



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
Dottorato di Ricerca in Scienze della Nutrizione
XXIX Ciclo

**CORRELAZIONE TRA INDICI NUTRIZIONALI
E SISTEMA ENDOCRINO
NELL'INVECCHIAMENTO DI SUCCESSO
E NELLA LONGEVITÀ**

RELATORE: Prof. Giovanni Vitale

COORDINATORE del CORSO: Prof. Gian Vincenzo Zuccotti

Tesi di Dottorato di Ricerca di
Evelyn FERRI
Matricola R10441

Anno Accademico 2015 - 2016

INDICE

I.	RIASSUNTO	4
II.	INTRODUZIONE	6
	Invecchiamento	6
	Epidemiologia dell'invecchiamento	7
	Teorie dell'invecchiamento	13
	Teoria genica	13
	Teoria evuzionistica	15
	Teoria dei radicali liberi	16
	Teoria della senescenza cellulare	16
	Teoria immunologica	17
	Teoria neuroendocrina	18
	Invecchiamento e sistema endocrino	20
	Asse ipotalamo-ipofisi-tiroide	21
	Asse ipotalamo-ipofisi-tiroide e invecchiamento	22
	Asse ipotalamo-ipofisi-tiroide e nutrizione	23
	Asse ipotalamo-ipofisi-gonadi	26
	Asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e invecchiamento	28
	Asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e nutrizione	29
	Vitamina D	32
	Interpretazione dei livelli di vitamina D	38

Vitamina D e invecchiamento	39
Stato nutrizionale negli anziani	40
III. RAZIONALE e SCOPO DEL LAVORO	43
IV. MATERIALI e METODI	45
Disegno dello studio	45
Metodi	47
Parametri antropometrici	47
Parametri biochimici e dosaggi ormonali	48
Analisi statistica	59
V. RISULTATI	60
Caratteristiche dei soggetti arruolati nello studio	60
Valutazioni degli indici nutrizionali, ormonali e biochimici	62
Correlazioni tra indici nutrizionali e livelli ormonali	66
VI. DISCUSSIONE	70
VII. BIBLIOGRAFIA	77

RIASSUNTO

Negli ultimi decenni a causa dell'allungamento della vita media, dell'elevata prevalenza di soggetti anziani nella popolazione generale e dell'incremento della spesa sanitaria e sociale per la cura e l'assistenza degli anziani, sono notevolmente aumentati gli studi sull'invecchiamento.

Secondo la "teoria neuroendocrina" l'invecchiamento è una conseguenza dei cambiamenti negli assi ormonali che regolano la riproduzione, la crescita, lo sviluppo e la sopravvivenza attraverso l'adattamento allo stress. Gli organi endocrini più coinvolti sono quelli preposti alla secrezione degli ormoni tiroidei (triiodotironina libera e tiroxina libera), gonadici (estradiolo e testosterone), paratiroidei (ormone paratiroideo) e ipofisari (ormone stimolante della tiroide, ormone follicolostimolante e ormone luteinizzante). Le conseguenze di questi cambiamenti sono molteplici e hanno effetti su tutti i sistemi dell'organismo.

Negli ultimi anni, gli studi sull'invecchiamento in buona salute si sono concentrati sui centenari, soggetti che hanno posticipato o evitato del tutto l'insorgenza delle principali patologie età-correlate. Essi rappresentano il modello per eccellenza per lo studio di fattori biologici, genetici e ambientali alla base della longevità. Tuttavia, ci sono alcuni svantaggi inerenti al reclutamento di questi individui: casistiche di numerosità limitata, mancanza di un gruppo di controllo adeguato e fragilità a causa dell'età estrema di questi soggetti. Il modello dei figli di centenari, proposto in questo studio, rappresenta un nuovo e promettente approccio sperimentale per approfondire le basi biologiche della longevità, poiché sono soggetti che godono di uno stato di buona salute in quanto sembrano aver ereditato le caratteristiche genetiche dei genitori. Questi soggetti sono poi stati paragonati ad un gruppo di controllo costituito da coetanei con età, sesso ed etnia paragonabili a quelli dei figli di centenari.

Dal momento che in molti hanno confermato la presenza di complesse alterazioni negli assi ormonali durante l'invecchiamento, il primo obiettivo di questo studio è stato quello di valutare come i cambiamenti negli assi endocrini possano essere associati alla

longevità. Inoltre, basandoci sulla convinzione che l'alimentazione è in grado di influenzare lo stato di salute, il secondo obiettivo è stato valutare lo stato nutrizionale di questi soggetti. Abbiamo poi indagato l'esistenza di una possibile correlazione tra stato nutrizionale e assetto endocrino.

I risultati di questo studio hanno delineato un profilo ormonale e uno stato nutrizionale caratteristici dei soggetti centenari, probabile conseguenza dell'attivazione di particolari meccanismi in grado di indurre cambiamenti nella regolazione della secrezione ormonale e della composizione corporea nell'invecchiamento in buona salute. Questo è avvalorato dalle differenze riscontrate tra i figli di centenari e i controlli in alcuni degli ormoni analizzati, che sottolineano ulteriormente l'importanza che il sistema endocrino riveste nella longevità. Inoltre, numerose sono state le correlazioni riscontrate tra gli indici nutrizionali e le valutazioni ormonali, suggerendo una stretta relazione tra stato nutrizionale e metabolismo endocrino in questa popolazione.

Tutte queste evidenze supportano l'ipotesi di un sinergismo tra stato nutrizionale e sistema endocrino, interazione che potrebbe giocare un ruolo fondamentale nell'invecchiamento di successo e nella longevità.

INTRODUZIONE

INVECCHIAMENTO

Per invecchiamento si intende la trasformazione che coinvolge l'organismo in ogni tempo, con riferimento non solo a cambiamenti associati alla perdita (senescenza) ma anche all'acquisizione di funzioni (crescita e sviluppo). Esso è caratterizzato da ridotta omeostasi e da aumentata vulnerabilità agli stimoli esterni con conseguente aumento della suscettibilità a malattie e mortalità; coinvolge tutte le cellule, i tessuti, gli organi, ma la velocità di invecchiamento tra individui della stessa specie è diversa e diversa è anche la velocità di invecchiamento tra vari organi dello stesso individuo [1]. Le cause di tale fenomeno sono da ricercare nell'interazione tra fattori intrinseci (geni), estrinseci (ambiente), stocastici (eventi casuali) e fattori epigenetici (insieme dei meccanismi che regolano l'espressione del DNA, influenzabili dall'ambiente). L'invecchiamento può essere considerato un "fenotipo", in quanto risultato dell'azione dell'ambiente sul genotipo [2]. I possibili fenotipi sono l'*ageing*, l'*healthy ageing*, ovvero il raggiungimento di un'età avanzata in assenza di malattie debilitanti e/o in presenza di uno stato cognitivo o fisico preservato, e la longevità, intesa come durata della vita superiore alla media [3]. Benché ci sia una differenza tra "invecchiamento in buona salute" e "longevità", questi due fenomeni sono strettamente correlati e gli individui longevi sono tipicamente sani per la maggior parte della loro vita [3].

EPIDEMIOLOGIA DELL'INVECCHIAMENTO

Nell'ultimo secolo, nei paesi industrializzati si è assistito ad una redistribuzione della popolazione nelle fasce d'età, con cambiamenti legati soprattutto alla riduzione delle nascite, ai progressi della medicina (riduzione di morti premature, prevenzione e trattamento di malattie croniche) e al miglioramento delle condizioni di vita che hanno permesso un allungamento della vita media e un conseguente invecchiamento della popolazione [4]. Si è di fronte ad una rivoluzione demografica caratterizzata dall'aumento considerevole del numero di soggetti anziani [5].

Di seguito alcuni dati che mostrano l'entità di questo fenomeno mondiale (*World Population Ageing 2013. ST/ESA/SER.A/348*):

- il numero medio di figli per donna si è dimezzato da 5.0 negli anni 1950-1955 a 2.5 negli anni 2010-2015;
- da oggi al 2050 il numero di nascite nel mondo si stabilizzerà tra 138-140 milioni all'anno;
- negli anni 2045-2050 i sessantenni avranno un'aspettativa di vita di almeno due anni in più rispetto ai sessantenni di oggi. Anche la sopravvivenza degli ottantenni continuerà probabilmente ad aumentare;
- nel 2080 le fasce d'età 0-19/ 20-39/ 40-59/ over 59 saranno equamente distribuite;
- la percentuale della popolazione con un'età uguale o superiore a 60 anni è aumentata dall'8% nel 1950 al 12.5% di oggi. Nel 2050 tale percentuale arriverà al 21%, rappresentando più di un quinto della popolazione mondiale e raggiungendo i 2 miliardi (più del doppio degli attuali 841 milioni);
- nel 2050 gli over 80 costituiranno il 19% della popolazione, per un totale di circa 392 milioni di persone;
- nel 1950 l'età mediana era 24 anni mentre nel 2050 sarà 36 anni. Nei paesi sviluppati i valori sono molto superiori (Figura 1).

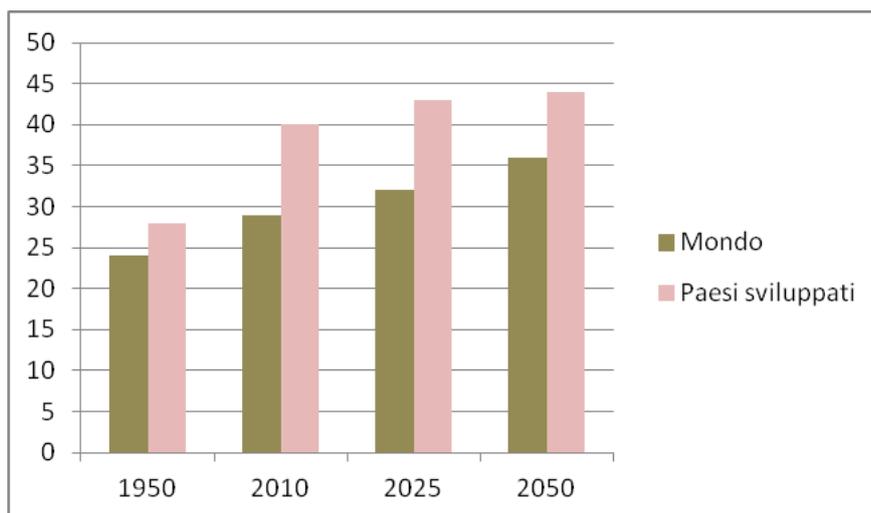


Figura 1. Età mediana nel mondo e nei paesi sviluppati.

L'invecchiamento della popolazione è un fenomeno in accelerazione (Figura 2).

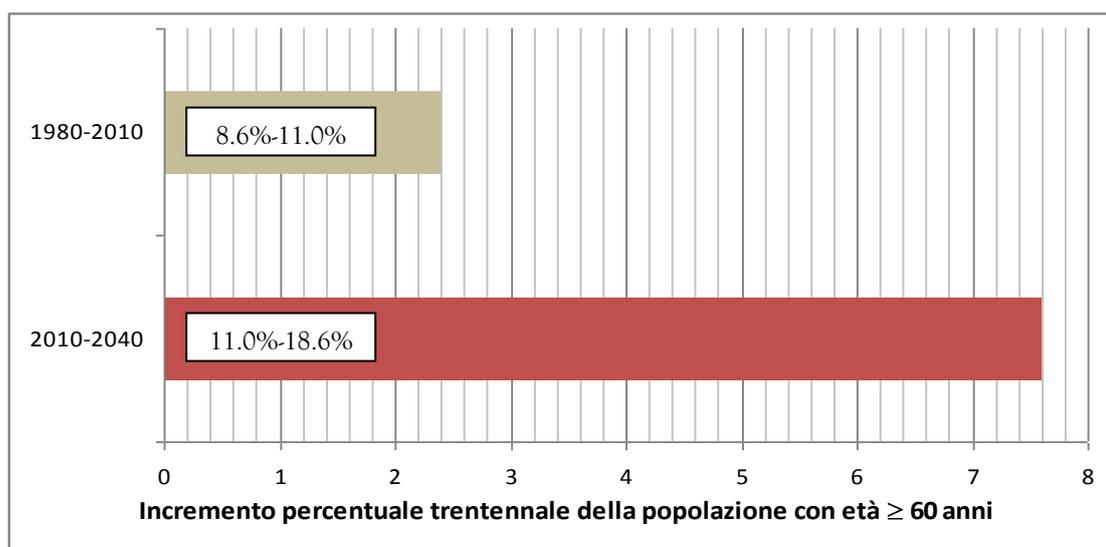


Figura 2. Velocità di invecchiamento della popolazione.

Le percentuali rappresentano i soggetti con età ≥ 60 anni all'inizio e alla fine dei periodi di riferimento.

In Italia, nel 2015 (<http://www.istat.it/it/archivio/180494>) i decessi registrati sono stati 653 mila, 54 mila in più dell'anno precedente (+9,1%). Il tasso di mortalità, pari al 10,7 per mille, è il più alto tra quelli misurati dal secondo dopoguerra in poi. L'aumento di mortalità risulta concentrato nelle classi di età molto anziane (75-95 anni). Il picco è in parte dovuto ad effetti strutturali connessi all'invecchiamento e in

parte al posticipo delle morti non avvenute nel biennio 2013-2014, più favorevole alla sopravvivenza (Figura 3).



Figura 3. Morti residenti per mese – Italia. Anni 2012-2015.

L'incremento di mortalità è omogeneo dal punto di vista del territorio. Le zone più interessate dall'aumento di mortalità sono quelle del Nord-ovest, Piemonte e Lombardia che registrano incrementi, rispettivamente, del 10,1% e del 10,6% (Prospetto 1).

