utilizzando leucociti e/o sangue intero. Tuttavia, l'accorciamento dei telomeri e l'impatto dell'esercizio sulla dinamica dei telomeri potrebbero essere specifici del tipo di cellula. Inoltre, il TL varia tra i diversi tessuti somatici in proporzione alla loro attività replicativa. Pertanto, i risultati degli studi che analizzano il TL in un tipo cellulare non possono necessariamente essere generalizzati ad altri tipi di cellule.

Il muscolo scheletrico, per esempio, contiene principalmente mionuclei post-mitotici, il che suggerirebbe che il TL rimane relativamente costante e invariata; ciò è dovuto al piccolo numero di cellule in fase di replicazione e turnover nel corso della vita.

L' aumento dei livelli di stress ossidativo dovuto ai radicali liberi e/o una diminuzione degli antiossidanti sono presunte cause di logoramento telomerico e invecchiamento. Con un regolare esercizio fisico, i livelli di pro-ossidanti si riducono e i meccanismi di difesa antiossidante vengono potenziati, con un conseguente miglioramento dell'equilibrio ossidativo. Inoltre, l'innalzamento dell'assorbimento di ossigeno con l'esercizio intenso induce un aumento dei radicali superossido e di altri ROS, che porta a livelli elevati di stress ossidativo. Tuttavia, l'esercizio fisico su base regolare provoca adattamenti simili visti con allenamenti acuti mediante la sovraregolazione degli enzimi antiossidanti, migliorando così l'equilibrio redox.

Questi cambiamenti potrebbero ridurre ulteriormente il danno ossidativo al DNA e quindi diminuire l'accorciamento dei telomeri dipendente dall'età.

I risultati di Aguiar et al. sono in accordo con studi precedenti, dimostrando che gli atleti velocisti avevano un profilo ossidativo migliore e telomeri più lunghi rispetto ai loro controlli della stessa età. Inoltre, il grasso corporeo era inversamente correlato sia con la lunghezza dei telomeri che con i marcatori di stress ossidativo, evidenziando ulteriormente gli effetti negativi dell'adiposità nell'invecchiamento.

## 5. CAPITOLO 5

### 5.1 LUNGHEZZA DEI TELOMERI ED ESERCIZIO FISICO: FOCUS SUGLI ATLETI MASTER

Lo scopo della revisione sistematica e meta-analisi di Aguiar et al. (2021) era:

- 1) valutare se gli atleti master avessero telomeri più lunghi rispetto ai non atleti di pari età;
- 2) discutere i possibili meccanismi alla base della conservazione della lunghezza dei telomeri negli atleti master.

La ricerca bibliografica è stata eseguita in PubMed, Web of Science, Scopus e SPORTDiscus fino ad agosto 2020. Sono stati inclusi solo articoli originali pubblicati su riviste "peer-reviewed" che hanno confrontato la lunghezza dei telomeri tra atleti maestri e non atleti di pari età.

I criteri di inclusione del presente studio erano: (i) studi osservazionali, studi trasversali, longitudinali e caso-controllo che hanno confrontato la lunghezza dei telomeri in qualsiasi tipo di campione (muscolo; sangue; saliva; globuli bianchi da sangue periferico) tra atleti maestri di entrambi i sessi e un gruppo di controllo della stessa età; (ii) atleti master  $\geq 35$  anni di età, secondo le raccomandazioni del World Masters Athletics (WMA) e più di 5 anni di esperienza agonistica nello sport professionistico; (iii) master di alto livello ovvero atleti che gareggiano in eventi nazionali e internazionali. Undici studi sono stati inclusi nell'analisi finale.

Complessivamente, sono stati analizzati: 240 atleti maestri ( $51,9 \pm 7,5$  anni) e 209 non atleti di pari età ( $50,1 \pm 9,1$  anni). Gli atleti master avevano partecipato a gare di alto livello per circa 16,6 anni, in media.

I punteggi di qualità e il rischio di bias sono disponibili nella Tabella 4. L'accordo tra i due ricercatori coinvolti nella ricerca è stato dell'89,9%. Il disaccordo è stato risolto in una riunione di consenso. I punteggi della valutazione della qualità variavano da 1 (qualità più bassa) a 10 (qualità più alta) (punteggio medio  $7 \pm 3$ ).

L'articolo 6 ha presentato il rapporto di punteggio più basso con solo il 9,1% del punteggio "sì". Gli Articoli 5 e 8 avevano un punteggio del 100%, mentre gli articoli 1, 2, 3, 4, 7 e 9 hanno ottenuto rispettivamente punteggi del 90,9%, 81,8%, 90,9%, 72,7%, 72,7% e 45,5%.

Quattro studi sono stati classificati come a rischio moderato di bias, e sette studi sono stati classificati come a basso rischio. Un solo studio ha descritto le caratteristiche dei pazienti persi al follow-up e/o all'analisi (articolo 6)

e cinque studi hanno riportato una potenza sufficiente per rilevare un effetto clinicamente importante dove il valore della probabilità per una differenza dovuta al caso era inferiore al 5% (articolo 9).

**Tabella 4.** (da Aguiar et al, 2021)

Study	Questions									Score ratio (%)	Risk of bias <sup>a</sup>
	1. Clear objective	2. Measure description	3. Sample description	4. Telomere assessment	5. Main findings	6. Sample loss	7. Probability values	8. Statistical tests	9. Statistical power		
Werner et al. [28]	0	1	1	1	1	0	1	1	0	66.7	Moderate
LaRocca et al. [20]	1	1	0	0	1	0	0	1	1	55.6	Moderate
Rae et al. [17]	1	1	1	1	1	1	1	1	0	88.9	Low
Østhus et al. [18]	1	1	1	1	1	0	1	1	0	77.8	Low
Denhan et al. [21]	1	1	1	0	1	0	1	1	1	77.8	Low
Mathur et al. [25]	1	0	1	0	1	0	1	1	0	55.6	Moderate
Borghini et al. [19]	1	0	1	1	1	0	1	1	1	77.8	Low
Simões et al. [33]	1	1	1	1	1	0	1	1	0	77.8	Low
Aguiar et al. [22]	1	1	1	1	1	0	0	1	0	66.7	Moderate
Sousa et al. [34]	1	1	1	1	1	0	0	1	1	77.8	Low
Rosa et al. [32]	1	1	1	1	1	0	1	1	1	88.9	Low
Score ratio (%)	90.9	81.8	90.9	72.7	100	9.1	72.7	100	45.5		

<sup>a</sup> To aid in interpretation, we classified study quality and risk of bias based on the proportion of criteria met: <50%—low quality, high risk of bias; 50–75%—fair quality, moderate risk of bias; 76–100%—high quality, low risk of bias.

Gli atleti master sono persone di età superiore ai 35 anni (nella maggior parte degli sport), che partecipano regolarmente a eventi competitivi e generalmente aderiscono ad abitudini di vita sane per preservare il loro livello competitivo, tra cui: gestione dello stress, dieta sana e una continua, programmata e controllata attività fisica. Tali abitudini, negli atleti master, si traducono in un profilo metabolico più favorevole, in un maggior assorbimento di ossigeno e una migliore forma fisica rispetto alle controparti di pari età. In quanto tali, gli atleti master sono stati riconosciuti come un modello di invecchiamento di successo.

Questa stretta relazione tra lo stile di vita e gli aspetti biologici favorevoli degli atleti master è stata associata in molti studi a telomeri più lunghi negli atleti master rispetto ai non atleti della stessa età e alcuni riportano anche una lunghezza dei telomeri simile a quella rilevata nei giovani, ma questa non è un'osservazione inequivocabile.

Una recente revisione sistematica e meta-analisi della letteratura hanno indicato che gli atleti d'élite avevano telomeri più lunghi rispetto al gruppo di controllo costituito

da soggetti sedentari. Tuttavia, gli autori non hanno fornito i possibili meccanismi sottostanti che potrebbero essere modulati dallo stile di vita degli atleti master per la protezione dei telomeri. Questa informazione è importante perché potrebbe servire come guida per raccomandazioni future negli individui anziani.

I risultati degli undici studi sono mostrati rispettivamente nella Figura 5, 6, 7, 8. Gli atleti master avevano telomeri più lunghi rispetto al gruppo di controllo della stessa età (SMD=0,89, IC 95%=0,45-1,33,  $p<0,001$ ,  $Z=3,96$ ,  $p<0,001$ ). C'era un 75% di eterogeneità ( $Q=44,50$ ,  $df\ 11$ ,  $p<0,001$ ,  $\tau^2=0,41$ ) nell'analisi aggregata. Il test di Egger (Egger et al., 1997) ha mostrato un'asimmetria oggettiva ( $p=0,137$ ).

La Figura 6 mostra l'analisi della lunghezza dei telomeri rispettivamente nel sangue, nelle cellule buccali e nel muscolo scheletrico. Gli atleti master avevano telomeri delle cellule del sangue e della bocca più lunghi rispetto al gruppo di controllo (SMD=0,99, IC 95%=0,50-1,49,  $p<0,001$ ,  $Z=3,93$ ,  $p<0,001$ ). C'era un 78% di eterogeneità ( $Q=40,38$ ,  $df\ 9$ ,  $p<0,001$ ,  $\tau^2=0,46$ ). Non sono state riscontrate differenze tra i gruppi per quanto riguarda i telomeri misurati nel muscolo scheletrico (SMD=0,43, IC 95%=-0,51 a 1,37,  $Z=0,90$ ,  $p=0,37$ ).

Inoltre, gli atleti master avevano valori più bassi dei parametri pro-ossidanti (SMD=0,59; IC 95%=0,26-0,91,  $p<0,001$ ;  $Z=3,48$ ,  $p<0,001$ ) (Fig. 7) e una maggiore difesa antiossidante (SMD=- 0,46; IC 95%=-0,89 to -0,03,  $p=0,04$ ,  $Z=2,10$ ,  $p=0,04$ ) rispetto ai non atleti di pari età (Fig. 8).

Non sono state eseguite analisi dei sottogruppi con un gruppo di controllo formato da giovani sedentari rispetto agli adulti di mezza età, dal momento che solo un piccolo numero di articoli includeva uno di questi. A causa del piccolo numero di articoli in cui venivano quantificate le citochine anti- e pro-infiammatorie (2 articoli) e l'espressione di Shelterin (1 articolo), non sono state eseguite analisi quantitative su questi parametri, ma sono stati usati per spiegare la loro potenziale influenza sulla lunghezza dei telomeri.

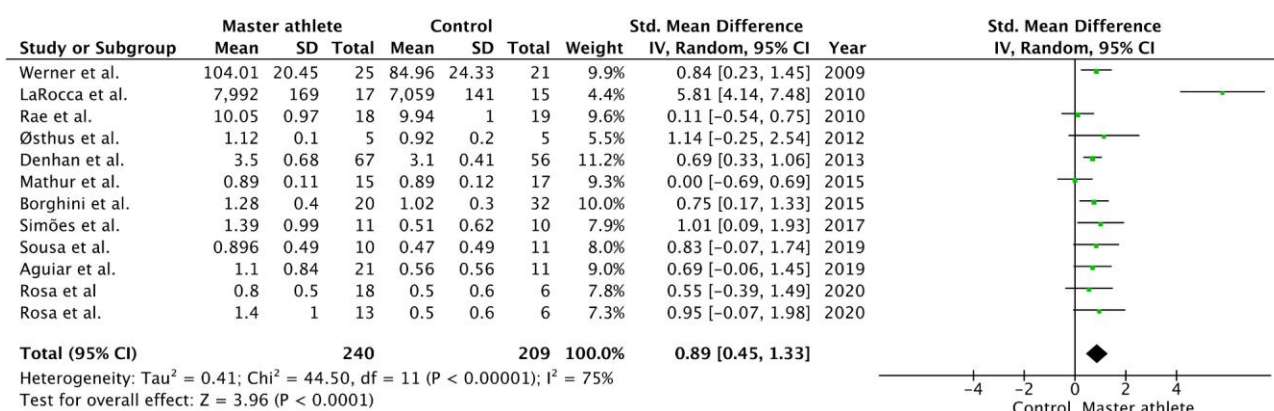


Figura 5. (da Aguiar et al, 2021)

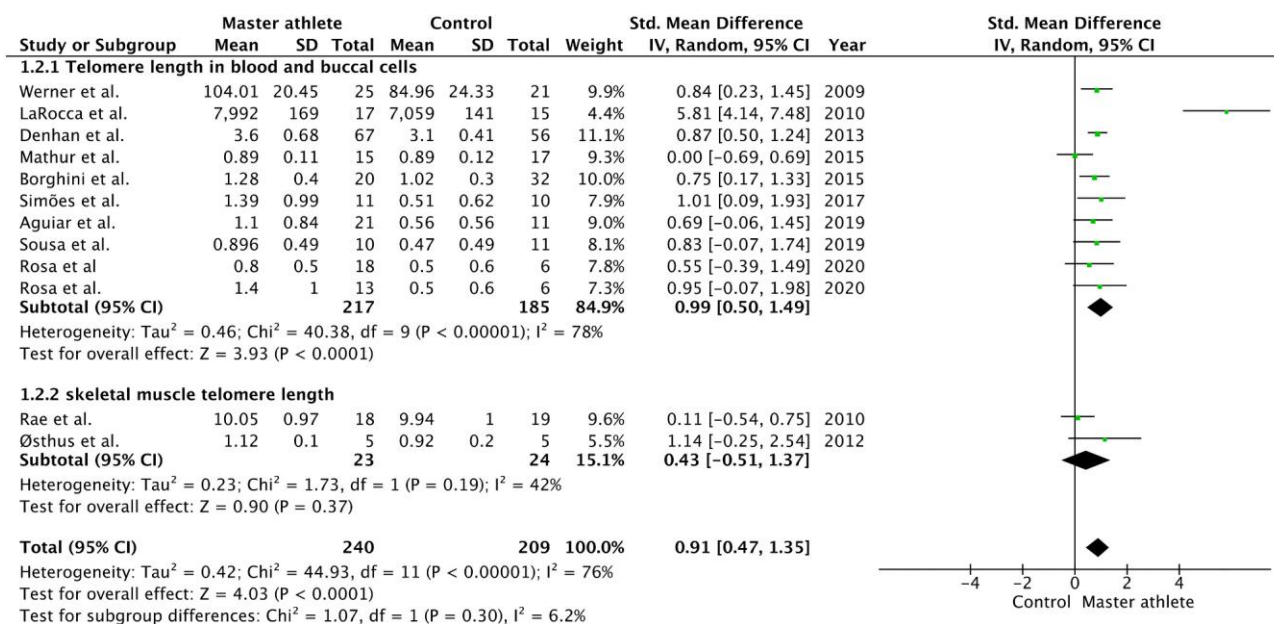


Figura 6. (da Aguiar et al, 2021)

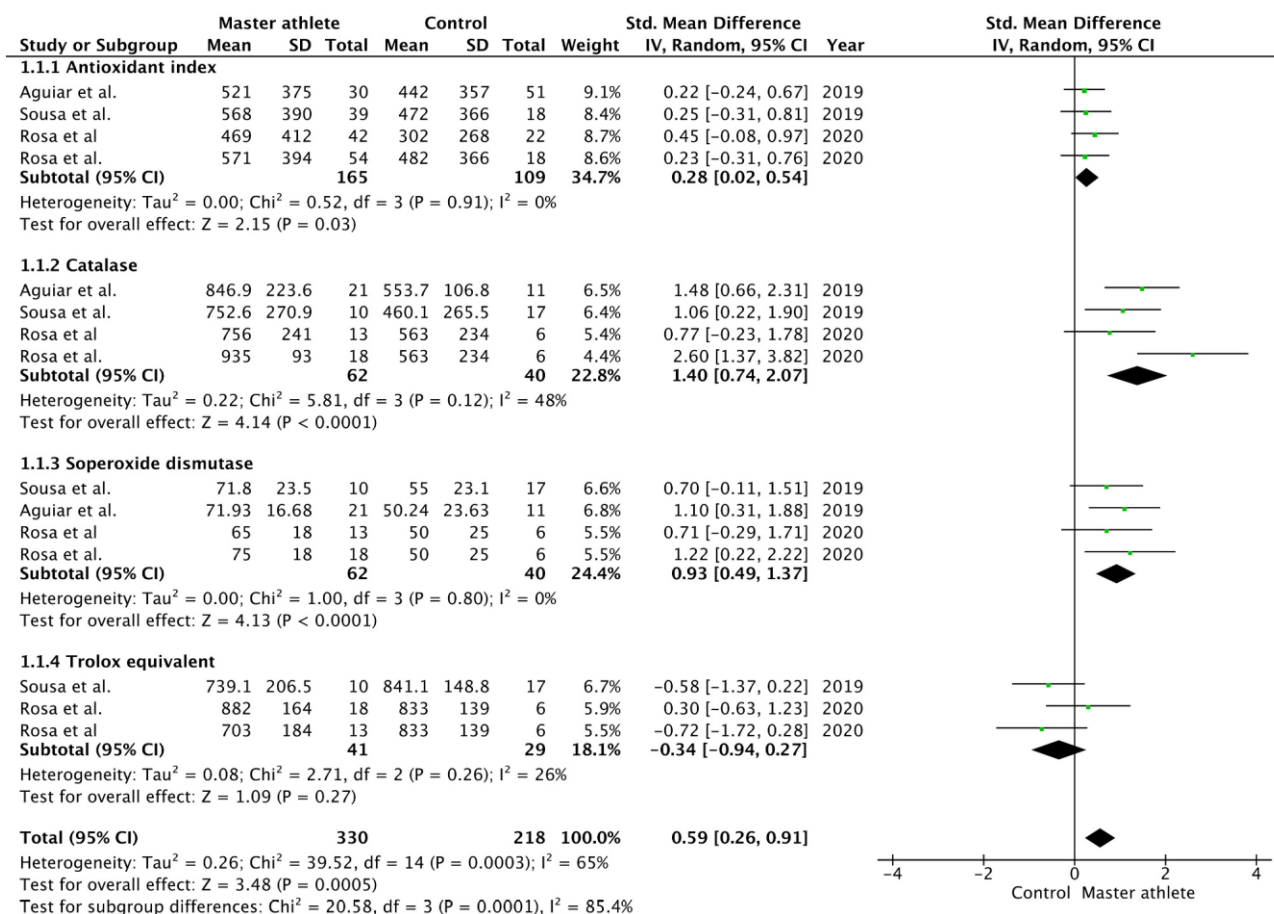
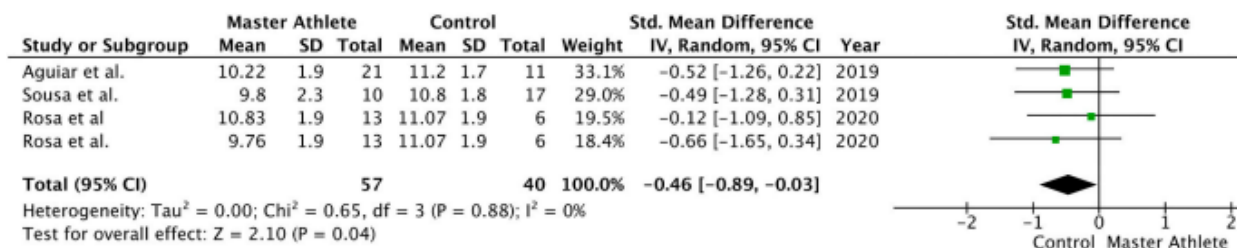


Figura 7. (da Aguiar et al, 2021)



**Figura 8.** (da Aguiar et al, 2021)

Nella meta-analisi degli 11 studi è emerso che gli atleti master (n=240) avevano telomeri più lunghi rispetto ai non atleti della stessa età (n=209). Quattro studi sono stati classificati come a rischio moderato di bias e sette studi sono stati classificati a basso rischio. Di seguito verrà sottolineato che minori livelli di stress ossidativo, di infiammazione cronica e una maggiore espressione del complesso "Sheltherin" proteggono i telomeri negli atleti master e possono contribuire alla presenza di telomeri più lunghi. Verrà ulteriormente discussa la lunghezza dei telomeri come marker dell'"età biologica" e il ruolo dell'attività fisica nel mantenimento della lunghezza dei telomeri e della salute.