Regioni	2014	2015*	Differenza	Diff. %	Regioni	2014	2015*	Differenza	Diff. %
Piemonte	49.412	54.411	4.999	10,1	Molise	3.561	3.856	295	8,3
Valle d'Aosta	1.289	1.530	241	18,7	Campania	51.877	57.405	5.528	10,7
Lombardia	90.461	100.051	9.590	10,6	Puglia	36.879	40.151	3.272	8,9
Trentino-Alto Adige	8.874	9.431	557	6,3	Basilicata	5.964	6.395	431	7,2
Bolzano	4.121	4.359	238	5,8	Calabria	19.276	20.415	1.139	5,9
Trento	4.753	5.072	319	6,7	Sicilia	49.665	53.625	3.960	8,0
Veneto	45.955	49.663	3.708	8,1	Sardegna	15.445	16.592	1.147	7,4
Friuli-Venezia Giulia	13.764	14.885	1.121	8,1	ITALIA	598.364	652.657	54.293	9,1
Liguria	20.655	22.653	1.998	9,7	Nord	278.138	304.580	26.442	9,5
Emilia-Romagna	47.728	51.956	4.228	8,9	Nord-ovest	161.817	178.645	16.828	10,4
Toscana	41.507	45.796	4.289	10,3	Nord-est	116.321	125.935	9.614	8,3
Umbria	9.907	10.930	1.023	10,3	Centro	123.177	134.241	11.064	9,0
Marche	16.826	18.353	1.527	9,1	Mezzogiorno	197.049	213.836	16.787	8,5
Lazio	54.937	59.162	4.225	7,7	Sud	131.939	143.619	11.680	8,9
Abruzzo	14.382	15.397	1.015	7,1	Isole	65.110	70.217	5.107	7,8

(*) Stima

Prospetto 1. Morti residenti per regione. Anni 2014-2015.

Il profilo per età dei deceduti nel 2015 è in linea con quello rilevato nel 2014. L'età modale al decesso rimane costante nel biennio, risultando pari a 84 anni per gli uomini e a 89 anni per le donne.

Le nascite sono state 488 mila (8 per mille residenti), 15 mila in meno rispetto al 2014 e nuovo minimo storico dall'Unità d'Italia. Poiché i morti sono stati 653 mila, ne deriva una dinamica naturale della popolazione negativa per 165 mila unità. Il ricambio generazionale, peraltro, non solo non viene più garantito da nove anni ma continua a peggiorare (da -7 mila unità nel 2007 a -25 mila unità nel 2010, fino a -96 mila nel 2014).

Il tasso di natalità scende dall'8,3 per mille nel 2014 all'8 per mille nel 2015, a fronte di una riduzione uniformemente distribuita sul territorio. Inoltre, il 2015 è il quinto anno consecutivo di riduzione della fecondità, giunta a 1,35 figli per donna.

Il peggioramento delle condizioni di sopravvivenza si traduce, per gli uomini come per le donne, in una riduzione della speranza di vita. Alla nascita quella degli uomini si attesta a 80,1 anni, con una riduzione di 0,2 sul 2014; quella delle donne invece è di 84,7 anni, in calo di 0,3 (Prospetto 3). La riduzione della speranza di vita alla nascita è pressoché uniforme a livello territoriale. All'età di 65 anni, l'aspettativa di vita residua di un uomo scende a 18,7 anni (-0,2 sul 2014), quella di una donna scende a 22 anni (-0,3) (Prospetto 2). Ciò dipende, com'è stato già evidenziato, dal fatto che l'aumento di mortalità è concentrato prevalentemente nelle classi di età anziane.

Regioni	Speranza di vita *		Variazione sul 2014		Regioni	Speranza di vita *		Variazione sul 2014	
	M	F	M	F		M	F	M	F
Piemonte	79,9	84,6	-0,3	-0,3	Molise	79,7	84,9	0,0	0,0
Valle d'Aosta	79,0	84,1	-0,7	-0,5	Campania	78,3	82,9	-0,3	-0,4
Lombardia	80,5	85,2	-0,3	-0,4	Puglia	80,3	84,6	-0,2	-0,3
Trentino-Alto Adige	81,1	85,8	-0,1	-0,1	Basilicata	79,9	84,7	-0,1	-0,2
<i>Bolzano</i>	80,9	85,6	-0,3	0,1	Calabria	79,6	84,3	0,0	-0,2
<i>Trento</i>	81,4	85,9	0,1	-0,2	Sicilia	79,4	83,5	-0,2	-0,3
Veneto	80,7	85,4	-0,1	-0,3	Sardegna	79,7	85,0	0,0	-0,3
Friuli-Venezia Giulia	79,9	85,0	-0,2	-0,1	ITALIA	80,1	84,7	-0,2	-0,3
Liguria	80,0	84,7	-0,1	-0,3	Nord	80,4	85,1	-0,2	-0,3
Emilia-Romagna	80,8	85,1	-0,2	-0,3	<i>Nord-ovest</i>	80,3	84,9	-0,3	-0,4
Toscana	80,7	85,2	-0,3	-0,2	<i>Nord-est</i>	80,7	85,3	-0,1	-0,3
Umbria	80,6	85,3	-0,3	-0,3	Centro	80,4	84,9	-0,1	-0,3
Marche	80,8	85,4	-0,2	-0,3	Mezzogiorno	79,4	83,9	-0,2	-0,3
Lazio	80,0	84,5	0,0	-0,2	<i>Sud</i>	79,4	83,9	-0,2	-0,3
Abruzzo	80,2	84,8	0,0	-0,3	<i>Isole</i>	79,4	83,9	-0,1	-0,3

(*)Stima

Prospetto 2. Speranza di vita alla nascita per sesso e regione – Anno 2015 e variazioni sul 2104.

L'aumento della mortalità nel 2015, concentrato in particolare nelle età senili (75-95 anni), non ha rallentato il processo di invecchiamento della popolazione. Tra il 1° gennaio 2015 e il 1° gennaio 2016 gli over 65 residenti in Italia passano da 13,2 a 13,4 milioni in termini assoluti, e dal 21,7% al 22% in termini relativi. Scende a 39 milioni, invece, la popolazione in età attiva (15-64 anni) che oggi rappresenta il 64,3% del totale (64,5% un anno prima). Così come pure scende la quota di giovani fino a 14 anni di età, dal 13,8% al 13,7% del totale, in parte frutto della comparsa sulla scena della “piramide per età” della più piccola generazione di neonati che si sia mai rilevata nella storia nazionale (Figura 4).

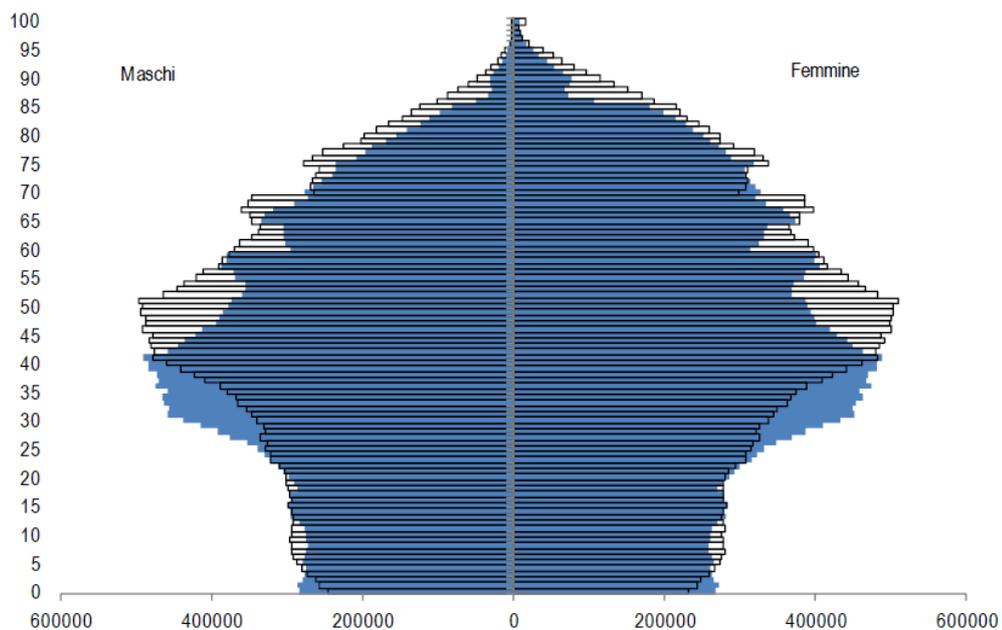


Figura 4. Piramide della popolazione italiana al 31.12.2015.

Gli indicatori di carico strutturale della popolazione confermano che al 1 gennaio 2016 il processo d’invecchiamento prosegue inesorabile il suo cammino. L’indice di dipendenza strutturale cresce in un anno dal 55,1 al 55,5%, quello di dipendenza degli anziani dal 33,7 al 34,2%. In complesso, l’età media della popolazione si accresce di ulteriori due decimi, arrivando a 44,6 anni (Prospetto 3).

Regioni	% pop. 0-14 anni	% pop. 15-64 anni	% pop. 65 anni e più	Indice di dipendenza strutturale	Indice di dipendenza anziani	Indice di vecchiaia	Età media
Piemonte	12,8	62,4	24,7	60,2	39,6	193,1	46,4
Valle d'Aosta	13,7	63,5	22,8	57,6	35,9	165,8	45,3
Lombardia	14,1	64,0	21,9	56,2	34,2	155,5	44,6
Trentino-Alto Adige	15,4	64,5	20,1	55,0	31,2	130,8	43,1
<i>Bolzano-Bozen</i>	16,0	64,9	19,1	54,1	29,5	120,0	42,3
<i>Trento</i>	14,8	64,1	21,1	56,0	32,8	141,9	43,9
Veneto	13,8	64,2	22,0	55,8	34,2	158,9	44,8
Friuli-Venezia Giulia	12,5	62,1	25,4	61,0	40,9	204,2	46,9
Liguria	11,5	60,3	28,2	65,7	46,7	245,5	48,5
Emilia-Romagna	13,4	63,0	23,6	58,8	37,5	175,5	45,7
Toscana	12,8	62,3	24,9	60,5	40,0	195,4	46,5
Umbria	12,9	62,3	24,8	60,5	39,8	192,3	46,3
Marche	13,1	62,9	24,0	59,0	38,2	183,2	45,9
Lazio	13,7	65,3	20,9	53,0	32,0	152,1	44,3
Abruzzo	12,8	64,3	22,9	55,4	35,6	179,5	45,4
Molise	11,8	64,6	23,6	54,8	36,5	200,1	46,0
Campania	15,2	66,9	17,9	49,5	26,7	117,2	41,7
Puglia	13,8	65,3	20,9	53,1	32,0	151,3	43,7
Basilicata	12,5	65,5	22,0	52,6	33,5	175,6	44,9
Calabria	13,7	65,8	20,6	52,0	31,2	150,5	43,6
Sicilia	14,3	65,5	20,2	52,7	30,8	141,0	43,1
Sardegna	11,8	66,1	22,1	51,3	33,4	187,2	45,7
ITALIA	13,7	64,3	22,0	55,5	34,2	161,1	44,6
Nord	13,6	63,4	23,1	57,8	36,4	170,2	45,3
<i>Nord-ovest</i>	<i>13,5</i>	<i>63,2</i>	<i>23,3</i>	<i>58,1</i>	<i>36,8</i>	<i>172,9</i>	<i>45,4</i>
<i>Nord-est</i>	<i>13,7</i>	<i>63,5</i>	<i>22,8</i>	<i>57,4</i>	<i>35,9</i>	<i>166,6</i>	<i>45,2</i>
Centro	13,3	63,9	22,8	56,6	35,8	171,8	45,3
Mezzogiorno	14,0	65,8	20,1	51,9	30,6	143,5	43,3
<i>Sud</i>	<i>14,2</i>	<i>65,9</i>	<i>19,9</i>	<i>51,7</i>	<i>30,1</i>	<i>140,1</i>	<i>43,1</i>
<i>Isole</i>	<i>13,7</i>	<i>65,6</i>	<i>20,7</i>	<i>52,3</i>	<i>31,5</i>	<i>150,8</i>	<i>43,8</i>

*Prospetto 3. Indicatori strutturali della popolazione per regione.
Anno 2016, dati al 1 gennaio, stime.*

Il fenomeno della longevità è stato paragonato ad un'epidemia, con un aumento rilevante del numero di supercentenari, ovvero soggetti con 110 anni e oltre [4, 6]. La loro presenza si concentra prevalentemente in Europa, Giappone e Nord America e quelli di cui si hanno informazioni attendibili sono attualmente 46 (44 donne e 2 uomini) (<http://www.grg.org> consultato il 21 ottobre 2016).

In Italia, il progressivo invecchiamento della popolazione è evidente guardando l'aumento costante degli ultraottantenni, che nel 2015 raggiungono il 6,7%. Fra questi, gli ultracentenari in vita al 31 dicembre 2015 sono 18.765, di cui poco più di 3 mila

maschi. All'interno di tale categoria, gli individui con almeno 105 anni sono quasi 950 (oltre 800 di genere femminile) mentre i supercentenari sono 22, due maschi e 20 femmine, tra le quali spicca la persona più longeva al mondo che ha più di 117 anni e risiede in Piemonte (<http://www.istat.it/it/archivio/186978>).

TEORIE DELL'INVECCHIAMENTO

Teoria genica

Studi condotti su centenari e i loro parenti hanno dimostrato come la longevità sia una caratteristica legata essenzialmente a fattori genetici ed ereditari piuttosto che a fattori ambientali e socio-economici [7-9]. I soggetti longevi, infatti, mostrano spesso una familiarità per la longevità [10-13]. Il ruolo della componente genetica nella longevità si deduce anche dal riscontro di famiglie caratterizzate da estrema longevità appartenenti a gruppi etnici diversi, con differente educazione, stile di vita e livello economico [14]. Tuttavia la concentrazione di soggetti longevi all'interno di alcune famiglie potrebbe essere legata semplicemente alla condivisione di uno stesso ambiente. In generale, però, le caratteristiche ambientali dei figli (stato socio-economico, regione di residenza, stile di vita) tendono a modificarsi con l'invecchiamento e quindi a discostarsi da quelle in cui sono vissuti i genitori: se il vantaggio di sopravvivenza fosse legato esclusivamente a fattori ambientali verrebbe meno con gli anni. Questo fatto non sembra però avvenire, concentrando l'attenzione sui fattori genetici [15]. La longevità sembra essere legata all'interazione di geni diversi [16] e, in particolare, è stato osservato l'importante ruolo che alcune varianti geniche giocano nel processo di invecchiamento e nella longevità (Figura 5) [17].