Tre degli studi selezionati hanno trovato un'associazione tra i parametri dello stress ossidativo e la lunghezza dei telomeri negli atleti master. Uno è stato classificato a moderato rischio di bias e due a basso rischio di bias. Uno studio ha dimostrato che gli atleti master hanno telomeri più lunghi e livelli più bassi di TBARS (stress ossidativo) e difese antiossidanti più elevate, come si evince da una catalasi più elevata e un più elevato rapporto superossido dismutasi/TBARS (SOD/TBARS), rispetto a individui di pari età non allenati.

Allo stesso modo è riportato che i master maratoneti non solo hanno un migliore equilibrio ossidativo e telomeri più lunghi rispetto ai non atleti della stessa età, ma questi erano anche migliori rispetto a quelli dei giovani non allenati.

Queste osservazioni si applicavano ai master che praticavano corsa sia da velocisti sia da maratoneti (2020), ma gli atleti di resistenza (maratone) avevano livelli più bassi di Trolox equivalente, catalasi, F2-isoprostani e carbonili proteici e livelli più elevati di superossido dismutasi e NO<sub>2</sub> rispetto agli atleti velocisti. Lo stress ossidativo indotto dalle sessioni di allenamento può contribuire ad aumentare l'efficienza dei sistemi di difesa antiossidanti, portando a una maggiore capacità citosolica e mitocondriale di eliminare i radicali liberi e a una riduzione della produzione delle specie reattive dell'ossigeno ROS.

Pertanto, l'allenamento protratto per tutta la durata della vita sembra essere un punto chiave per migliorare il bilancio ossidativo degli atleti master, mitigando l'invecchiamento biologico e l'insorgenza di malattie croniche, fornendo una traiettoria di vita sana e funzionale.

Tre studi hanno valutato gli effetti dell'esercizio permanente sulle citochine pro-infiammatorie e sulla lunghezza dei telomeri negli atleti master. Uno è stato classificato a rischio moderato di bias e due a basso rischio di bias. Uno studio non ha riscontrato differenze nella lunghezza dei telomeri tra i maratoneti master e i controlli sedentari, ma i primi avevano livelli più bassi di proteina C reattiva (CRP). Durante il confronto della lunghezza dei telomeri e dei marker di rischio cardiovascolare (tra cui interleuchina-6 e CRP) tra i maratoneti master e i controlli di pari età, uno studio ha anche osservato livelli di proteina C reattiva più bassi ma, contrariamente a quanto trovato in altro studio, è stato verificato che gli atleti master avevano telomeri più lunghi.

Inoltre, un altro studio ha dimostrato che gli atleti master hanno telomeri più lunghi, livelli più bassi di citochine infiammatorie (sTNF-RI, IL-6, sIL6R) e livelli più elevati di citochine antinfiammatorie (IL-10, IL-10/TNF- $\alpha$  rapporto e IL-10/IL-6) rispetto ai controlli di mezza età. In questo studio, gli atleti di resistenza avevano livelli più elevati di sTNF-RI, IL-6 e IL-15 rispetto ai velocisti, mentre questi ultimi avevano livelli più elevati di IL-10, rapporto IL-10/TNF- $\alpha$  e rapporto IL-10/IL-6 rispetto agli atleti di resistenza. Queste osservazioni confermano un altro studio che ha riportato una correlazione negativa tra i marker di infiammazione cronica e la lunghezza dei telomeri e un'associazione positiva tra la lunghezza dei telomeri e il livello di prestazione degli atleti master.

Come i benefici dell'esercizio fisico per lo stato ossidativo, l'evidenza suggerisce inoltre che l'esercizio fisico è benefico per ridurre o attenuare lo stato infiammatorio in età avanzata. Gli effetti antinfiammatori dati dall'allenamento fisico a lungo termine possono essere mediati da un basso contenuto di grasso corporeo, riducendo il rilascio di citochine pro-infiammatorie dal tessuto adiposo, e contemporaneamente aumentando il rilascio di citochine antinfiammatorie attraverso le contrazioni del muscolo scheletrico. Questo può includere un (i) aumento della produzione e rilascio di interleuchina-10 (IL-10) e altre miocchine antinfiammatorie dal muscolo scheletrico; (ii) riduzione dell'espressione di recettori Toll-like (TLR) in monociti e macrofagi e di conseguenza inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie; (iii) inibizione dell'infiltrazione del tessuto adiposo da parte di monociti e macrofagi; (iv) riduzione del numero di monociti pro-infiammatori circolanti; (v) e aumento del numero di cellule T (Treg) regolatorie circolanti. In termini pratici, la letteratura indica che l'allenamento per tutta la vita degli atleti master ha un effetto benefico sull'equilibrio delle citochine pro e antinfiammatorie, e quindi attenua sia l'infiammazione che l'immunosenescenza e quindi il rischio di malattie croniche legate all'età.

L'enzima telomerasi aiuta a mantenere i telomeri aggiungendo sequenze TTAGGG all'estremità dei telomeri, utilizzando l'RNA come modello. Oltre alla telomerasi, un gruppo di proteine chiamate proteine Shelterin "di protezione" svolge un ruolo chiave nel mantenimento dei telomeri.

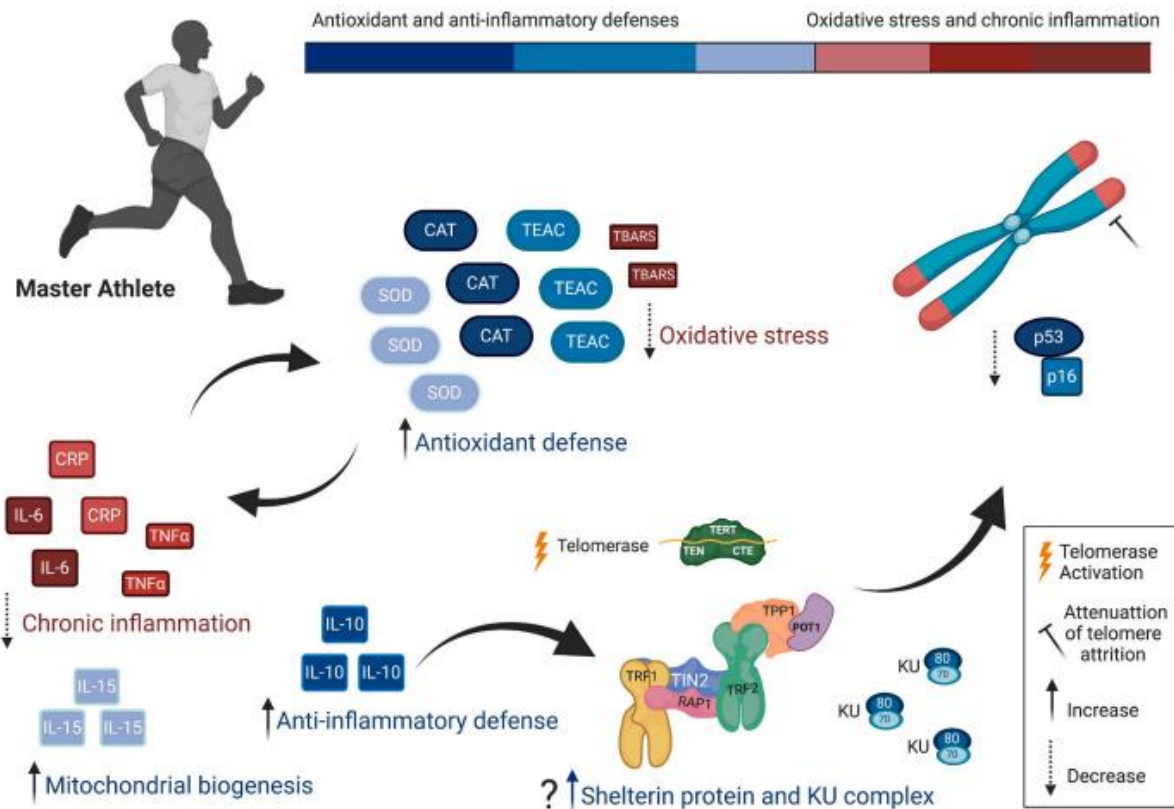


Il complesso Shelterin è composto da sei proteine: fattori correlati ai telomeri 1 (TRF1) e 2 (TRF2), proteina 2 che interagisce con TRF1 (TIN2), protezione dei telomeri 1 (Pot-1), proteina 1 repressore/attivatore della proteina che organizza Pot-1 e Tin2 (RAP1) e tripeptidil peptidasi 1 (TPP1). Queste proteine proteggono i terminali telomerici dall'innescare una risposta inappropriata al danno del DNA e si pensa che contribuiscano alla formazione di strutture a T-loop che proteggono la fine del telomero.

Un solo studio, classificato a rischio moderato di bias, ha studiato la lunghezza dei telomeri e le sue proteine regolatrici negli atleti master. Questi autori hanno valutato la lunghezza dei telomeri, la proteina TRF2, TRF2 mRNA, Chk2 mRNA, p53, p16, ku70, ku80 e attività della telomerasi in giovani sani, individui sani di mezza età, giovani atleti di resistenza e master di resistenza. Hanno riferito che gli atleti (giovani e anziani) avevano una lunghezza dei telomeri e un'espressione di p53 simili rispetto ai controlli (giovani e anziani-controllo), ma gli atleti giovani e anziani avevano un'espressione più elevata dell'mRNA di TRF2, una maggiore attività della telomerasi e una minore espressione dell'mRNA di Chk2 rispetto ai controlli.

Infine, gli atleti anziani hanno mostrato una regolazione negativa di p16 e una maggiore espressione di ku70 e 80 mRNA. Questi dati suggeriscono che una maggiore forma fisica ha effetti benefici sulle proteine del complesso Shelterin e sull'attività della telomerasi.

Sembra quindi che un'elevata forma fisica preservi efficacemente la lunghezza del telomero. Sebbene la letteratura attuale non fornisca prove sperimentali complete per stabilire tutti i meccanismi che stanno alla base della conservazione della lunghezza dei telomeri negli atleti master, ci sono diversi potenziali meccanismi: basso stress ossidativo (aumento delle difese antiossidanti), riduzione dell'infiammazione, una maggiore attività della telomerasi e delle proteine correlate all'integrità dei telomeri (Fig. 9).



**Figura 9.** (da Aguiar et al, 2021)

Come discusso in precedenza, un'elevata forma fisica è associata a un minor danno ossidativo probabilmente conseguente ad una maggiore attività degli enzimi antiossidanti. Per esempio, la maggiore attività della SOD dismuta il superossido ( $O_2^-$ ) nel meno nocivo perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). L' $H_2O_2$ , può essere neutralizzata in due modi: (i) attraverso la catalasi, formando  $H_2O$  e  $O_2$  e (ii) dal glutatione (GSH) che forma 2  $H_2O$ . Questo meccanismo è fondamentale per ridurre la formazione di perossinitrito ( $ONOO^-$ ) che a sua volta diminuirebbe la disponibilità di ossido nitrico ( $NO^-$ ). Oltre ad una migliore difesa contro le specie reattive dell'ossigeno, anche la produzione di ROS è meno presente negli atleti master rispetto ai non atleti di pari età.

Ad esempio, la reazione a cascata (principalmente tramite NF- $\kappa$ B e MCP-1) viene attenuata, diminuendo la produzione di diverse citochine pro-infiammatorie, come TNF- $\alpha$ , CRP, IL-1 $\beta$  e IL-6, che a sua volta riduce al minimo l'attivazione di specifici enzimi generatori di ROS e, quindi, interrompe il circolo vizioso tra la produzione di stress ossidativo e citochine pro-infiammatorie.

Inoltre, la storia di allenamento degli atleti master porta ad una maggiore espressione delle citochine antinfiammatorie IL-4, IL-15 che contribuisce alla produzione di IL-10, che gioca un ruolo chiave nell'inibizione delle risposte pro-infiammatorie delle cellule sia innate che adattive del sistema immunitario, migliorando la sopravvivenza, la proliferazione, la differenziazione e la produzione di anticorpi.

Come risultato del minor stress ossidativo e dell'infiammazione, l'enzima telomerasi subisce meno danni e una sovraregolazione. Ciò può essere ulteriormente migliorato da un regolare esercizio fisico attraverso un aumento dell'mRNA di TERT, TRF1, TRF2 e TPP1, preservando la lunghezza dei telomeri.

Inoltre, gli atleti master hanno una maggiore espressione di ku70/80 mRNA. Sebbene queste proteine non siano all'interno del complesso Shelterin, interagiscono con esso, aiutando a proteggere il DNA dai danni.

Poiché l'accorciamento dei telomeri causa la senescenza cellulare, è incoraggiante vedere che l'accorciamento attenuato dei telomeri correlato all'età negli atleti master è accompagnato da livelli più bassi di marcatori di senescenza cellulare e apoptosi, come p16, Chk2 e p53.

C'è quindi una quantità sostanziale di prove, almeno circostanziali, che i telomeri più lunghi negli atleti master rispetto ai non atleti di pari età siano un risultato di questi meccanismi protettivi, riduzione dell'infiammazione e dello stress ossidativo, ma non si può escludere del tutto che gli atleti master abbiano telomeri più lunghi essendo nati con telomeri più lunghi.

Altri marcatori seguono uno schema simile, come livelli più alti di Klotho (una proteina anti-età) e livelli più bassi di FGF23 (un marker di disfunzione endoteliale renale e fattore di rischio cardiovascolare) negli atleti master rispetto ai controlli della stessa età e persino raggiungendo livelli simili a quelli visti nei giovani adulti.

Migliore difesa antiossidante e antinfiammatoria, maggiore attività telomerasica, sovraregolazione delle proteine Shelterin, minori segnali di apoptosi e telomeri più lunghi, collettivamente, contribuiscono indubbiamente al mantenimento della salute generale e di capacità fisiche superiori alla media rispetto all'età cronologica, il che indica che gli atleti master sono biologicamente più giovani. Pertanto, il regolare esercizio fisico (inclusi stimoli ad alta intensità, con dose e frequenza corretta), oltre a una dieta controllata, una ragionevole gestione dello stress e un'adeguata composizione corporea dovrebbero essere presi in considerazione dai non atleti desiderosi di attenuare l'invecchiamento biologico.

Sebbene l'atleta master sia ampiamente riconosciuto come un modello di invecchiamento di successo, un piccolo numero di atleti può subire danni muscolari e cronici dovuti all'affaticamento correlato all'esercizio, una condizione nota come "sindrome miopatica della fatica nell'atleta" (FAMS). Questa condizione può essere dovuta all'allenamento di resistenza con volumi e intensità molto elevati e la partecipazione a un numero eccessivo di competizioni per tutta la stagione. Gli atleti master di resistenza affetti da FAMS hanno una lunghezza dei telomeri più corta nel muscolo scheletrico rispetto ad atleti senza sintomi FAMS. Questo accorciamento dei telomeri può essere attribuibile al danno ossidativo, dato che i telomeri sono un bersaglio significativo per le specie reattive dell'ossigeno e durante gli esercizi ad alto volume, ci può essere un incremento della produzione di specie reattive dell'ossigeno dal metabolismo ossidativo, in modo tale che venga superata la capacità

antiossidante. È importante notare, tuttavia, che solo una piccola percentuale di atleti maestri soffre di FAMS, e, a eccezione del periodo di sovrallenamento, l'aumento delle difese ossidanti indotto dall'allenamento sembra sufficiente per eliminare i ROS e prevenire l'accorciamento dei telomeri indotto dallo stress ossidativo.

Alcuni limiti del presente studio devono essere affrontati. Un altro valore di eterogeneità è stato identificato nella presente meta-analisi, forse dovuto alle differenze nei metodi per valutare la lunghezza dei telomeri (FISH, Southern blot e qPCR), il tessuto (muscolo, sangue e saliva) e la grandezza del campione. Inoltre, studi sperimentali completi che hanno studiato a fondo i meccanismi di conservazione dei telomeri negli atleti master sono ancora scarsi, il che rende difficile spiegare con precisione il fenomeno.

La ricerca futura dovrebbe concentrarsi sulla spiegazione della conservazione della lunghezza dei telomeri negli atleti master per valutare una rete più completa di marcatori legati all'età, come lo stress ossidativo, marcatori infiammatori, ormoni, proteine protettive e altri marcatori dell'invecchiamento.

In conclusione, gli atleti master hanno telomeri più lunghi rispetto ai loro coetanei non atleti, probabilmente a causa di un ridotto stress ossidativo e infiammazione cronica e una regolazione positiva sia delle proteine Shelterin che dell'attività telomerasica. Questi risultati forse non sono dovuti esclusivamente all'allenamento fisico, ma da una combinazione di fattori di stile di vita tra cui gestione dello stress, riposo adeguato, alimentazione equilibrata e migliori caratteristiche psicologiche. Ricerche originali sugli atleti che interrompono improvvisamente l'esercizio fisico regolare potrebbero fornire importanti informazioni sui benefici del mantenimento o meno di una preparazione atletica.

## 6. CAPITOLO 6

### 6.1 TERT/TELOMERASI ED ESERCIZIO FISICO

Lo scopo di questa revisione (Denham e Sellami, 2021) era valutare se l'esercizio fisico fosse in grado di regolare positivamente l'espressione della TERT, che è la trascrittasi inversa telomerica, il principale componente proteico della telomerasi, e l'attività della telomerasi nelle cellule somatiche non tumorali.

È stata eseguita una ricerca di studi sull'uomo e sui roditori utilizzando i database PubMed, Scopus, Science Direct ed Embase. Sono stati inclusi nelle meta-analisi studi sull'uomo e sui roditori ed entrambi hanno mostrato eterogeneità ( $I^2 = 55-87\%$ ,  $p < 0,05$ ).

I criteri di inclusione erano i seguenti: 1) un esercizio (allenamento singolo o cronico). 2) Un'analisi dell'attività della telomerasi e della TERT (come mRNA o proteina) o contenuto proteico di TERT da tessuto non tumorale; 3) studi su mammiferi.

Era importante limitare la sintesi e la meta-analisi a studi che includessero lo studio di tessuti non tumorali di mammiferi, poiché alcuni tipi di cancro presentano un'elevata attività della telomerasi che promuove la sopravvivenza delle cellule tumorali e i mammiferi condividono una comune sequenza telomerica (5'-TTAGGG-3'), comparabile biologia dei telomeri (ad es. proteine Shelterin e telomerasi) e regolazione dei meccanismi dei telomeri.