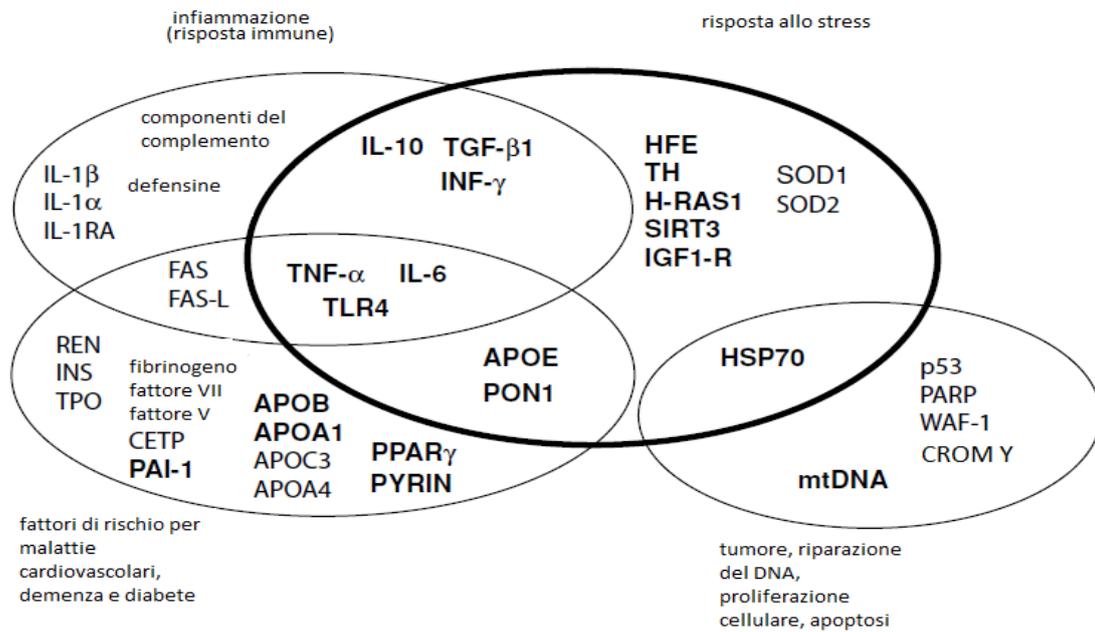


Figura 5. Geni associati alla longevità umana.

Ad esempio, l'Apolipoproteina E (ApoE) presenta 3 isoforme ϵ 2, ϵ 3 e ϵ 4 che interagiscono in modo differente con specifici recettori delle lipoproteine a bassa densità (LDL) alterando i livelli di colesterolo circolante. La variante ϵ 4 è associata ad un aumentato rischio di sviluppare patologie cardiovascolari e malattia di Alzheimer e ad una ridotta probabilità di raggiungere un'età avanzata. Infatti, questa variante è più frequente nei soggetti giovani rispetto a longevi. L'isoforma ϵ 2 sembra invece essere protettiva ed è più frequente nei soggetti longevi [18]. Altri studi hanno mostrato un legame tra l'Apolipoproteina B e la longevità [19]. Inoltre, nei centenari è stata osservata la presenza di specifici polimorfismi del gene che codifica per il recettore di IGF-1 [20]. Mutazioni inattivanti a carico dell'oncosoppressore p53 sono state riscontrate in diverse forme tumorali ed è stato ipotizzato un suo ruolo nell'invecchiamento sulla base di studi effettuati sul modello animale [21]. Si è visto come polimorfismi genici associati ad una bassa risposta infiammatoria possono ridurre lo sviluppo di malattie età-correlate [22]. Alcuni polimorfismi del gene dell'interleuchina-10 associati ad un'aumentata produzione della stessa, sono frequenti fra centenari di sesso maschile [23]. Questi polimorfismi sembrano essere protettivi nei confronti delle malattie cardiovascolari e associati alla longevità [24]. Nonostante elevati livelli di interleuchina-6 rappresentino in condizioni fisiologiche un importante

predittore di disabilità e mortalità nell'anziano [25], è stata osservata un'associazione negativa tra uno specifico genotipo dell'interleuchina-6, che comporta un aumento della sua produzione, e la longevità [26]. Anche alcuni polimorfismi del gene che codifica per l'antigene umano leucocitario (HLA) sembrano avere un ruolo nel raggiungimento di un'età avanzata [1, 27, 28]. Inoltre, recenti studi hanno mostrato l'associazione tra alcuni polimorfismi del gene del recettore della vitamina D con la longevità [29] e gli effetti di alcune varianti del DNA mitocondriale nell'invecchiamento di successo [30].

Fondamentale è stato l'aver scoperto che l'epigenetica ha un ruolo nella longevità. Le modificazioni epigenetiche del DNA sono dovute a processi che non comportano l'introduzione di cambiamenti nella sequenza nucleotidica del DNA, ma che possono indurre una modificazione del fenotipo dell'individuo. Le principali modificazioni epigenetiche sono la metilazione, l'acetilazione, la fosforilazione e l'ubiquitinazione. Numerosi studi hanno dimostrato che il pattern di metilazione del DNA cambia con l'età: con l'invecchiamento si assiste a un'ipometilazione del DNA globale ed un'ipermetilazione del promotore di specifici geni [31]. Queste modificazioni epigenetiche sono spesso implicate nell'insorgenza di patologie età-correlate [32]. In particolare, è stato visto che i leucociti isolati da sangue periferico presentano livelli di metilazione del DNA globale inferiori con l'aumentare dell'età, invece nelle figlie di donne centenarie questo processo è ritardato. Inoltre, i geni coinvolti nei processi di biosintesi, metabolismo e controllo della trasmissione del segnale sono metilati diversamente nei figli di centenari rispetto ai figli di soggetti non longevi [33].

Teoria evolutivista

Se l'evoluzione tende a selezionare caratteristiche positive, Haldane si chiese come la malattia di Huntington, malattia mortale e sfavorevole dal punto di vista evolutivo, permanesse nella popolazione come tratto dominante. L'intuizione di Haldane fu che la persistenza dell'Huntington fosse determinata dal suo manifestarsi successivamente al periodo riproduttivo e che dunque l'evoluzione selezionasse principalmente geni che favorissero la riproduzione, ignorando la parte successiva della vita.

Poco tempo dopo Williams propose la teoria dell'antagonismo pleiotropico, ancora

oggi universalmente accettata: un singolo gene, influenzando numerosi bersagli (pleiotropia) può determinare a valle effetti tra loro antagonisti. Quindi, la selezione naturale favorirebbe geni che conferiscono benefici a breve termine all'organismo a costo di effetti deleteri indesiderati a lungo termine, contribuendo direttamente alla senescenza [34].

La longevità sarebbe dunque dal punto di vista evolutivo un semplice epifenomeno non adattativo, dovuto ad una riduzione delle capacità di selezione naturale, senza alcun significato biologico [35].

Teoria dei radicali liberi

Secondo questa teoria proposta da Harman nel 1957, la produzione mitocondriale di radicali liberi dell'ossigeno regolerebbe la velocità di invecchiamento.

La genesi di radicali liberi avviene in seguito ad ogni reazione catabolica che genera energia ed è dunque tanto maggiore quanto più veloce è il metabolismo cellulare. Questa teoria sarebbe l'anello di congiunzione tra i fattori mitocondriali che influenzano l'invecchiamento e gli esiti favorevoli della restrizione calorica sulla longevità [36]. I mitocondri contribuirebbero all'invecchiamento anche a causa delle mutazioni e delle delezioni presenti nel DNA mitocondriale: l'ambiente ossidativo che lo circonda, la carenza di istoni che lo proteggono e la limitata efficienza dei meccanismi che lo riparano favorirebbero la produzione di componenti enzimatiche alterate nella catena respiratoria, esacerbando la produzione di radicali liberi ed instaurando un circolo vizioso [37].

Teoria della senescenza cellulare

La senescenza cellulare fu descritta da Hayflick nel 1956 come il processo che limita il numero di divisioni cellulari normali umane che possono avvenire in coltura [38]. Questo "limite nella capacità replicativa" si realizza dopo un caratteristico numero di divisioni cellulari (limite di Hayflick) e può verificarsi anche in risposta a diversi eventi molecolari. La senescenza replicativa è caratterizzata dalla perdita di telomeri, strutture specializzate composte da una sequenza ripetuta di DNA e posizionate all'estremità di

ogni cromosoma [39]. Con ogni divisione cellulare, una piccola quantità di DNA è necessariamente persa, portando a telomeri sempre più corti, alterata struttura telomerica ed eventuale senescenza replicativa [39]. Si è visto che l'attivazione di enzimi telomerasici rigenera i telomeri, previene la senescenza ed immortalizza colture di cellule primarie [40]. Tutte le cellule neoplastiche attivano la telomerasi o una via alternativa di allungamento del telomero, al fine di evitare la senescenza replicativa [41, 42]. La necessità di telomerasi per l'immortalità cellulare, associata all'osservazione che i telomeri si accorciano con l'età, ha portato ad ipotizzare che la lunghezza del telomero regoli la durata di vita della cellula replicativa in vivo, e contribuisca all'invecchiamento.

Questo ha dato fondamento alla *telomere clock hypothesis*, secondo la quale la disattivazione della telomerasi avrebbe il ruolo di proteggere dal cancro nella prima parte della vita adulta, favorendo l'invecchiamento della cellula [43].

Teoria immunologica

L'invecchiamento del sistema immune o "immunosenescenza" è una conseguenza del logoramento immunitario dovuto al sovraccarico antigenico cronico e gioca un ruolo fondamentale nel processo di invecchiamento [44]. Tale processo non prevede un fallimento del sistema immunitario, bensì un suo rimodellamento, dove alcune funzioni sono preservate e altre amplificate [45]. Alcuni parametri, come il numero e l'attività dei linfociti Natural Killer, sono preservati nei centenari [46]. Per quanto riguarda i cambiamenti associati all'immunosenescenza, si assiste invece ad una diminuzione dei linfociti B, ad un importante decremento dei linfociti T naïve (cellule vergini CD95-) e alla sostituzione di queste cellule da parte di "megacloni" di linfociti T CD28-, resistenti all'apoptosi [47, 48]. Questi linfociti sono cellule in fase di senescenza replicativa, caratterizzate da un accorciamento dei telomeri e da una diminuita capacità proliferativa. La loro espansione clonale sembrerebbe dovuta ad un persistente stimolo antigenico virale [44, 49]. La continua esposizione ad un carico antigenico cronico porta paradossalmente ad una sempre meno efficiente risposta agli antigeni, a cui segue un'amplificazione della risposta infiammatoria con produzione di fattori pro-infiammatori. Nei centenari, numerosi studi hanno confermato la presenza di un

aumento delle citochine infiammatorie, come l'interleuchina-1, l'interleuchina-6 e il fattore di necrosi tumorale- α [50]. Questo rappresenta un paradosso, dal momento che livelli estremamente elevati di interleuchina-6 sono stati riscontrati in centenari in buona salute, pur sapendo che questa citochina proinfiammatoria viene considerata uno dei più potenti predittori di morbilità e mortalità negli anziani [25]. Negli stessi soggetti appaiono aumentati anche i livelli di lipoproteina a [51] e di proteina C reattiva, entrambi predittori di rischio cardiovascolare. Un ulteriore paradosso osservato nei centenari è costituito dallo spiccato stato pro-coagulatorio espresso in assenza di segni clinici di trombosi [52]. Questo stato proinfiammatorio cronico di basso grado è stato denominato "*inflammaging*". Esso predispone allo sviluppo di patologie di natura infiammatoria legate all'invecchiamento, come le malattie cardiovascolari, l'aterosclerosi, la demenza di Alzheimer, l'artrosi e le artriti, la sarcopenia e il diabete di tipo 2 [53, 54]. Se da un lato l'infiammazione appare come uno dei maggiori determinanti nello sviluppo di patologie associate ad elevata mortalità nell'anziano, dall'altro i centenari, modello per eccellenza dell'invecchiamento in buona salute, presentano uno stato di infiammazione basale cronico [5]. Alla luce di questi dati contrastanti, l'ipotesi è che l'*healthy ageing* e la longevità siano il risultato della presenza di un efficiente sistema antiinfiammatorio e una buona capacità di rispondere agli stimoli infiammatori [55].

Teoria neuroendocrina

Secondo questa teoria, l'invecchiamento è la conseguenza di alcuni cambiamenti delle funzioni nervose ed endocrine riguardanti i neuroni e gli ormoni coinvolti nella riproduzione, nella crescita, nello sviluppo e nella sopravvivenza. La durata della vita è quindi regolata da fasi che si susseguono e governata da segnali nervosi ed endocrini [56]. Di fondamentale importanza nella teoria neuroendocrina è la funzione svolta dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Una delle maggiori funzioni dell'asse HPA è coordinare gli aggiustamenti fisiologici necessari a preservare e mantenere l'omeostasi interna, adattandosi ai continui cambiamenti ambientali. Durante la vita, l'esposizione cronica a stress di natura fisica, biologica o emozionale, può esaurire o danneggiare la capacità di adattamento e portare alle cosiddette "malattie da adattamento" e a morte

[56].

In conclusione, le teorie proposte sembrano supportare l'ipotesi che l'invecchiamento sia un processo multifattoriale e complesso in cui ricoprono un ruolo importante sia fattori genetici che ambientali.

INVECCHIAMENTO E SISTEMA ENDOCRINO

Il processo di invecchiamento è caratterizzato dalla compromissione di una serie di parametri, conseguenza dei cambiamenti nella composizione e nelle funzionalità dell'organismo [57].