Sono stati esclusi tutti gli studi che coinvolgevano esperimenti *in vitro* progettati per analizzare l'effetto dell'esercizio sulla telomerasi, sulla TERT o studi di associazione (ad eccezione degli studi sui roditori in cui l'eutanasia era necessaria per la raccolta dei tessuti), revisioni di articoli o studi di coorte. Inoltre, è stato escluso qualsiasi studio che non esaminasse l'esercizio come stile di vita principale o che comportasse molteplici cambiamenti nello stile di vita (ad es. meditazione, consulenza e/o dieta) poiché qualsiasi potenziale effetto dell'esercizio sulla telomerasi/TERT può non essere spiegato solamente dall'esercizio. Infine, atti di convegni, capitoli di libri e anche gli articoli editoriali sono stati esclusi poiché i dati probabilmente non erano sottoposti a revisione paritaria ed erano presenti problemi pratici con la valutazione del loro rischio di parzialità.

Sono state analizzate l'espressione/abbondanza/attività (espressa in unità arbitrarie [AU], media  $\pm$  DS) della telomerasi basale, mRNA di TERT o l'espressione proteica di TERT e il punto temporale post-esercizio (prove umane). Per il roditore è stata studiata, nelle analisi, la relativa espressione/abbondanza/attività (AU, media  $\pm$  SD)

della telomerasi, mRNA o espressione proteica di TERT ed è stata confrontata con i controlli (che non praticavano esercizio).

Per le analisi dell'esercizio acuto, veniva registrata nelle analisi l'attività della telomerasi al basale rispetto a immediatamente dopo l'esercizio, mentre l'analisi dell'mRNA TERT è stata limitata al basale confrontata ad 1 ora dopo l'allenamento.

È stato calcolato quanto era influente l'esercizio (allenamento a breve e lungo termine) sull'attività della telomerasi o l'espressione di TERT mRNA/proteina da ciascun confronto con le meta-analisi ad effetti casuali utilizzando Review Manager (versione 5.4). L'effetto degli intervalli di confidenza è stato calcolato utilizzando il metodo ad effetti casuali con un  $\alpha = 0.05$ . Il bias di pubblicazione è stato valutato usando grafici ad imbuto rispetto all'errore standard.

La differenza (FD) dell'espressione del gene TERT dei leucociti o dell'attività della telomerasi delle PBMC tra gli atleti di resistenza rispetto ai controlli sani è stata presentata in un grafico a barre. I grafici sono stati sviluppati utilizzando Prisma GraphPad (versione 9.0.0).

Un riepilogo degli studi sull'uomo e sui roditori inclusi nella revisione sistematica è riportato rispettivamente nelle Tabelle 7 e 8.

Gli studi sull'uomo hanno analizzato l'espressione della TERT o l'attività della telomerasi dopo:

- una singola sessione di esercizio
- esercizio fisico cronico
- o entrambi.

I partecipanti erano:

- individui sani
- vittime di abusi domestici
- ultra-maratoneti
- assistenti familiari
- cardiopatici ambulatoriali
- pazienti affetti da affaticamento cronico.

Sebbene non tutti gli studi specificassero le etnie dei partecipanti, sembrava esserci una gamma di gruppi etnici con partecipanti dal Regno Unito, USA, Australia, Paesi europei, Danimarca, Cina, medio oriente.

Uno studio ha incluso un gruppo di etnia mista (individui bianchi, asiatici e neri) dagli Stati Uniti. Mentre un totale di 80 partecipanti, di cui 30 donne, sono stati coinvolti nelle singole prove d'esercizio. L'età media dei partecipanti variava da  $19,5 \pm 1,1$  anni a  $59,58 \pm 5,56$  anni. Diversi studi hanno analizzato i leucociti del sangue intero, cellule T selezionate (CD4 + CD45RO + e CD8+CD45RA+) e 9 PBMC. Sono stati implementati studi sull'uomo basati: sull'allenamento di resistenza (con un'enfasi sul muscolo, che stresserebbe il sistema energetico aerobico), allenamento aerobico e su entrambi i tipi di allenamento. Gli studi che hanno esaminato gli effetti di una singola sessione di esercizio erano con 30-35-45 minuti a sessione; l'intensità andava da bassa,

moderata ad alta. Sono stati esaminati dei campioni di sangue 10 minuti, 30 minuti, 60 minuti, 90 minuti e 24 ore dopo la fine dell'esercizio. Di questi studi, uno ha analizzato l'attività della telomerasi nelle PBMC e nei leucociti selezionati (CD14+ e CD34+) e un altro ha analizzato l'mRNA di TERT nei leucociti del sangue intero e in sottoinsiemi di leucociti (cellule CD4+CD45RO + T e cellule CD8+CD45RA + T). La durata delle sessioni di allenamento erano di: 1,9,12,16,22 o 24 settimane; gli allenamenti venivano eseguiti 2,3, da 3 a 5, 5 o 7 volte a settimana con intensità bassa, moderata o alta. Uno studio ha analizzato mRNA di TERT nel sangue intero, un altro ha analizzato mRNA di TERT e attività della telomerasi nel muscolo scheletrico e nelle PBMC e 7 studi hanno analizzato l'attività della telomerasi nelle PBMC. In particolare, non sono state rivelate né l'espressione di TERT, né l'attività della telomerasi nel muscolo scheletrico umano prima o dopo l'esercizio.

References	Population <sup>a,b,c</sup>	Training status	VO <sub>2max</sub> (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	Tissue	Analysis	Method	Exercise trial <sup>d,e,f,g</sup>
(Nickels et al., 2020)	23 Healthy individuals, F (16)/M (7), 51.5 ± 4.9 y	Untrained	?	Whole blood	TERT mRNA	qPCR	Chronic resistance exercise (group) training, 12 weeks, Low (high repetitions), 2
(Wemer et al., 2019)	15 Healthy individuals, F (7)/M (8), 24.5 ± 1.3 y	untrained	41.4 ± 6.3	PBMC	Telomerase activity	TRAP assay	Acute treadmill running, 45-min, maximum.
(Wemer et al., 2019)	15 Healthy individuals, F (7)/M (8), 24.5 ± 1.3 y	untrained	41.4 ± 6.3	CD14+ leukocytes	Telomerase activity	TRAP assay	Acute treadmill running, 45-min, maximum.
(Wemer et al., 2019)	15 Healthy individuals, F (7)/M (8), 24.5 ± 1.3 y	untrained	41.4 ± 6.3	CD34+ leukocytes	Telomerase activity	TRAP assay	Acute treadmill running, 45-min, maximum.
(Wemer et al., 2019)	15 Healthy individuals, F (7)/M (8), 24.5 ± 1.3 y	untrained	41.4 ± 6.3	PBMC	Telomerase activity	TRAP assay	Acute circuit resistance exercise training (strength endurance), 45 min, high-intensity (16 – 20 reps with 20RM)
(Wemer et al., 2019)	15 Healthy individuals, F (7)/M (8), 24.5 ± 1.3 y	untrained	41.4 ± 6.3	CD14+ leukocytes	Telomerase activity	TRAP assay	Acute circuit resistance exercise training (strength endurance), 45 min, high-intensity (16 – 20 reps with 20RM)
(Wemer et al., 2019)	15 Healthy individuals, F (7)/M (8), 24.5 ± 1.3 y	untrained	41.4 ± 6.3	CD34+ leukocytes	Telomerase activity	TRAP assay	Acute circuit resistance exercise training (strength endurance), 45 min, high-intensity (16 – 20 reps with 20RM)
(Wemer et al., 2019)	26 Healthy individuals, F (17)/M (9), 50.2 ± 7.4 y	untrained	35.3 ± 6.3	PBMC	Telomerase activity	TRAP assay	Chronic aerobic endurance training, 6 months, 45 min @ 40-60% HRR, 3
(Wemer et al., 2019)	29 Healthy individuals, F (19)/M (10), 48.4 ± 6.5 y	untrained	35.1 ± 5.0	PBMC	Telomerase activity	TRAP assay	Chronic aerobic endurance training, 6 months, 45 min @ 40-60% HRR, 3
(Wemer et al., 2019)	34 Healthy individuals, F (20)/M (14), 48.1 ± 7.5 y	untrained	35.3 ± 5.3	PBMC	Telomerase activity	TRAP assay	Chronic aerobic endurance training, 6 months, 45 min @ 40-60% HRR, 3
(Cheung et al., 2019)	136 Chinese women survivors of domestic abuse from their intimate partner, F, 42 ± 8.7 y	?	?	PBMC	Telomerase activity	TeloTAGGG Telomerase PRC ELISA <sup>PLUS</sup>	Chronic Qi Gong training, 22 weeks, low, 2
(Puterman et al., 2018)	34 Family caregivers, F (30)/M (4), 59.3 ± 5.7 y	untrained	23.7 ± 5.8	PBMC	Telomerase activity	Digital Droplet PCR	Chronic aerobic training, 24 weeks, 20-30 min @ low-moderate, 3-5
(Nocerimofrad and Ebrahim, 2018)	15 Healthy student volunteers, M, 19.5 ± 1.1 y	untrained	?	PBMC	Telomerase activity	Quantitative Telomerase Detection (QTD)	Chronic aerobic training (cycling), 9 weeks, high intensity interval training, 3
(Zietzer et al., 2017)	26 Healthy volunteers, F (13)/M (13), 23.37 ± 1.85 y	?	?	PBMC	Telomerase activity	TRAPeze Telomerase detection kit	Acute treadmill exercise, 35 min, low-moderate
(Cluckey et al., 2017)	Recreationally active healthy individuals (11 young and 8 older), F (10)/M 9, Young: 22 ± 2 y; older: 60 ± 2 y	untrained	Young: 38.1 ± 6.3 Old: 29.2 ± 6.1	PBMC	TERT mRNA	qPCR	Acute cycling, 30 min, high intensity interval training
(Saki et al., 2016)	10 Outpatients with a history of myocardial infarction, M,	?	?	PBMC	Telomerase activity	Quantitative Telomerase Detection Kit (qPCR)	Chronic aerobic and resistance training,

(continued on next page)

**Tabella 7.** (da Denham e Sellami, 2021)



References	Population <sup>a,b,c</sup>	Training status	VO <sub>2max</sub> (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	Tissue	Analysis	Method	Exercise trial <sup>d,e,f,g</sup>
(Duan et al., 2016)	57.3 ± 5.56 y 43 Healthy individuals, F (27)/M (16), 59.58 ± 5.56 y	untrained	?	PBMC	Telomerase activity	Human telomerase ELISA	8 weeks, Moderate intensity, 3 Chronic, Tai Chi training, 6 months, low, 5 Acute treadmill running,
(Chilton et al., 2014)	22 Healthy individuals, M, 24 ± 7.3 y	?	49.3 ± 4.7	Whole blood CD4+CD45RO + T cell CD8+CD45RA + T cell	TERT mRNA	Microarray and qPCR	30-min, 80% of VO <sub>2max</sub> (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ) Chronic aerobic exercise, 7 days, moderate, 7
(Laje et al., 2012)	9 Ultramarathon runners, F (1)/M (8), 44 ± 2 y	trained	58.2 ± 3.1	PBMC	Tert mRNA Telomerase	qPCR TRAPeze RT Telomerase Detection Kit	7 days, moderate, 7
(Ho et al., 2012)	27 Individuals with chronic fatigue, F(25)/M (2), 42.1 ± 7.3 y	?	?	PBMC	Telomerase activity	TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA	Chronic Qi Gong training, 4 months, low, 2

Legend: n/a, not available; VO<sub>2max</sub>, maximum oxygen uptake; 1RM, one repetition maximum; HRR, heart rate reserve;?, unknown or not reported.

<sup>a</sup> N and participant attributes.

<sup>b</sup> Sex (M/F).

<sup>c</sup> Age at the beginning of the exercise intervention.

<sup>d</sup> Mode of exercise.

<sup>e</sup> Length of intervention.

<sup>f</sup> Intensity.

<sup>g</sup> Frequency per week (chronic training studies only).

Negli studi su roditori (Tabella 8) si è studiato il TERT mRNA e l'attività della telomerasi nel muscolo scheletrico, diaframma, cuore, aorta, fegato, cervello (corteccia prefrontale e ippocampo), progenitori neurali dell'ippocampo e PBMC da ratti Wistar, ratti Sprague Dawley, Ratti Wistar Kyoto, topi C57/BL6, topi CAST/Ei J e topi Mdx. Sei studi hanno utilizzato topi maschi, due studi topi femmine, tre hanno utilizzato topi maschi e femmine e uno non è stato specificato. Di tutti gli studi che hanno esaminato l'influenza di un singolo periodo di esercizio (30 min, 42 min o un giorno di allenamento) su mRNA di TERT o attività della telomerasi, due hanno studiato il cuore utilizzando sessioni di tapis roulant e uno ha studiato il cervello utilizzando la corsa volontaria su ruota. Gli studi hanno riguardato principalmente l'uso della corsa su tapis roulant (n=5) o corsa volontaria sulla ruota (n = 5) e due il nuoto. L'intensità dell'esercizio variava da allenamenti auto-selezionati (corsa volontaria della ruota) ad intensità da moderata ad alta.

Reference	Population <sup>a,b,c,d</sup>	Tissue	Analysis	Method	Exercise trial <sup>e,f,g,h</sup>
(Vita et al., 2020)	Mdx and WT mice, 20, 7, 4-5 weeks	Skeletal muscle (gastrocnemius and tibialis anterior)	TERT protein	Immunoblot	Chronic treadmill training, 8-10 weeks, 12 m·min <sup>-1</sup> , 2
(Sadeghi-Tabas et al., 2020)	Wistar rats, 18, M,	Diaphragm	Telomerase activity	Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA Kit	Chronic treadmill training, 8 weeks, 40-95% of VO <sub>2max</sub> (ml·kg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ), 5
(Saghebjoon et al., 2019)	12 weeks Wistar rats, 28, M (14)/F (14), 8 weeks	Heart	Telomerase activity	Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA Kit	Acute treadmill training, 42 min, high-intensity interval training (long or short intervals)
(de Carvalho Cunha et al., 2018)	C57BL/6 mice, 8, M, 12 months	Skeletal muscle	Tert mRNA	qPCR	Chronic aerobic training, 12 weeks, low to high intensity, 3
(Booth et al., 2018)	Wistar Kyoto rats, 22-24 in each group (control, restricted and reduced - growth in utero), M, 5-20 weeks	Heart	Tert mRNA	qPCR	Chronic treadmill training, 4 weeks, 15 m·sec <sup>-1</sup> , 5
(Ludlow et al., 2017)	C47BL/6 J mice, 10, F, 6 weeks	Heart	Tert mRNA Telomerase activity	qPCR TRAP Quantitative Telomerase Detection kit	Acute treadmill, 30 min, 70% of peak speed reached during incremental treadmill testing
(Mychasiuk et al., 2016)	Sprague Dawley rats, 38, M + F, 1 month	Prefrontal cortex	Tert mRNA	qPCR	Acute/Chronic aerobic exercise, 1 - 7 days, ?, VWR
(Ludlow et al., 2012)	CAST/Ei J mice, 21, M + F, 7-10 weeks	Heart Liver Skeletal muscle	Tert mRNA Telomerase	qPCR Telomerase Detection Kit	Chronic aerobic exercise, 1 year, ?, VWR
(Wolf et al., 2011)	C57BL/6 mice (control and those who received polyribotinosinicpolyribocytidylic acid [Poly:I:C]), 18 per group, F, 50 days	Hippocampal neural precursor cell	Telomerase activity	TRAP ELISA Kit	Chronic aerobic training, 10 days, ?, VWR
(Werner et al., 2009)	C57/BL6 mice, 8 per group, M, 8 weeks	Aorta	Telomerase activity TERT protein	Quantitative repeat amplification Western Blot	Chronic aerobic training, 21 days, ?, VWR
(Werner et al., 2009)	C57/BL6 mice, 6 per group, M, 8 weeks	PBMC	Telomerase activity TERT protein	Quantitative repeat amplification Western Blot	Chronic aerobic training, 21 days, ?, VWR
(Werner et al., 2008)	C57/BL6 mice, 8 per group, M, 8 weeks	Left ventricle	Telomerase activity TERT protein	Quantitative repeat amplification Western Blot	Chronic aerobic training, 21 days, ?, VWR
(Radak et al., 2001)	Wistar rats, 12, M, 12 weeks	Skeletal muscle	Telomerase activity	Telomerase PCR ELISA Kit	Chronic aerobic training (swimming), 8 weeks, ?, 5

Legend: n/a, not available; VO<sub>2max</sub>, maximum oxygen uptake; 1RM, one repetition maximum; HRR, heart rate reserve; VWR, voluntary wheel running; ?, unknown or not reported.

<sup>a</sup> Animal (rat/mouse).

<sup>b</sup> Number in the exercise arm of the trial.

<sup>c</sup> Sex (M/F).

<sup>d</sup> Age at the beginning of the exercise intervention.

<sup>e</sup> Type of exercise.

<sup>f</sup> Length of intervention.

<sup>g</sup> Intensity.

<sup>h</sup> Frequency per week (chronic training studies only).

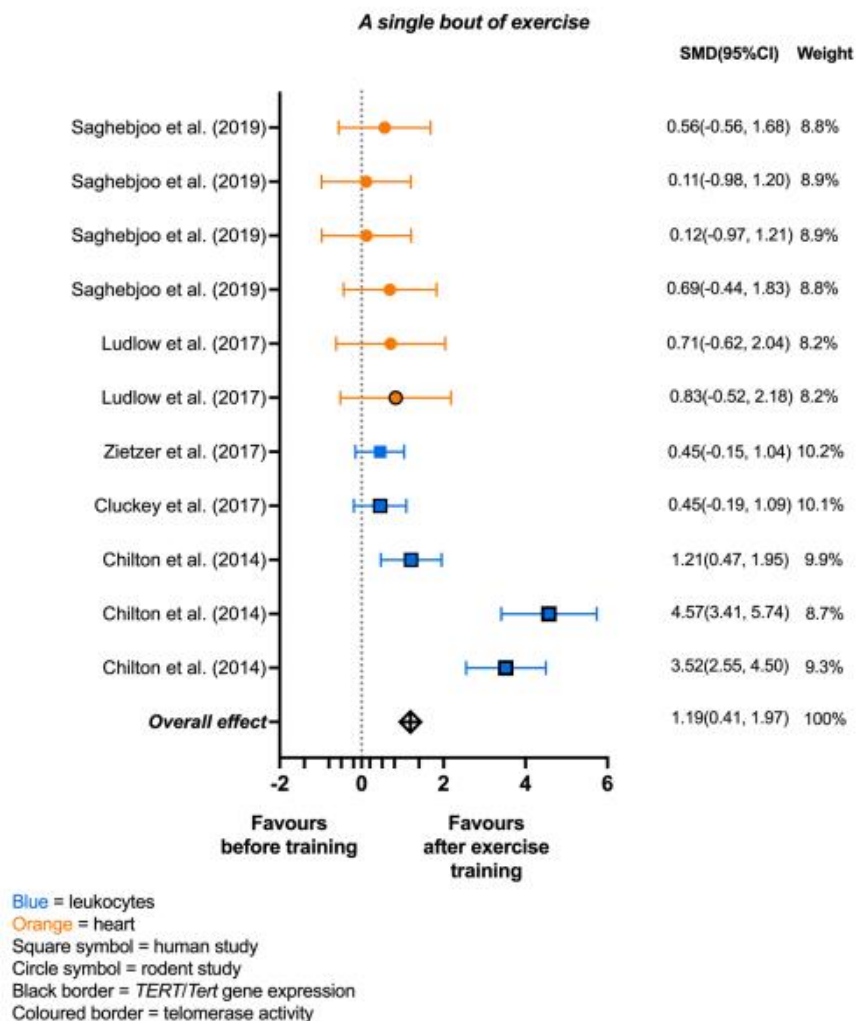
**Tabella 8.** (da Denham e Sellami, 2021)

Un riepilogo del rischio di valutazione di bias è mostrato in Figura 10. Valutando i punteggi ottenuti dei 24 studi ammissibili, il punteggio complessivo del rischio di bias era 332 (su un possibile 168-504) indicando un moderato rischio complessivo di bias.