Alterazioni complesse nei quadri ormonali deputati al mantenimento dell'omeostasi e alla regolazione della riproduzione, del metabolismo, della nutrizione e della crescita, potrebbero essere alla base dell'adattamento al progressivo invecchiamento. La secrezione degli ormoni diminuisce all'interno della maggior parte degli assi ormonali, il cui impatto è amplificato da una riduzione della sensibilità dei tessuti all'azione ormonale, e i normali ritmi circadiani sono persi. Gli assi endocrini manifestano questi cambiamenti con una perdita della funzionalità clinicamente identificabile, come l'andropausa o la menopausa, la somatopausa o l'adrenopausa. Le conseguenze cliniche di questi cambiamenti sono molteplici e comprendono la riduzione della massa ossea, della massa muscolare scheletrica e della forza, causano un aumento del tessuto adiposo e hanno effetto sul sistema immunitario. Numerosi studi sono stati condotti per valutare i benefici della supplementazione ormonale negli anziani, ma l'efficacia di questi interventi rimane ancora da chiarire. Sembra confermata l'ipotesi secondo cui l'adattamento del sistema endocrino durante la vita possa influenzare la salute durante il processo di invecchiamento [58]. Ad esempio, la riduzione dell'apporto nutrizionale è risultata essere associata ad un aumento della durata della vita e ad una ridotta incidenza di patologie quali il diabete e le malattie cardiovascolari [59].

Poiché l'invecchiamento è il fattore che maggiormente influisce sulla funzione dell'ipotalamo, il regolatore dell'omeostasi per eccellenza, la gran parte delle morbidità negli anziani potrebbe essere attribuita agli squilibri ormonali.

ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-TIROIDE

Nell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide, ogni tappa della sintesi e della secrezione degli ormoni tiroidei è stimolata dalla tireotropina (TSH), prodotta dalle cellule tireotrope dell'ipofisi anteriore, in un modo pulsatile e con ritmo circadiano, a sua volta sottoposta all'azione stimolatoria dell'ormone ipotalamico di rilascio della tireotropina (TRH) [60]. La secrezione di TSH è inibita dall'incremento degli ormoni tiroidei ed aumenta in seguito a riduzioni della triiodotironina (T3) e della tiroxina (T4). Il ruolo fisiologico del TRH è quello di stabilire il punto di regolazione da parte degli ormoni tiroidei sulla secrezione di TSH. Altri meccanismi che mediano l'effetto dell'ormone tiroideo sulla secrezione di TSH sono rappresentati da una diminuita secrezione di TRH dall'ipotalamo e una riduzione del numero di recettori del TRH sulle cellule ipofisarie. Inoltre, l'azione del TRH può essere inibita dalla somatostatina, dalla dopamina e da elevate concentrazioni di glucocorticoidi [60]. In conclusione, l'asse tiroideo rappresenta un classico esempio di "ansa endocrina a feedback": il TRH ipotalamico stimola la produzione ipofisaria di TSH che, a sua volta, stimola la sintesi e la secrezione di ormone tiroideo; gli ormoni tiroidei, con meccanismo a feedback negativo, inibiscono la produzione di TRH e TSH [61] (Figura 6).

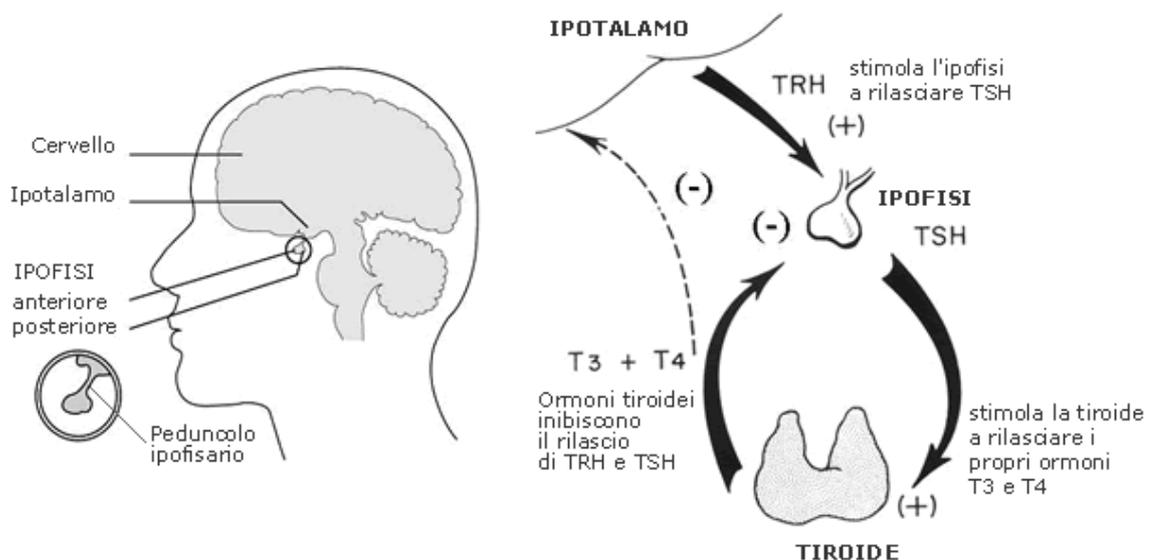


Figura 6. Asse ipotalamo-ipofisi-tiroide.

Le deiodinasi sono enzimi che convertono la T4 in T3. La deiodinazione [62] è la principale via del metabolismo dell'ormone tiroideo, infatti la produzione giornaliera di T3 corrisponde al 20% della sua produzione totale, mentre il restante 80% deriva dalla deiodinazione nei tessuti periferici. La deiodinazione è operata da una serie di enzimi denominati Iodotironine Deiodinasi di cui ne sono stati individuati tre tipi:

1. Deiodinasi I, importante per la produzione periferica di T3 dalla T4, è presente nel fegato, nel rene, nel reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche e nella membrana plasmatica delle cellule renali e di quelle tiroidee [63];
2. Deiodinasi II è presente soprattutto a livello del cervello, dell'ipofisi, del tessuto adiposo bruno e della placenta. Nell'uomo si ritrova anche nella tiroide, nel cuore e nel muscolo scheletrico; questo enzima ha esclusivamente attività deiodinasi dell'anello esterno ed è quindi importante per la produzione intracellulare della T3 in questi tessuti. Inoltre mantiene un livello costante di T3 nel sistema nervoso centrale [63];
3. Deiodinasi III è presente nel cervello, nella pelle, nella placenta ed in alcuni tessuti fetali; ha soltanto attività deiodinasi dell'anello interno e permette la produzione T3 reverse (rT3) che è una forma inattiva di T3, a partire dalla T4 [64].

ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-TIROIDE E INVECCHIAMENTO

Anche se l'argomento è stato a lungo dibattuto negli ultimi anni, si è giunti alla conclusione che le concentrazioni sieriche di TSH, della frazione libera di T4 (FT4) e della frazione libera di T3 (FT3) subiscono sostanziali cambiamenti durante l'invecchiamento [65-72]. In particolare, è stato osservato come i livelli sierici di TSH aumentino con l'aumentare dell'età sia nella popolazione maschile che in quella femminile [73]. Lo stesso studio ha mostrato un aumento del TSH associato ad una diminuzione della frazione T4 dopo i 20 anni d'età [73]. Invece, uno studio più recente ha osservato, per la prima volta, un aumento dei livelli di TSH senza una significativa variazione della concentrazione di FT4 in soggetti anziani [74]. Dopo un periodo di follow-up di 13 anni, è stato riscontrato un aumento dei livelli nel siero di TSH del 13%, associato ad un aumento del 1.7% della frazione FT4 e una riduzione del 13%

della frazione T3 totale [75]. Pertanto, i dati in nostro possesso ad oggi sembrano confermare che le concentrazioni sieriche di TSH aumentino leggermente con l'aumentare dell'età, ma i dati riguardanti la frazione FT4 sono in conflitto.

Meno numerosi sono gli studi che indagano l'effetto delle patologie tiroidee sulla mortalità e sulla longevità nella popolazione anziana. È importante sottolineare che tali risultati differiscono da quelli ottenuti nelle popolazioni di soggetti giovani. Lo studio Leiden 85+ ha mostrato che concentrazioni più alte di TSH e più basse di FT4 sono associate ad un beneficio di sopravvivenza [76]. In questo studio, i partecipanti con bassi livelli di TSH alla baseline avevano il tasso di mortalità più alto, invece i soggetti con alti livelli di TSH e bassi livelli di FT4 ce l'avevano più basso. Gli autori hanno avanzato l'ipotesi che una bassa attività tiroidea possa indurre una bassa attività metabolica che, di conseguenza, può causare restrizione calorica. Bassa attività metabolica e restrizione calorica sono associate ad un miglioramento della sopravvivenza in numerosi modelli animali [77-79].

Anche i centenari, soggetti estremamente longevi, hanno concentrazioni sieriche di TSH significativamente maggiori rispetto ad un gruppo di soggetti controllo di 30 anni più giovani. La frazione sierica FT4 è stato confermato essere associata ad una migliore sopravvivenza anche in popolazioni estremamente anziane [80]. Negli studi su popolazioni di centenari è stato identificato un fenotipo ereditabile caratterizzato da aumentati livelli sierici di TSH che sembrano essere associati a longevità nell'uomo. In particolare, è stato identificato un polimorfismo genico a singolo nucleotide nel gene del recettore del TSH associato ad elevati livelli sierici di TSH, probabilmente responsabile della riduzione della funzione tiroidea e coinvolto nel processo di invecchiamento in buona salute [81].

ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-TIROIDE E NUTRIZIONE

Sempre maggiori evidenze indicano la presenza di reciproche influenze tra alimentazione e sistema endocrino. Il cibo esercita, infatti, potenti effetti, sia immediati che nel lungo termine, sulla produzione e sulla concentrazione ematica degli ormoni e, contemporaneamente, molte azioni fisiologiche degli alimenti si esplicano attraverso

l'intervento ormonale [82]. Anche la funzionalità tiroidea è sensibile alle alterazioni acute e croniche della qualità e quantità dei nutrienti ingeriti. Gli ormoni tiroidei svolgono importanti funzioni collegate al mantenimento dell'omeostasi energetica. La tiroide, infatti, occupa un ruolo centrale nella regolazione del metabolismo energetico, della termogenesi, del metabolismo glucidico e lipidico ed è coinvolta anche nel controllo dell'assunzione di cibo.

L'azione degli ormoni tiroidei sul metabolismo glucidico coinvolge vari aspetti. La FT3 aumenta la velocità di assorbimento gastrointestinale dei carboidrati, l'entità della glicolisi e della gluconeogenesi, nonché la secrezione di insulina. I carboidrati svolgono un ruolo importante nel metabolismo degli ormoni tiroidei. Numerosi studi hanno dimostrato che i carboidrati sono in grado di modulare in maniera significativa le reazioni di desiodazione della T4 a T3. Infatti, nell'uomo, i livelli sierici di T3 sono direttamente associati all'apporto di carboidrati. Diversi studi hanno anche rivelato che nell'uomo la generazione di T3 da T4 è diminuita nel digiuno e restaurata nella rialimentazione [83].

Gli ormoni tiroidei hanno molteplici effetti sulla regolazione della sintesi, assorbimento e metabolismo dei lipidi [84]. Essi, infatti, agiscono sull'idrossimetilglutaril-CoA reduttasi, l'enzima chiave della biosintesi del colesterolo [84]. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che i lipidi sierici sono associati ai livelli di TSH [85, 86].

L'aumento del consumo di grassi nelle diete occidentali, uno dei principali fattori responsabili dell'aumento del peso corporeo, è stato messo in relazione con specifiche alterazioni dell'asse tiroideo [85]. È noto che i livelli di TSH sono correlati con i lipidi circolanti [87]. Precedenti evidenze indicano che i grassi ossidati aumentano la T4 [88]. Come riportato da altri studi [89], la sintesi degli ormoni tiroidei e di TSH può essere influenzata dal tessuto adiposo e dall'apporto calorico della dieta.

Negli ultimi anni c'è stato un crescente interesse verso il rapporto tra funzione tiroidea e peso corporeo. Mentre è noto che l'ipertiroidismo porta alla perdita di peso e che l'ipotiroidismo è associato a incremento ponderale con una distribuzione di tessuto adiposo generalizzata, i cambiamenti della funzionalità tiroidea nell'obesità sono discussi in modo controverso. L'obesità, infatti, è legata a molteplici alterazioni

endocrine quali resistenza insulinica, disfunzioni gonadiche, alterazioni dell'asse surrenalico e dell'asse somatotropo [90]. Meno noti ma sicuramente rilevanti sono i rapporti tra obesità e disfunzioni tiroidee [91].

Nei soggetti obesi si riscontrano alterazioni del quadro tiroideo, in particolare, sia aumenti del TSH [92], che della forma ormonale metabolicamente attiva, la T3 [93]. Non si assiste a cambiamenti della T4 libera e totale, i cui livelli sono paragonabili nei soggetti obesi e in normopeso. Inoltre, il digiuno e la sovralimentazione non cambiano le concentrazioni di T4 sierico, dimostrando la sua indipendenza dal peso corporeo [94]. Nell'obesità è noto che il TSH e il *Body Mass Index* (BMI) sono positivamente correlati [95]. Infatti, molti studi nei bambini, negli adolescenti e negli adulti hanno dimostrato che i livelli di TSH sono lievemente aumentati negli obesi, rispetto ai soggetti normopeso [94]. Gli elevati livelli di TSH nell'obesità potrebbero essere dovuti a una disfunzione neuroendocrina che determina un'anormale secrezione. In particolare la leptina, ormone prodotto dagli adipociti, è stata dimostrata alterare l'asse ipotalamo-ipofisario [96]. Questi risultati suggeriscono che i livelli di TSH possono rappresentare un marcatore di alterato bilancio energetico. Nei pazienti obesi è stata riscontrata un'associazione positiva tra il rapporto FT3/FT4 (indice di deiodinazione), circonferenza vita e BMI [97], suggerendo un'alta conversione di T4 in T3 per aumento dell'attività desiodasica, come meccanismo compensatorio dell'aumento del tessuto adiposo. Ciò porta ad un aumento del metabolismo basale e, di conseguenza, un miglioramento del dispendio energetico. In definitiva, nei pazienti obesi si riscontra sia un aumento dei livelli di TSH che di FT3. Se l'inappropriato aumento di TSH è causato da un ridotto effetto inibitorio della leptina, l'aumento di FT3 è considerato un meccanismo adattativo [98] per ridurre la disponibilità di energia per la conversione in grasso. In linea con questa teoria, gli elevati livelli di TSH nel soggetto obeso si normalizzano dopo una consistente perdita di peso. Inoltre, la terapia con tiroxina nei pazienti obesi con livelli moderatamente elevati di TSH non modifica il loro peso o il profilo lipidico. È stato osservato come la terapia con T3 e T4, anche a dosi fisiologiche, negli obesi in dietoterapia, determina ipertiroidismo subclinico, pertanto questa terapia deve essere scoraggiata negli obesi.

ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-GONADI

Il testosterone (T) è il principale ormone sessuale maschile prodotto nell'uomo. La secrezione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine regola la secrezione ipofisaria di ormone luteinizzante (LH), che a sua volta stimola la produzione di T nei testicoli (Figura 7A). Il 30-45% della frazione circolante di T è legato alle globuline leganti gli ormoni sessuali (SHBG), il 50-68% è presente legato con minore affinità all'albumina e lo 0,5-3% rappresenta la frazione libera (Figura 7B) [99].

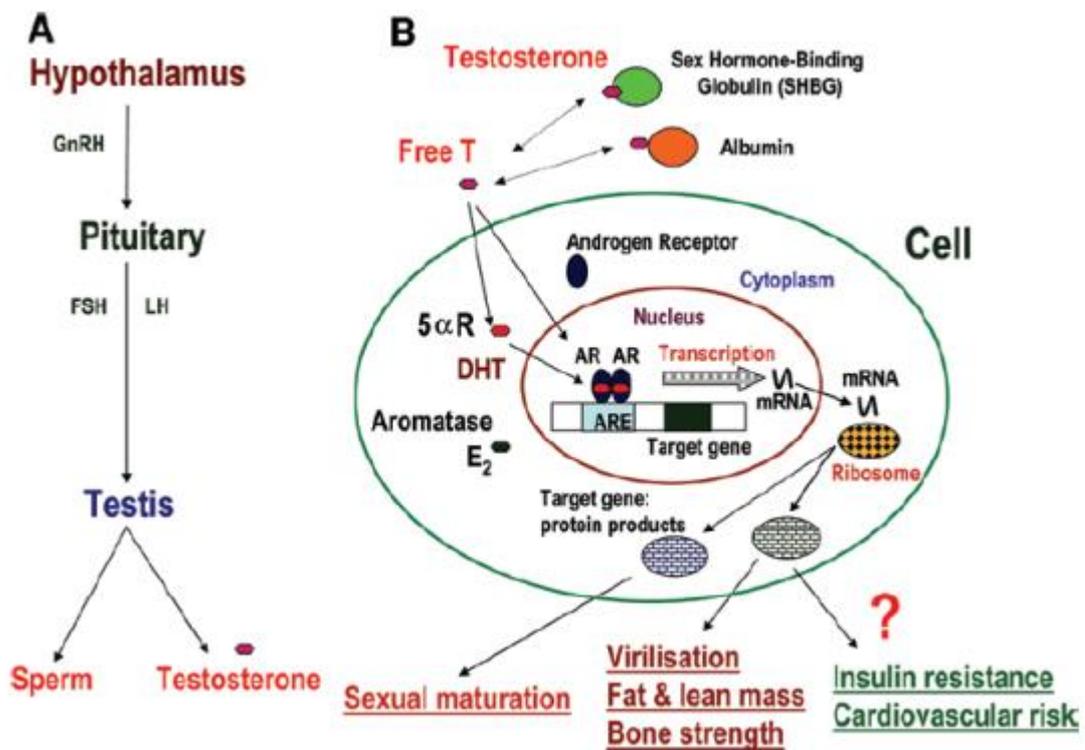


Figura 7. Produzione, circolazione e azione del testosterone (T) nell'uomo.
(Yeap et al. 2012 *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*)

Si ipotizza che le frazioni di T libero e T biodisponibile (ovvero la combinazione di T legato all'albumina e T libero) siano quelle biologicamente più attive, sebbene questo concetto sia tuttora molto dibattuto [99, 100]. Il T è convertito nel citoplasma dall'enzima intracellulare 5 α -reduttasi in diidrotestosterone (DHT). Sia il T sia il DHT si legano al recettore degli androgeni (AR), un fattore di trascrizione nucleare che regola l'espressione di geni target androgeno-responsivi [101]. Le azioni del T e del

DHT mediate dall'AR ricoprono un ruolo fondamentale nello sviluppo sessuale maschile [102]. Inoltre, il T può essere anche convertito in estradiolo (E2) dall'enzima aromatasi nel tessuto lipidico, nel muscolo scheletrico, nell'endotelio, nel cervello e in altri tessuti [103]. Pertanto, le azioni del T possono essere mediate non solo dal DHT che si lega ad alta affinità all'AR, ma anche dall'E2 che agisce direttamente sul recettore degli estrogeni [104, 105].

L'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi regola i cambiamenti fisiologici durante la pubertà, in particolare la maturazione sessuale. Nell'uomo adulto, il T determina la virilità e la massa muscolare [106]. Uomini affetti da ipogonadismo presentano sintomi sistemici tra cui una riduzione dell'energia e della libido, una riduzione della massa magra e un aumento della massa grassa, e sono maggiormente predisposti allo sviluppo di osteoporosi [106-108].

Alcuni studi hanno mostrato che la terapia con T sembra offrire benefici. In particolare, negli uomini in terapia con T è stato registrato un aumento della massa magra e della forza muscolare [109-112]. Numerosi trials condotti su uomini con età ≥ 65 anni hanno confermato una riduzione della massa grassa e un aumento della densità minerale ossea [113], ma anche un aumentato desiderio sessuale [114, 115]. Inoltre, il trattamento con T sembra determinare una riduzione dei livelli di colesterolo totale [113]. Pertanto, la terapia con T in soggetti con bassi livelli determina un miglioramento della composizione corporea e dei sintomi dovuti a deficienza da androgeni, ma rimangono ancora da chiarire i benefici a lungo termine e i potenziali rischi riguardo a prostata, diabete e malattie cardiovascolari [106, 116-119]. È stato visto che, se da un lato la privazione di T riduce drasticamente la sensibilità all'insulina [120], dall'altro la supplementazione con T non ne determina un miglioramento così considerevole [121].

Questi risultati, contrastanti sotto molti aspetti, non sembrano suggerire il trattamento in uomini anziani di età uguale o superiore a 65 anni con un deficit di T età-dipendente [122]. Invece, la terapia è consigliata in uomini con ipogonadismo, che presentano sintomi compatibili con la deficienza da androgeni e bassi livelli di T [123]. Purtroppo, i dati finora pubblicati non sono sufficienti per affermare con certezza i benefici del trattamento con T. Inoltre, ad oggi, non è ancora chiaro se il livello di T

negli uomini anziani sia da considerarsi un biomarcatore o un fattore causale di una “cattiva” salute.

ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-GONADI E INVECCHIAMENTO

Dai 30 anni, i livelli di T totale diminuiscono con l'aumentare dell'età, mentre quelli delle SHBG aumentano [117, 124, 125]. Studi longitudinali mostrano un calo medio annuo dell'1-2% dei livelli di T [124-126]. Aumentando le SHBG, i livelli di T libero subiscono un calo età-correlato più ripido rispetto a quelli del T totale [124, 126-131]. Anche i livelli di E2 totale sono relativamente stabili con l'aumentare dell'età, mentre quelli di E2 libero diminuiscono [117, 127, 130, 132]. Nei soggetti più anziani i livelli di T stanno entro i limiti di normalità con stime di prevalenza di T basso nel siero (<10,4 nmol/L o <300 ng/dL) tra il 10% e il 25% [125, 130, 131]. Lo *European Male Aging Study* (EMAS) ha fornito una stima della prevalenza di ipogonadismo ad insorgenza tardiva, diagnosticato in base alla presenza di almeno tre sintomi sessuali (perdita delle erezioni mattutine, basso desiderio sessuale e disfunzione erettile), T sierico totale <11 nmol/L (320 ng/dL) e T libero <220 pmol/L (64 pg/mL) [133]. La prevalenza è risultata del 2,1% nella popolazione maschile tra 40 e 79 anni e aumenta con l'aumentare dell'età dello 0,1% da 40 a 49 anni e del 5,1% da 70 a 79 anni.

Ulteriori studi saranno necessari per comprendere l'importanza che questi cambiamenti endocrini potrebbero avere durante l'invecchiamento, e se gli interventi farmacologici o lo stile di vita possano diventare fattori positivi in questo processo [118, 119]. Infatti, rimane ancora da chiarire se sia il processo di invecchiamento o la concomitanza di stile di vita, fattori comportamentali e psicosociali, ad essere responsabili della diminuzione di T.

La fragilità è definita come un deterioramento dei sistemi multiorgano che porta a perdita della riserva fisiologica, diminuzione della capacità di far fronte agli stress e aumento del rischio di morte e di disabilità [134-136]. La prevalenza della fragilità aumenta con l'aumentare dell'età e prevenirne lo sviluppo nelle persone anziane potrebbe contribuire a preservare un buono stato di salute [134]. Di fondamentale

importanza per la valutazione della fragilità negli anziani è la presenza di sarcopenia, che consiste nella perdita di massa magra con conseguente diminuzione della funzione muscolare. Poiché il T è un ormone anabolico che promuove l'aumento della massa muscolare [109, 110], l'interesse per il suo ruolo putativo nella genesi della fragilità nell'uomo anziano è elevato [137].

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi osservazionali che sembrano confermare l'associazione tra ridotti livelli di T e aumentato rischio di fragilità nell'uomo anziano. Infatti, è stata osservata un'associazione positiva tra bassi livelli di T totale e diminuita forza muscolare in una popolazione anziana di età compresa tra 65 e 88 anni [138], così come O'Donnell et al. hanno riportato un'associazione positiva tra T e performance fisica in uomini con 55-85 anni [139]. Uno studio ha mostrato una minor riduzione della massa magra in uomini anziani con livelli di T totale più elevati [140]. In una popolazione di uomini con età ≥ 65 anni, Cawthon et al. hanno osservato una maggiore probabilità di sviluppare fragilità in uomini con una più bassa biodisponibilità di T [141], e sembra che maggiore sia la riduzione di T, maggiore sia l'aggravarsi dello stato fragile di questi soggetti anziani [142].

ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-GONADI E NUTRIZIONE

Se da un lato il BMI e la circonferenza vita sono inversamente correlati ai livelli di T totale e T libero, dall'altro risultano direttamente correlati ai livelli di E2 totale [130, 132]. Un BMI elevato, la presenza di adiposità centrale e uno stato di salute cagionevole sono associati a ridotti livelli di T [130-132, 143]. Al contrario, la bassa assunzione di alcol e un'elevata attività fisica sembrano essere associati ad elevati livelli di T [132, 144, 145]. Inoltre, si è posta la questione se tutti questi fattori potenzialmente reversibili possano essere modificati al fine di migliorare il declino dei livelli di T che avviene durante l'invecchiamento [118]. In uno studio condotto su una popolazione maschile con un'età uguale o superiore a 65 anni, una maggiore aderenza ad uno stile di vita sano che prevede l'assenza di fumo, una costante attività fisica e un'alimentazione sana, così come la riduzione dell'assunzione di alcol e un valore di

BMI ottimale, è stata associata a livelli maggiori di T totale dopo un periodo di follow-up di 5,7 anni [146].

L'aumento del BMI, l'eccesso di grasso addominale e l'obesità sono legati alla presenza di ridotti livelli di T totale e T libero nell'uomo adulto [131, 132, 143, 147, 148]. Il paziente obeso sviluppa insulino-resistenza che induce uno stato di iperinsulinemia, a cui sono associati bassi livelli di SHBG [149, 150]. La riduzione di T libero, così come di T totale, in relazione ad un'aumentata obesità indica un'alterata funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi oltre che una riduzione della capacità delle SHBG di legare il T [151]. Da un lato la marcata obesità causa una riduzione dell'attività di LH, mentre dall'altro l'insulino-resistenza riduce la secrezione testicolare di T [151-154] (Figura 8), il quale agisce preservando la massa magra e riducendo l'accumulo di grasso corporeo, contribuendo a migliorare la sensibilità all'insulina [110, 113, 140, 155] (Figura 8). La compromessa produzione di T negli uomini con ipogonadismo riduce l'insulino-sensibilità prima ancora che vengano introdotti cambiamenti nella composizione corporea [156] (Figura 8). Pertanto, l'associazione tra obesità/insulino-resistenza e bassi livelli di T è molto complessa e soprattutto bidirezionale, poiché i bassi livelli di T circolante rappresentano una conseguenza dell'obesità e, al tempo stesso, una delle cause che determina l'insulino-resistenza stessa (Figura 8).