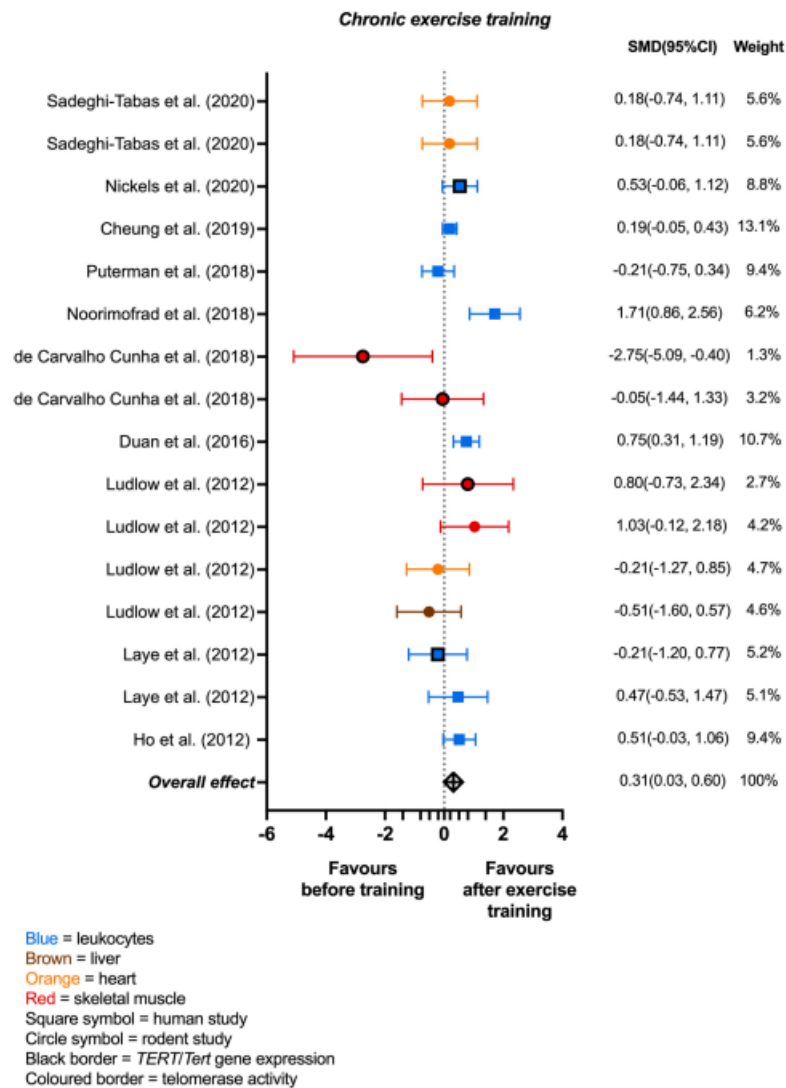
Figura 10 (da Denham e Sellami, 2021)

Cinque studi, che hanno comportato undici confronti, hanno fornito dati sull'influenza di un singolo periodo di esercizio sul gene TERT e sull'attività della telomerasi. Tre erano studi sull'uomo che esaminavano l'influenza dell'esercizio fisico sull'espressione di TERT e sull'attività della telomerasi nei leucociti del sangue intero, PBMC o sottoinsiemi di leucociti isolati, mentre un altro studio ha analizzato TERT e l'attività della telomerasi nel cuore dei topi e un altro l'attività della telomerasi cardiaca nei ratti. La meta-analisi ha rilevato che un singolo periodo di esercizio aumentava in modo significativo l'espressione di TERT e l'attività della telomerasi (N = 142, effetto complessivo – SMD [IC 95%]: 1,19 [0,41 – 1,97], p = 0,003, Fig. 11). Gli studi hanno mostrato un'elevata eterogeneità (87%).



**Figura 11.** (da Denham e Sellami, 2021)

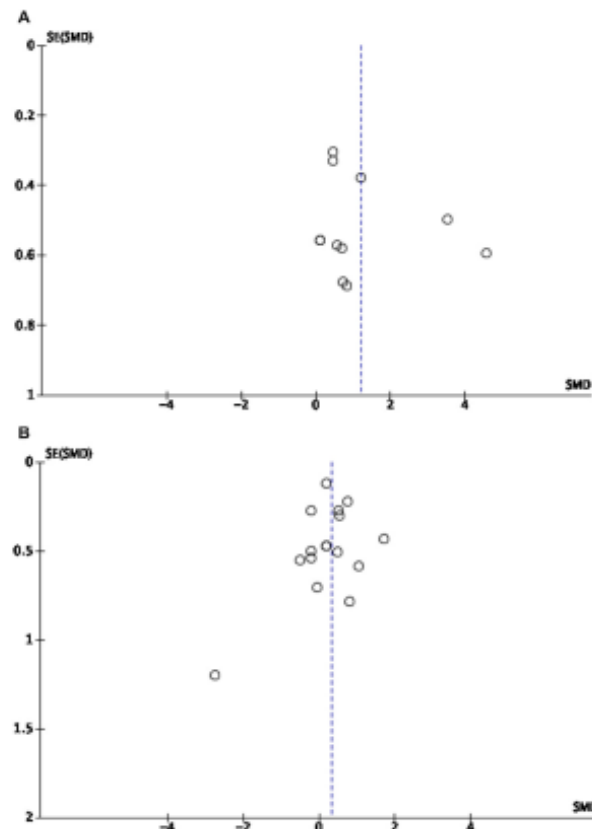
Dieci studi, comprendenti 16 confronti, sono stati inclusi nella meta-analisi che esaminava l'influenza dell'allenamento cronico sull'espressione di TERT e dell'attività telomerasica. Sette studi sull'uomo hanno analizzato TERT o l'attività della telomerasi in leucociti o PBMC, mentre gli altri tre erano studi sui roditori che includevano analisi che coinvolgevano campioni di cuore, muscolo scheletrico e fegato. I risultati di questa meta-analisi hanno indicato che l'allenamento fisico cronico aumentava l'attività della telomerasi (N = 337, effetto complessivo - SMD [95%CI]: 0,31 [0,03 - 0.60], p = 0.03, Fig. 12), anche se in misura minore rispetto a un singolo periodo di esercizio fisico. Gli studi hanno mostrato una moderata eterogeneità ( $I^2 = 55\%$ ).



**Figura 12.** (da Denham e Sellami, 2021)

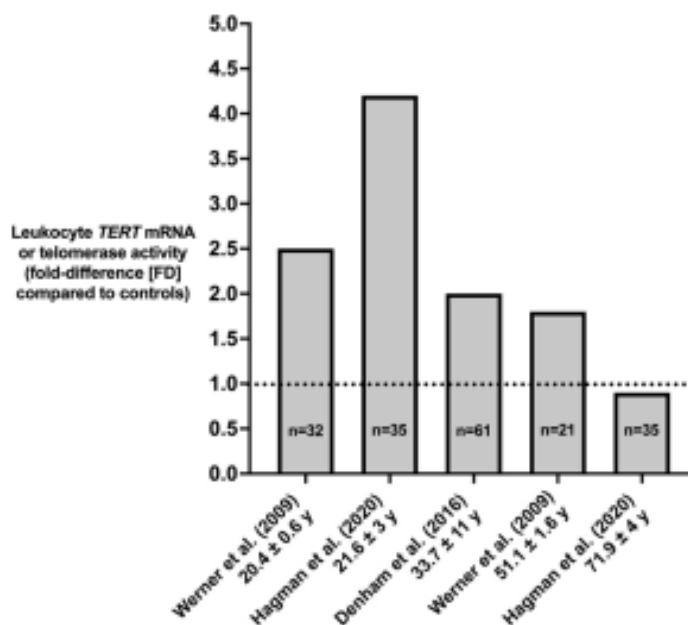
Il grafico ad imbuto traccia i risultati meta-analitici sull'influenza di un singolo periodo di esercizio fisico e allenamento cronico sull'espressione di TERT e sull'attività della telomerasi.

Sebbene un numero modesto ( $n = 5$ ) di studi è risultato eterogeneo ( $I^2 = 87\%$ ), questi studi sono stati inclusi rendendo problematica la valutazione del bias di pubblicazione, il grafico a imbuto degli studi con esercizio acuto era in qualche modo asimmetrico (Fig. 13A). Gli interventi di allenamento cronico non hanno mostrato marcati segni di bias di pubblicazione, poiché la maggior parte degli studi era raggruppata intorno alla media (Fig. 13B).