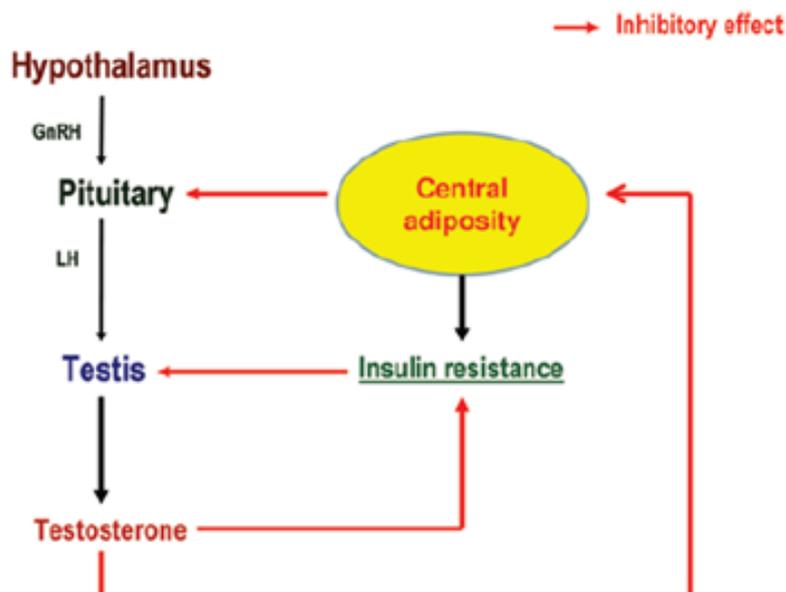


Figura 8. Associazione bidirezionale del testosterone con obesità e insulino-resistenza. (Yeap et al. 2012 *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*)

I livelli di T totale e di SHBG sembrano essere inversamente correlati ad una ridotta glicemia a digiuno indipendentemente dal BMI e dalla circonferenza vita in una popolazione maschile di età compresa tra 45 e 84 anni [157]. Precedentemente, Muller et al. avevano riportato un'associazione tra gli alti livelli di T totale e l'insulino-sensibilità e quindi una ridotta probabilità di sviluppare sindrome metabolica [158]. Invece, bassi livelli di T totale sono stati associati ad insulino-resistenza indipendentemente dall'età, dal BMI, dalla circonferenza vita e dai livelli dei lipidi [159].

VITAMINA D

La vitamina D esiste sotto forma di vitamina D₂ (ergocalciferolo), ottenuta dall'irradiazione dell'ergosterolo contenuto in lieviti e vegetali, e vitamina D₃ (colecalfiferolo), sintetizzata principalmente nella cute. Sia la vitamina D₂ che la vitamina D₃ sono contenute in alcuni alimenti. Sebbene il colecalfiferolo sia da considerare a tutti gli effetti un ormone steroideo, è tuttavia corretto definirlo vitamina in quanto un suo scarso introito dietetico è in grado di determinare gravi condizioni cliniche [160-162].

La sorgente alimentare di vitamina D è pressoché scarsa: sono pochi i cibi che contengono vitamina D e in quantità limitate, tanto da provvedere solamente al 10% del fabbisogno totale. Alimenti ricchi di vitamina D sono gli oli di pesce (soprattutto di fegato di merluzzo, sgombro, salmone e sardina). Si ritiene sufficiente la loro assunzione 3-4 volte alla settimana per assicurarne un apporto ottimale. Quantità molto basse si trovano nei derivati del latte, nelle uova, nel succo d'arancia, nel pane e nei cereali [161, 163-165].

La vitamina D₃ è sintetizzata a livello cutaneo e contribuisce per l'80% al nostro patrimonio vitaminico [166-168]. Durante l'esposizione alla luce solare, i raggi UVB convertono il 7-deidrocolesterolo contenuto nell'epidermide in previtamina D₃, biologicamente inerte ma termolabile [161, 165, 169-174]. In seguito a cambiamenti di temperatura, essa va spontaneamente incontro a un riarrangiamento molecolare formando la vitamina D₃. Questa passa dalle cellule cutanee agli spazi extracellulari e poi in circolo, dove è veicolata dalle proteine che legano la vitamina D (DBP), alfa-globuline di origine epatica [165]. Tra i fattori che condizionano la sintesi cutanea di vitamina D, ci sono i raggi UVB [175], la latitudine, l'età [176], lo spessore e la pigmentazione della cute esposta al sole, il tempo d'irradiazione e l'uso di creme contenenti filtri solari [171]. È raccomandata un'esposizione ai raggi solari da accompagnare ad una supplementazione per soddisfare il fabbisogno di vitamina D dell'organismo [161, 177, 178].

Le vitamine D₃ e D₂ di origine alimentare sono assorbite a livello dell'intestino tenue seguendo processi analoghi a quelli cui le vitamine liposolubili sono sottoposte. La vitamina D, infatti, viene inglobata nelle micelle, entra nell'epitelio intestinale dove viene incorporata nei chilomicroni i quali entrano, a loro volta, nella circolazione linfatica. Da qui la vitamina D raggiunge il circolo venoso, dove si unisce alla vitamina D di origine cutanea (emivita plasmatica di 4-6 ore), con la quale circola legata alle DBP e alle lipoproteine. La maggior parte della vitamina D raggiunge il fegato, dove viene idrossilata per opera dell'enzima 25-alfa-idrossilasi. Invece, una minima quota si deposita nel tessuto adiposo (emivita di circa 2 mesi). Il metabolita risultante, biologicamente inerte, è la 25-idrossi vitamina D (25(OH)D) o 25-idrossicolecalciferolo [161, 175, 179]. Esso rappresenta la principale forma circolante e di deposito della vitamina D. Circa l'88% della 25(OH)D circola legata alla specifica DBP, mentre lo 0,03% è presente in forma libera e la quota restante è legata all'albumina. L'emivita della 25(OH)D è di circa 2-3 settimane; tuttavia, risulta notevolmente minore quando si riducono i livelli della specifica proteina legante. L'idrossilazione finale, necessaria per la formazione dell'ormone attivo, avviene a livello renale. La 25(OH)D-1-alfa-idrossilasi è un'ossidasi a funzione mista (simile al citocromo P450), responsabile dell'idrossilazione della 25(OH)D. L'ormone che ne risulta è la 1,25-diidrossi vitamina D (1,25(OH)₂D) o calcitriolo, che entra in circolo [165]. Il calcitriolo è circa 500-1000 volte più attivo del suo precursore. Tuttavia, la 25(OH)D è il marcatore biologico più comunemente utilizzato per stimare lo stato di vitamina D sistemica in quanto più stabile, dotato di emivita maggiore e più facilmente misurabile [164, 165, 180]. Infatti, la 25(OH)D è la forma circolante presente in maggiori quantità, ha un'emivita di circa 15 giorni, un turnover di 7 mcg/die e livelli sierici di 5-55 ng/mL. La 1,25(OH)₂D ha invece un pool plasmatico molto inferiore, un'emivita più breve (circa 5 ore), un turnover di 1 mcg/die con livelli sierici di 20-75 pg/mL. La produzione renale di 1,25(OH)₂D è strettamente regolata dai livelli plasmatici di ormone paratiroideo (PTH) e dai livelli di calcio e di fosforo: il PTH stimola l'idrossilasi renale mentre il calcio, il fosforo e lo stesso calcitriolo la inibiscono (Figura 9).

L'attività dell'enzima 25(OH)D-1-alfa-idrossilasi [161, 168]:

- è inibita in presenza di iperfosforemia, ipercalcemia e calcitriolo stesso;

- è stimolata in presenza di ipocalcemia, ipofosforemia e PTH.

Anche altri ormoni non primariamente coinvolti nel metabolismo fosfo-calcico regolano la sintesi di vitamina D attiva: alcuni ormoni ipofisari (prolattina e ormone della crescita), insulina e glucocorticoidi, estrogeni e progesterone.

L'1,25(OH)₂D:

- diminuisce la propria sintesi attraverso un feedback negativo;
- diminuisce la sintesi e la secrezione di PTH da parte delle ghiandole paratiroidi;
- aumenta l'espressione dell'enzima catabolico 25(OH)D-24-idrossilasi, promuovendo la propria inattivazione;
- aumenta l'assorbimento di calcio nell'intestino tenue, interagendo con il complesso recettore della vitamina D-recettore dell'acido retinoico X (VDR-RXR). Questo aumenta l'espressione dei canali epiteliali del calcio e della calbindina-D9k, una proteina legante il calcio;
- induce la differenziazione dei preosteoclasti in osteoclasti maturi capaci di rimuovere il calcio e il fosforo dall'osso, mantenendo i livelli necessari di calcio e fosforo nel sangue; adeguati livelli di calcio e di fosforo promuovono la mineralizzazione dello scheletro.

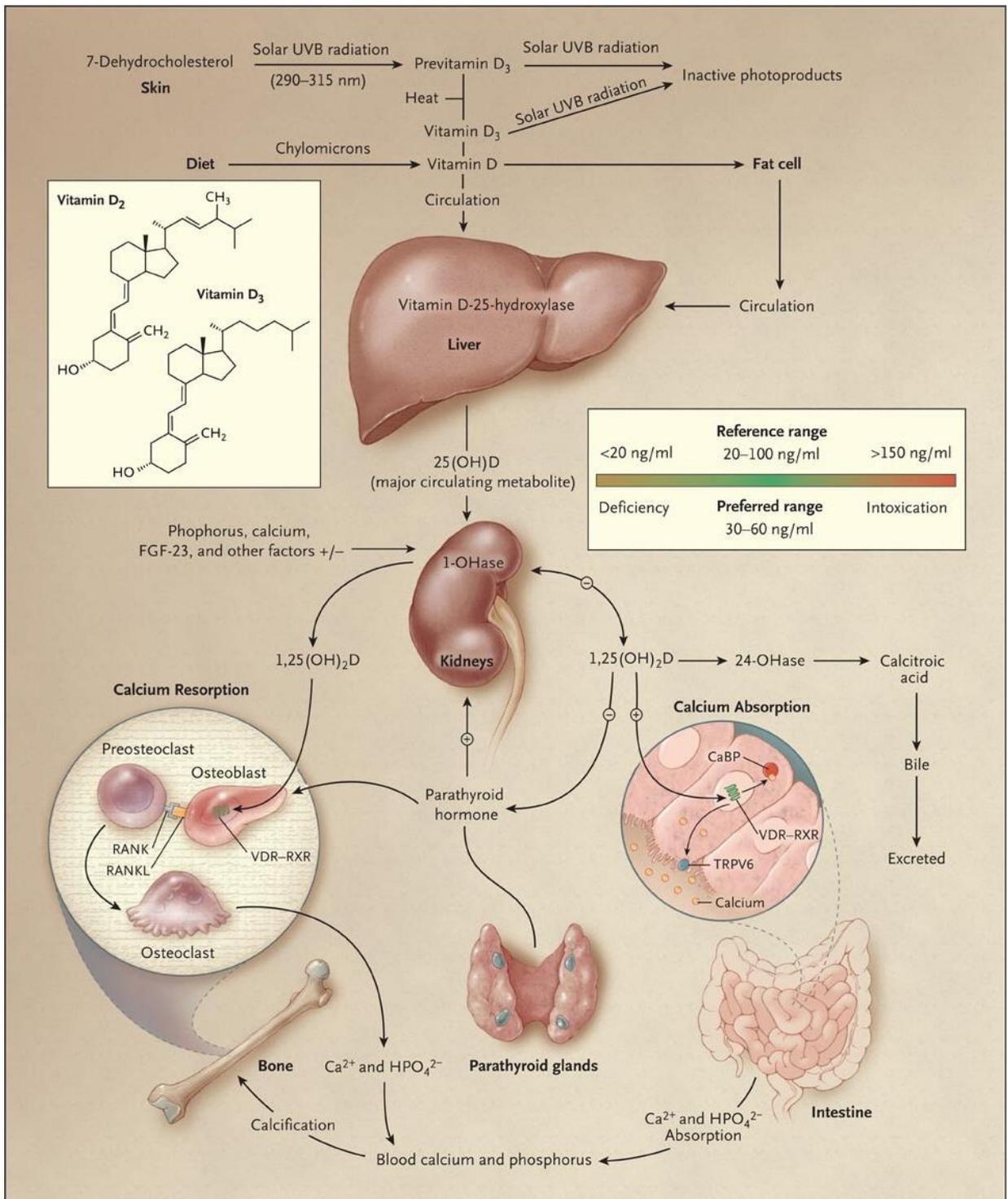


Figura 9. Sintesi e metabolismo della Vitamina D.
(Holick M.F. et al. 2007 The New England Journal of Medicine)

La vitamina D esplica la sua funzione in seguito al legame con il suo recettore, il *Vitamin D Receptor* (VDR). Si definiscono “azioni classiche” quelle che svolge a livello dei tessuti direttamente coinvolti nell’omeostasi del calcio (osso, intestino e rene). Al contrario, sono definite “azioni non classiche” tutti i restanti effetti, giustificati dalla presenza del VDR e della 25(OH)D-1-alfa-idrossilasi in molti tessuti dell’organismo.

Azioni classiche

La presenza di vitamina D è condizione necessaria perché il calcio e il fosforo assunti con l’alimentazione siano adeguatamente assorbiti a livello intestinale [181]. Infatti, in assenza di vitamina D, solo il 15% del calcio e il 60% del fosforo introdotti con la dieta sono effettivamente assorbiti. Tali percentuali salgono rispettivamente al 30-40% e all’80% quando i livelli di vitamina D circolante sono adeguati [164, 182, 183]. In particolare, se i livelli di 25(OH)D sono uguali o inferiori a 30 ng/ml, si verifica una significativa riduzione dell’assorbimento intestinale di calcio [183] con conseguente incremento della sintesi di PTH da parte delle cellule C delle paratiroidi [184-186]. Il PTH aumenta il riassorbimento tubulare di calcio e stimola i reni a produrre 1,25(OH)₂D [164, 187]. Inoltre, attiva gli osteoblasti, stimolando la trasformazione dei preosteoclasti in osteoclasti maturi [165]. Gli osteoclasti degradano la matrice mineralizzata del collagene dell’osso, causando osteopenia e osteoporosi, aumentando il rischio di fratture [184, 188-197]. Se la carenza di vitamina D progredisce, le ghiandole paratiroidi sono enormemente stimolate, causando un iperparatiroidismo secondario [184-186, 193, 198]. Il PTH aumenta il metabolismo della 25(OH)D in 1,25(OH)₂D e causa fosfaturia. L’importanza della vitamina D nel mantenimento della salute dell’osso [171] è dimostrata dalla presenza del VDR a livello osseo [199, 200]. Inoltre, l’ipovitaminosi D sembra causare atrofia muscolare e perdita di fibre muscolari di tipo II [201, 202], determinando quindi debolezza muscolare [161, 165, 189, 193, 203, 204]. Ciò potrebbe dipendere anche dall’ipofosforemia dovuta all’incremento di PTH [205-207].

Azioni non classiche

Elevati livelli di vitamina D sembrano essere protettivi verso le malattie cardiovascolari [208, 209]. In alcuni studi, la concentrazione di vitamina D è associata ai livelli di pressione arteriosa in soggetti normotesi e ipertesi [210] e trials clinici hanno mostrato una riduzione della pressione arteriosa in seguito a supplementazione con vitamina D in pazienti ipertesi e anziani [211, 212]. Inoltre, la vitamina D regola la contrattilità cellulare modulando il flusso di calcio all'interno delle cellule miocardiche [209, 213].

Ridotti livelli di vitamina D sono stati associati ad un aumentato rischio di sindrome metabolica e diabete mellito di tipo 2 (DM2) [214-216]. Uno studio longitudinale ha mostrato una correlazione inversa tra i livelli sierici di 25(OH)D e l'incidenza di DM2 e insulino-resistenza [217]. Trattamenti prolungati con vitamina D in pazienti affetti da osteomalacia sembrano incrementare la secrezione di insulina e potenziare la tolleranza glucidica [218, 219]. Inoltre, soggetti con ipovitaminosi D presentano aumentati livelli di proteina C-reattiva, fibrinogeno ed emoglobina glicata rispetto ai controlli [220]. Pertanto, somministrando vitamina D è possibile ridurre i livelli di infiammazione sistemica [221].

Interessante è il legame tra vitamina D e cancro. Numerosi studi dimostrano che la 1,25(OH)₂D regola l'espressione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare [222], inducendo la differenziazione cellulare, inibendo la proliferazione e attivando l'apoptosi [193].

Il deficit di vitamina D è stato inoltre correlato ad un aumentato rischio di sviluppare malattia di Alzheimer [223] e declino cognitivo [224], suggerendo un suo probabile effetto neuroprotettivo.

Recentemente, è stato proposto un ruolo della vitamina D nel ritardare i processi che favoriscono l'invecchiamento [225], avvalorato dal riscontro di una correlazione positiva tra i livelli sierici di vitamina D e la lunghezza dei telomeri [226]. Inoltre, i livelli di vitamina D sembrano essere inversamente correlati con diverse malattie età-correlate e con la mortalità [227, 228].

INTERPRETAZIONE DEI LIVELLI DI VITAMINA D

Sebbene non esista ancora un'adeguata standardizzazione dei metodi di dosaggio [229], la concentrazione sierica di 25(OH)D è ritenuta il miglior indicatore clinico della riserva di vitamina D biodisponibile. Nell'ultimo decennio, diversi studi osservazionali hanno documentato una relazione tra i livelli di 25(OH)D e numerosi parametri: valori di densità minerale ossea [230, 231], propensione alle cadute, incidenza di fratture, eventi cardio-vascolari, neoplasie, sindromi depressive, diabete, sclerosi multipla e numerose altre condizioni morbose. La relazione tra livelli di 25(OH)D e rischio relativo per alcune di queste condizioni sembrerebbe indicare che le concentrazioni ottimali si attestino intorno a 75-100 nmol/l (o 30-45 ng/ml) [231]. Diversi autori hanno identificato il valore soglia di un adeguato stato vitaminico D con una concentrazione sierica di 25(OH)D di 32 ng/ml. Visto, inoltre, che l'espressione del VDR si riduce con l'avanzare dell'età in tutti i tessuti [232] e il meccanismo di regolazione renale della produzione di 1,25(OH)₂D in risposta al PTH sembra attenuarsi con l'invecchiamento [233, 234], si può ritenere che negli anziani i livelli ottimali di 25(OH)D debbano essere leggermente superiori a quelli identificati per i soggetti giovani.

In conclusione, considerando che:

- a) i livelli sierici di 25(OH)D auspicabili aumentano verosimilmente con l'età [235],
 - b) in Italia l'apporto di calcio è in genere assai modesto [235-237],
 - c) il rischio di intossicazione da vitamina D è piuttosto improbabile
- sembra ragionevole stabilire la soglia del deficit di 25(OH)D a 75 nmol/l (30 ng/ml).

Sono quindi accettabili i range suggeriti da Holick [161] (Tabella 1):

	nmol/l	ng/ml
Carenza	<50	<20
Insufficienza	50-75	20-30
Eccesso	>250	>100
Intossicazione	>375	>150

Tabella 1. Interpretazione dei livelli sierici di 25(OH)D.

Nella Tabella 1 è considerata carenza il deficit marcato e insufficienza il deficit sfumato di 25(OH)D, mentre concentrazioni superiori a 30 ng/ml (75 nmol/l) possono essere considerate ottimali [238]. Tuttavia, occorre tenere in considerazione che secondo alcuni autori livelli sierici superiori a 20 ng/ml (50 nmol/l) sembrano essere associati ad una riduzione del turnover osseo e del rischio di frattura [239, 240] e potrebbero quindi essere considerati ottimali.

VITAMINA D E INVECCHIAMENTO

Circa un miliardo di persone nel mondo presentano un grave o lieve deficit di vitamina D [161, 193, 198]. La carenza di vitamina D è particolarmente frequente anche in Italia, soprattutto negli anziani e durante i mesi invernali [241-248]. La carenza è tanto comune e di tale entità che l'86% delle donne italiane con età > 70 anni presenta livelli di 25(OH)D inferiori a 10 ng/ml dopo i mesi invernali [236]. Questo fatto è più evidente nei soggetti istituzionalizzati o con patologie concomitanti [247, 249]. L'esposizione al sole si riduce con l'avanzare dell'età, in rapporto all'isolamento sociale e all'immobilità [250]. La ridotta sintesi cutanea di colecalciferolo nell'anziano avviene anche a causa dei ridotti livelli di 7-deidrocolesterolo [192, 193]. Inoltre, con l'avanzare dell'età si verifica un incremento della massa grassa, con minor biodisponibilità di 25(OH)D che, per la sua liposolubilità, tende a legarsi al tessuto adiposo [251]. Esiste una relazione inversa tra BMI e livelli di 25(OH)D [192, 193]. Nell'anziano è molto frequente l'insufficienza renale cronica. Questa comporta una riduzione dell'attività dell'enzima 1-alfa-idrossilasi e quindi una ridotta conversione della 25(OH)D nella forma attiva [187, 252-254]. Infine, è stato dimostrato che la variabilità del gene del VDR gioca un ruolo importante nell'invecchiamento di successo e nella longevità [29].

STATO NUTRIZIONALE NEGLI ANZIANI

È universalmente riconosciuto che l'alimentazione è in grado di influenzare profondamente lo stato di salute e che l'adeguatezza della dieta, in tutte le fasi della vita, costituisce il prerequisito essenziale per il mantenimento di un buono stato di salute. Esiste, inoltre, un largo consenso riguardo all'esistenza di una correlazione tra alimentazione e rischio di malattie quali le patologie cardiovascolari, alcune forme di tumori e l'obesità. Da queste considerazioni deriva l'importanza di avere a disposizione strumenti idonei per la valutazione dello stato di nutrizione e della dieta.

Con il progressivo invecchiamento della popolazione, è evidente come la malnutrizione calorico-proteica negli anziani sia un problema sempre più diffuso [255]. La valutazione dello stato nutrizionale e il conseguente trattamento della malnutrizione diventano, quindi, interventi indispensabili al fine di tentare di minimizzare il rischio di malattie o complicanze associate all'avanzare dell'età. La prevalenza della malnutrizione calorico-proteica sembra addirittura aumentare in funzione dell'età in entrambi i sessi: tra i pazienti ospedalizzati essa risulta molto variabile, con valori che oscillano tra il 30 e il 60% dei casi, nelle strutture di lungo-degenza o nelle case di riposo sino all'85% [256]. L'eterogeneità dei dati può essere attribuita alla molteplicità dei quadri clinici e degli stati evolutivi di malnutrizione, alla disomogeneità delle casistiche, all'eterogeneità di sensibilità, specificità e di potere predittivo degli indici di valutazione nutrizionale utilizzati.

L'accurata valutazione dello stato nutrizionale richiede l'utilizzo di molteplici metodologie e indicatori diagnostici. Sfortunatamente, preso singolarmente, nessuno di questi indicatori possiede i requisiti idealmente richiesti. È quindi necessario eseguire una serie di specifici test e rilevazioni così da raccogliere più informazioni possibili per fare diagnosi di malnutrizione.

La diagnosi di malnutrizione deve essere posta già in fase preclinica: è sempre troppo tardivo il riconoscimento dei segni clinici manifesti. Quindi, è necessario valorizzare gli indici precoci di malnutrizione, tra cui modificazioni recenti del peso corporeo, alterazioni dell'appetito e perdita di interesse per il cibo.

Nel corso degli anni sono stati identificati diversi marker bioumorali di malnutrizione, nessuno dei quali possiede, però, i requisiti di elevata sensibilità e specificità necessari. Sono, infatti, indici influenzabili da fattori non nutrizionali, scarsamente riproducibili e poco sensibili alla terapia nutrizionale. Non risultano dotati di buon valore predittivo relativamente ai rischi presenti o futuri di complicanze attribuibili alla malnutrizione. È per tutti questi motivi che la valutazione dello stato nutrizionale deve avvalersi di un insieme di indicatori, tra i quali:

Albuminemia

Sembra che la determinazione dei livelli di albumina sia in grado di fornire sufficienti informazioni per quanto riguarda il grado di malnutrizione proteico-viscerale. Tra i parametri nutrizionali di tipo bioumorale, l'albumina è quella che risulta maggiormente associata ad un aumento della morbilità e della mortalità nell'anziano. In base ai valori di albuminemia è possibile classificare lo stato di malnutrizione secondo tre livelli di gravità: lieve, moderata e grave. Un limite importante al suo utilizzo come indicatore di malnutrizione è rappresentato dalla sua lunga emivita (circa 20 giorni), che la rende marker poco idoneo a valutare modificazioni dello stato nutrizionale che si configurano in tempi brevi. Numerosi studi hanno mostrato una progressiva riduzione della concentrazione sierica di albumina tra 0.08 e 0.17 g/L per anno, associata all'aumentare dell'età, con una più rapida riduzione negli uomini rispetto alle donne [257-261]. In realtà, nonostante queste variazioni dei livelli di albumina possano sembrare età-correlate, i valori sierici determinati in soggetti anziani in buona salute sono stabili attorno a valori ottimali di 38 g/L anche dopo i 90 anni d'età [262]. Questo dato conferma che, in una situazione di stabilità clinica, l'albumina può essere considerata un buon marcatore dello stato nutrizionale negli anziani.

Colesterolemia

Può essere considerato un indicatore di malnutrizione calorico-proteica quando presenta una riduzione maggiore del 25% nell'ultimo anno e quando siano state escluse altre cause di ipocolesterolemia. Studi epidemiologici suggeriscono che i livelli di colesterolemia tendono ad aumentare nell'età adulta, e poi a ridursi nell'anziano [263]. L'invecchiamento sembra essere associato ad una riduzione della sintesi di

colesterolo, in parallelo con un aumento dei livelli circolanti, probabilmente in virtù di una riduzione dei fabbisogni metabolici legata all'aumentare dell'età.

Oltre alle difficoltà nel diagnosticare lo stato di malnutrizione nell'anziano, una delle conseguenze della presenza di malnutrizione è il cambiamento della composizione corporea, rilevabile con l'utilizzo di misurazioni antropometriche specifiche:

Indice di massa corporea (BMI)

La perdita di peso, la riduzione del BMI e la riduzione della massa muscolare sono marcatori indiretti di malnutrizione [264]. In particolare, il BMI è una stima indiretta della composizione corporea, risultato del rapporto tra il peso in kg e il quadrato dell'altezza in metri. I range di normalità utilizzati per valutare il valore di BMI nella popolazione anziana sono differenti rispetto a quelli utilizzati per il resto della popolazione. Questo adattamento dei valori è necessario per tenere in considerazione i cambiamenti strutturali che il corpo umano subisce con il processo di invecchiamento (riduzione dell'altezza in seguito a riduzione dello spazio intervertebrale e a malformazioni degenerative dello scheletro, diversa distribuzione della massa grassa e della massa magra). Nonostante questo, vari studi hanno mostrato che valori di BMI ≤ 22 kg/m² sono associati ad un aumento della mortalità, del numero dei ricoveri ospedalieri, della dipendenza funzionale, del rischio di fratture e dei costi dell'assistenza sanitaria [265, 266]. Pertanto, il BMI viene comunemente utilizzato come indicatore dello stato nutrizionale nell'anziano.

Circonferenza vita

Per valutare la presenza di uno stato di malnutrizione, è importante prendere in considerazione non solo il BMI, ma anche la distribuzione del tessuto adiposo. Nello specifico, la circonferenza vita è un indicatore del tessuto adiposo sottocutaneo addominale. La circonferenza vita è una delle componenti standard della valutazione antropometrica del soggetto anziano in ragione della sua correlazione con il rischio di malattia e di morte.

RAZIONALE E SCOPO DEL LAVORO

I meccanismi alla base del processo di invecchiamento secondo la teoria dell'invecchiamento programmato, potrebbero dipendere da geni che sequenzialmente inviano e bloccano segnali al sistema nervoso, endocrino ed immune. In questo complesso meccanismo patogenetico, un ruolo rilevante sembra averlo il sistema neuroendocrino. Secondo la "teoria neuroendocrina" l'invecchiamento è una conseguenza dei cambiamenti negli assi ormonali che regolano la riproduzione, la crescita, lo sviluppo e la sopravvivenza attraverso l'adattamento allo stress.