**Figura 13.** (da Denham e Sellami, 2021)

Quattro studi trasversali che hanno analizzato TERT e l'attività della telomerasi negli atleti di resistenza e nei controlli. Considerando gli atleti di resistenza occupati in un regolare allenamento fisico, questi avevano un livello di fitness cardiorespiratorio superiore e telomeri leucocitari relativamente più lunghi rispetto ai controlli inattivi. Sono stati estratti dati sulla differenza di TERT e dell'attività della telomerasi tra atleti e controlli e i dati sono presenti in Figura 14. Basandosi su queste indagini, gli atleti di resistenza, in media, esibivano un aumento dell'espressione di TERT leucocitario o dell'attività della telomerasi nelle PBMC rispetto ai loro coetanei inattivi.



**Figura 14.** (da Denham e Sellami, 2021)

Le terapie basate sulla telomerasi hanno un enorme potenziale per combattere le malattie legate all'età e al lento invecchiamento biologico, dato che la loro somministrazione ritarda la senescenza replicativa nelle cellule in coltura e prolunga la salute e la durata della vita dei roditori. Sebbene gli studi di terapia genica TERT siano attualmente in corso, l'uso clinico di terapie basate sulla telomerasi nell'uomo sono molto probabilmente lontane anni. Quindi, un metodo poco costoso e modificabile è considerare anche i fattori dello stile di vita che modulano la telomerasi e prevengono il logoramento dei telomeri e l'invecchiamento biologico precoce.

Secondo i risultati di questa revisione sistematica e meta-analitica, gli atleti di resistenza hanno mostrato un aumento dell'attività di TERT e della telomerasi nei leucociti rispetto alle loro controparti inattive e sulla base dei risultati degli studi identificati e ammissibili, sia un singolo periodo di esercizio (n; differenza media standardizzata [IC 95%]: 5; SMD: 1,19 [0,41–1,97], p = 0,003) che l'allenamento fisico a lungo termine (10; 0,31 [0,03–0,60], p = 0,03) regolano positivamente l'espressione di TERT e l'attività della telomerasi nelle cellule somatiche non tumorali.

Questi risultati suggeriscono che l'esercizio fisico è un fattore di stile di vita poco costoso che aumenta l'espressione di TERT e l'attività della telomerasi. Inoltre, l'esercizio fisico regolare potrebbe attenuare il logoramento dei telomeri attraverso un meccanismo dipendente dalla telomerasi e infine estendere la durata della salute e la longevità.

Un singolo periodo di esercizio induce un notevole stress fisiologico che porta ad adattamenti indotti dall'esercizio e prestazioni fisiche migliorate.

Un singolo periodo di esercizio ha aumentato significativamente l'espressione del gene TERT e l'attività della telomerasi nel tessuto cardiaco dei roditori e nei leucociti

umani (con una grande dimensione dell'effetto: 1.19). È interessante notare che l'attività della telomerasi era immediatamente sovraregolata dopo la cessazione dell'esercizio fisico nell'uomo, mentre l'espressione del gene TERT aumentava solamente un'ora dopo l'allenamento e rimaneva elevata per almeno i 90 minuti successivi. Un'interpretazione di questi risultati è che mentre l'attività della telomerasi è rapidamente regolata dall'esercizio fisico, l'aumento dell'espressione genica di TERT, che sosterrrebbe la produzione della telomerasi, è ritardata di almeno un'ora dopo la cessazione dell'allenamento. Tutti gli studi sull'esercizio acuto inclusi in questa particolare analisi hanno valutato l'allenamento aerobico (ad es. corsa su tapis roulant o ciclismo). Un'indagine sull'uomo ha notato una tendenza specifica per sesso nell'aumento indotto dall'esercizio acuto sull'espressione di TERT leucocitario, tale che i giovani uomini mostravano una significativa sovraregolazione di TERT, fattore non osservato nelle loro coetanee.

Data l'importanza dell'allenamento di resistenza per mantenere il tono muscolo scheletrico, la densità ossea e la funzionalità generale, sono state incoraggiate ulteriori analisi che prevedono lo studio di esercizi diversi per determinare le potenziali influenze che questi possono avere su TERT/ attività della telomerasi.

Sebbene una singola sessione di esercizio provochi un notevole stress cellulare, l'esposizione ripetuta all'esercizio fisico induce una moltitudine di adattamenti che migliorano le prestazioni e riducono il rischio di malattie croniche legato all'età. Sulla base dei risultati degli studi ammissibili tra cui quelli che hanno analizzato muscolo scheletrico, cuore, fegato, cervello e leucociti (sangue intero e PBMC), anche l'allenamento cronico aumenta l'espressione genica di TERT e l'attività della telomerasi, anche se in misura minore rispetto all'esercizio acuto (dimensione dell'effetto moderata: 0,31).

Uno studio ha indicato che l'allenamento a lungo termine aumenta l'attività della telomerasi nelle PBMC e l'espressione di TERT leucocitario nell'uomo, che è ulteriormente supportato dall'aumento di TERT/ attività della telomerasi osservato in atleti rispetto a controlli sani. Questo adattamento a lungo termine può in definitiva ritardare l'invecchiamento biologico attraverso il mantenimento della lunghezza dei telomeri. L'immediato aumento di TERT leucocitario e dell'attività della telomerasi in ogni sessione di esercizio potrebbe portare ad un'espressione e attività prolungate nel tempo di quest'ultime. Anche se questo è ancora da convalidare sperimentalmente, è ragionevole suggerire che è richiesto un allenamento fisico abituale per mantenere l'espressione di TERT, l'attività della telomerasi e l'integrità dei telomeri, e che il sedentarismo deve essere evitato per promuovere un invecchiamento sano.

Ci sono effetti tessuto-specifici dovuti all'allenamento fisico a lungo termine sulla lunghezza dei telomeri, tale che l'accorciamento dei telomeri è attenuato nel cuore, aorta e fegato e i telomeri dei leucociti tendono ad essere più lunghi negli individui che sono fisicamente attivi o atleti rispetto alle controparti inattive.



Tuttavia, la lunghezza dei telomeri correlava in modo inverso al volume dell'esercizio fisico e risultava inferiore negli atleti sovrallenati rispetto agli atleti sani.

Collettivamente, gli atleti di resistenza tendevano ad avere una TERT leucocitaria più elevata o maggiore attività telomerasica rispetto ai controlli inattivi. I giovani e gli atleti di mezza età hanno mostrato livelli più elevati di TERT e attività della telomerasi rispetto ai gruppi di controllo inattivi (differenza media: 1,8-4,2 volte), mentre livelli simili sono stati osservati negli atleti adulti più anziani e controlli inattivi di pari età.

## 7. CONCLUSIONI

Questa tesi ha riassunto il crescente numero di prove secondo le quali l'attività fisica ha un impatto sul logoramento dei telomeri e quindi sul processo di invecchiamento. Sebbene la maggior parte degli studi inclusi evidenzia effetti positivi dell'attività fisica sulla dinamica dei telomeri, manca un consenso sul tipo di esercizio e sulla modalità di allenamento (intensità, durata e frequenza) più efficaci. Inoltre, l'inattività fisica è un importante fattore di rischio per malattie cardiovascolari e molte altre condizioni croniche di malattia, indipendentemente dall'esercizio. In particolare, la riduzione del comportamento sedentario ha un effetto profondo e positivo sulla conservazione e/o sull'aumento del TL. Per quanto riguarda la storia di allenamenti precedenti, l'attuale livello di forma fisica sembra avere un ruolo benefico maggiore sul TL rispetto agli esercizi svolti in passato.

Infatti, tra gli atleti, una storia di attività fisica durante la giovinezza non sembra svolgere un ruolo protettivo nel preservare o aumentare il TL. Tuttavia, è una prova evidente che, atleti d'élite o master che si sono allenati per tutta la vita avranno un TL maggiore rispetto ai controlli inattivi. Sebbene la maggior parte degli studi sottolinei il ruolo benefico dell'attività fisica sulla dinamica dei telomeri e sull'invecchiamento, gli eventi molecolari nella conservazione e/o l'allungamento dei telomeri rimangono poco conosciuti. Insieme ad un'ulteriore comprensione della biologia dei telomeri e dei potenziali effetti deleteri a livello molecolare (es stress), devono essere anche considerate le differenze di tessuto e di tipo cellulare nelle analisi del TL. In futuro gli studi dovrebbero fornire informazioni più dettagliate sul livello di forma fisica dei partecipanti, nonché sulle caratteristiche della modalità di allenamento, per la standardizzazione e il confronto, al fine di trarre conclusioni più definitive.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Aguiar et al. (2021) "Telomere length and physical activity in adult and elderly endurance athletes". *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 61(1), 122-128. DOI: 10.23736/S0022-4707.20.10587-4

Arsenis et al. (2017) "Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action". *Oncotarget*, 8(27), 45008-45019. DOI: 10.18632/oncotarget.16379

Denham e Sellami, 2021 "The effects of exercise and physical activity on longevity and TERT/Telomerase activity". *Aging and disease*, 12(2), 404. DOI: 10.14336/AD.2020.0125

Gardner et al. (2019) "Gender and telomere length: Systematic review and meta-analysis". *Experimental Gerontology*, 114,26-35. DOI: 10.1016/j.exger.2018.12.015

Hannum et al., 2013 "Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates". *Molecular cell*, 49(2), 359-367. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.10.016

Horvath, 2013 "DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing". *Nature Reviews Genetics*, 14(6), 415-428. DOI: 10.1038/nrg3444

Jylhävä et al. (2017) "Social and clinical factors associated with biological age acceleration in a longitudinal study". *Aging*, 9(10), 2159-2170 DOI: 10.18632/aging.101319

Lee e Pellegrini (2021) "The Roles of Telomeres and Telomerase in Cellular Immunity". *Frontiers of Immunology*, 12, 655973. DOI:10.3389/fimmu.2021.655973