Negli ultimi anni, gli studi sull'invecchiamento in buona salute si sono concentrati sui centenari, soggetti che hanno posticipato o evitato del tutto l'insorgenza delle principali patologie età-correlate. Essi rappresentano il modello per eccellenza per lo studio di fattori biologici, genetici e ambientali alla base della longevità. Gli svantaggi legati al reclutamento di questi individui sono la numerosità limitata, la mancanza di un gruppo di controllo e la fragilità a causa dell'età estrema di questi soggetti. Il modello dei figli di centenari rappresenta un nuovo e promettente approccio sperimentale, poiché sono soggetti che godono di uno stato di buona salute in quanto sembrano aver ereditato le caratteristiche genetiche dei genitori e poiché offrono la possibilità di avere un gruppo di controllo costituito da coetanei con età, sesso ed etnia paragonabili alle loro.

Numerosi studi hanno confermato la presenza di complesse alterazioni negli assi ormonali durante l'invecchiamento. Il **primo obiettivo** di questo studio è stato quello di indagare i cambiamenti ormonali nei centenari. Questo gruppo di soggetti è stato finora poco caratterizzato da un punto di vista ormonale. Pertanto, il nostro scopo è stato quello di valutare come cambia la secrezione degli ormoni all'interno dei principali assi (asse ipotalamo-ipofisi-tiroide e asse ipotalamo-ipofisi-gonadi) e come variano alcuni parametri quali 25(OH)D, PTH, calcio e fosfato inorganico nei soggetti

centenari, nei loro figli e in soggetti controllo di età paragonabile a quella dei figli di centenari.

Inoltre, negli ultimi decenni, è stato riconosciuto che l'alimentazione è in grado di influenzare lo stato di salute e che l'adeguatezza della dieta costituisce il prerequisito essenziale per il mantenimento di uno stato di buona salute. Con il progressivo invecchiamento della popolazione, è evidente come la malnutrizione calorico-proteica età-correlata costituisca un problema sempre più diffuso. La valutazione dello stato nutrizionale e il conseguente trattamento della malnutrizione diventano interventi indispensabili al fine di tentare di minimizzare il rischio di malattie o complicanze associate all'avanzare dell'età. Il **secondo obiettivo** di questo studio è stato quello di valutare lo stato nutrizionale dei soggetti arruolati. Per farlo abbiamo utilizzato due marker bioumorali (albumina e colesterolo totale) e due misurazioni antropometriche (BMI e circonferenza vita) per valutare i cambiamenti della composizione corporea. Infine, il **terzo obiettivo** è stato quello di correlare lo stato nutrizionale dei centenari, dei loro figli e dei soggetti controllo, al profilo ormonale, indagando il possibile ruolo giocato dalla nutrizione sui cambiamenti dell'assetto endocrino.

Questo studio rientra nell'ambito dei programmi di ricerca scientifica di rilevante interesse nazionale: PRIN 2006 - prot. 20000061707 "La longevità dei genitori influenza l'invecchiamento in salute dei figli?" e PRIN 2009 - prot. 2009CB4C9F_003 "Ruolo della Epigenetica e della Genetica del DNA mitocondriale nella Longevità: studi su soggetti con più di 105 anni di età (semi-supercentenari)" che si pongono come obiettivo principale quello di contribuire a chiarire i fenomeni potenzialmente coinvolti nel processo di invecchiamento di successo e nella longevità.

MATERIALI E METODI

DISEGNO DELLO STUDIO

Per questo studio sono stati arruolati i centenari, modello per eccellenza per lo studio dei fattori alla base della longevità. Vista la mancanza di un gruppo di controllo con cui questi soggetti possano essere confrontati, abbiamo arruolato anche i loro figli, soggetti che mostrano un miglior stato di salute rispetto a soggetti della stessa età con genitori deceduti precocemente per cause naturali. Il vantaggio legato all'utilizzo di questa popolazione è dato dalla possibilità di avere un gruppo di controllo costituito da coetanei con età, sesso ed etnia paragonabili a quelli dei figli di centenari.

Con lo scopo di selezionare i potenziali candidati, sono stati contattati gli uffici anagrafe delle province di Milano, Firenze e Bologna e raccolto i nomi, le date di nascita e le residenze di tutte le persone ancora in vita con almeno 100 anni d'età. Successivamente, è stata inviata ad ognuno una lettera esplicativa dei metodi e degli obiettivi del progetto.

I centenari che hanno aderito sono stati 123 (età media 102.1 ± 0.2 anni). Per questo studio sono stati arruolati anche 171 figli di centenari (età media 70.1 ± 0.5 anni). Abbiamo poi selezionato un gruppo controllo costituito da 81 soggetti (età media 71.3 ± 0.7 anni) di etnia caucasica, in buona salute e afferenti all'Ambulatorio di Geriatria dell'Ospedale Maggiore Policlinico di Milano.

Tutti i partecipanti allo studio hanno sottoscritto un consenso informato, il quale è stato approvato dal comitato etico vigente. Le età dei partecipanti sono state confermate mediante visione del certificato di nascita o di un documento d'identità. Tutti i soggetti arruolati sono stati visitati da un medico che ha raccolto l'anamnesi mediante la compilazione di un questionario e ha eseguito l'esame obiettivo.

Le performance cognitive dei soggetti sono state valutate mediante il *Mini Mental State Examination* (MMSE) e a ciascun individuo è stato assegnato un punteggio compreso fra 0 (stato cognitivo estremamente compromesso) e 30 (stato cognitivo ottimale). Lo stato funzionale è stato invece valutato mediante la scala *Lawton Instrumental Activities of Daily*

Living (IADL) e la scala *Katz index of independence in Activities of Daily Living* (ADL). Sulla base dei punteggi ottenuti, ad ogni soggetto è stato assegnato un punteggio IADL compreso tra 0 (stato funzionale estremamente compromesso) e 8 (stato funzionale ottimale) ed un punteggio ADL compreso tra 0 (stato funzionale estremamente compromesso) e 6 (stato funzionale ottimale).

METODI

PARAMETRI ANTROPOMETRICI

Durante l'esame obiettivo, sono stati rilevati i principali parametri antropometrici:

Circonferenza vita

Il rilevamento è avvenuto a livello del punto più stretto tra il margine inferiore delle coste e la cresta iliaca. La misurazione è stata effettuata mediante nastro seca.

Valore di riferimento nell'uomo adulto: < 94 cm

Valore di riferimento nella donna adulta: < 80 cm

Altezza

Il rilevamento è avvenuto quando il soggetto è in posizione eretta, con le braccia lungo il corpo, in posizione tale da allineare sul piano orizzontale i punti Traghion (punto più alto del margine superiore del meato acustico esterno) e orbitale (punto più basso del margine inferiore dell'orbita) sul piano di Francoforte. La misurazione è stata effettuata mediante statimetro portatile.

Peso

Il rilevamento è avvenuto con bilancia portatile, tenendo conto di un eventuale calo ponderale involontario nell'ultimo anno.

Indice di massa corporea (BMI)

Il valore è stato ricavato dal rapporto tra il peso in kilogrammi e il quadrato dell'altezza in metri.

Intervallo di riferimento negli adulti: 18.5 - 24.9 kg/m²

PARAMETRI BIOCHIMICI E DOSAGGI ORMONALI

Di primo mattino, a digiuno, ogni soggetto è stato sottoposto ad un prelievo ematico da vena periferica. Il sangue prelevato in provetta con gel activator è stato centrifugato a 1200 g per 20 minuti a 4 °C. Il siero così ottenuto è stato utilizzato per le determinazioni dei parametri biochimici e ormonali riportati di seguito.

In tutti i saggi effettuati, per ottenere una performance ottimale ci si è attenuti alle indicazioni riportate nel documento con le istruzioni specifiche per il tipo di analizzatore utilizzato.

Per il prelievo e la preparazione dei campioni è stato necessario impiegare provette e contenitori di raccolta adatti.

Albumina

Per la determinazione quantitativa dell'albumina nel siero è stato eseguito un test in vitro, impiegando sistemi *Roche/Hitachi cobas c* (kit ALBT2, Tina-quant Albumin Gen.2).

Si tratta di un test immunoturbidimetrico che sfrutta la reazione che avviene tra gli anticorpi anti-albumina e l'antigene del campione, formando complessi antigene-anticorpo, che, dopo agglutinazione, sono misurati turbidimetricamente.

È stata fatta una diluizione dei campioni aggiungendo 2.1 µl di campione a 175 µl di NaCl (diluente). Per l'analisi il volume di campione impiegato è stato di 2.0 µl.

Intervallo di riferimento negli adulti: 3.5 - 5.2 g/dL

Colesterolo totale

Per la determinazione quantitativa del colesterolo totale nel siero è stata utilizzata una metodica *Trinder end-point*. Si tratta di una procedura enzimatico-colorimetrica CHOD-PAP: 10 µL di campione sono stati aggiunti ad una soluzione tampone contenente tre enzimi diversi: la colesterolo esterasi idrolizza gli esteri del colesterolo a colesterolo libero ed acidi grassi, la colesterolo ossidasi ossida il colesterolo libero totale a colest-4-en-3-one con formazione di perossido d'idrogeno che, in presenza di perossidasi

reagisce con il 4-aminofenazone e fenolo producendo un composto colorato. L'intensità di quest'ultimo è direttamente proporzionale alla concentrazione di colesterolo totale presente nel campione esaminato.

Valori di riferimento nell'adulto: < 200 mg/dL valori raccomandati
200 - 239 mg/dL valori limite superiori
≥ 240 mg/dL valori alti

Ormone stimolante della tiroide (TSH, tireotropina)

Per la determinazione quantitativa di TSH nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettoChemiLuminescenza "ECLIA" in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas e* (kit TSH, Tireotropina) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio sandwich:

1. I incubazione: 50 µL di campione, un anticorpo monoclonale biotinilato specifico anti-TSH e un anticorpo monoclonale specifico anti-TSH marcato con un complesso di rutenio formano un complesso sandwich.
2. II incubazione: dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina, il complesso si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.
4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nell'adulto: 0.27 - 4.20 µIU/mL

Triiodotironina libera (FT3)

Per la determinazione quantitativa di FT3 nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettroChemiLuminescenza “ECLIA” in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas e* (kit FT3, Triiodotironina libera) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell’analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio di competizione:

1. I incubazione: 15 μ L di campione e un anticorpo specifico anti-T3 marcato con un complesso di rutenio.
2. II incubazione: dopo l’aggiunta di T3 biotinilata e di microparticelle rivestite di streptavidina, vengono occupati i siti di legame ancora liberi dell’anticorpo marcato, con formazione di un complesso anticorpo-aptene. Il complesso totale si lega alla fase solida mediante l’interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell’elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all’elettrodo, si induce l’emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.
4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nell’adulto: 2.0 - 4.4 pg/mL

Tiroxina libera (FT4)

Per la determinazione quantitativa di FT4 nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettroChemiLuminescenza “ECLIA” in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas e* (kit FT4 II, Tiroxina libera) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell’analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio di competizione:

1. I incubazione: 15 μ L di campione e un anticorpo specifico anti-T4 marcato con un complesso di rutenio.

2. Il incubazione: dopo l'aggiunta di T4 biotinilata e di microparticelle rivestite di streptavidina, vengono occupati i siti di legame ancora liberi dell'anticorpo marcato, con formazione di un complesso anticorpo-aptene. Il complesso totale si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.
4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nell'adulto: 9.3 - 17.0 pg/mL

Ormone luteinizzante (LH)

Per la determinazione quantitativa di LH nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettroChemiLuminescenza "ECLIA" in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas e* (kit LH, Ormone luteinizzante) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio sandwich:

1. I incubazione: 20 µL di campione, un anticorpo monoclonale biotinilato specifico anti-LH e un anticorpo monoclonale specifico anti-LH marcato con un complesso di rutenio formano un complesso sandwich.
2. Il incubazione: dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina, il complesso si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.

4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nell'adulto: 1.7 - 8.6 U/L

Ormone follicolostimolante (FSH)

Per la determinazione quantitativa di FSH nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettroChemiLuminescenza "ECLIA" in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas e* (kit FSH, Ormone follicolostimolante) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio sandwich:

1. I incubazione: 40 µL di campione, un anticorpo monoclonale biotinilato specifico anti-FSH e un anticorpo monoclonale specifico anti-FSH marcato con un complesso di rutenio formano un complesso sandwich.
2. II incubazione: dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina, il complesso si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.
4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nell'uomo adulto: 1.5 - 12.4 U/L

Intervallo di riferimento nella donna adulta: 26 - 135 U/L

Globulina umana legante gli ormoni sessuali (SHBG)

Per la determinazione quantitativa delle SHBG nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettroChemiLuminescenza "ECLIA" in vitro, impiegando

immunoanalizzatori *cobas e* e (kit SHBG, Globulina umana legante gli ormoni sessuali) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio sandwich:

1. I incubazione: 10 μ L di campione, un anticorpo monoclonale biotinilato specifico anti-SHBG e un anticorpo monoclonale specifico anti-SHBG marcato con un complesso di rutenio formano un complesso sandwich.
2. II incubazione: dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina, il complesso si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.
4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nell'uomo adulto: 10 - 70 nmol/L

Intervallo di riferimento nella donna adulta: 20 - 100 nmol/L

Testosterone (T)

Per la determinazione quantitativa di T nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettroChemiLuminescenza "ECLIA" in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas e* (kit Testosterone II, Testosterone) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio di competizione:

1. I incubazione: 20 μ L di campione vengono incubati con un anticorpo monoclonale biotinilato specifico anti-testosterone. I siti di legame dell'anticorpo marcato vengono occupati dall'analita del campione (a seconda della sua concentrazione).

2. Il incubazione: dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina e di un derivato del testosterone marcato con un complesso di rutenio, il complesso si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.
4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nell'uomo adulto: 6.68 - 25.7 nmol/L

Intervallo di riferimento nella donna adulta: 0.10 - 1.42 nmol/L

Estradiolo (E2)

Per la determinazione quantitativa di E2 nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettroChemiLuminescenza "ECLIA" in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas e* (kit Estradiol III, Estradiolo-E2) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio di competizione:

1. I incubazione: incubando il campione (25 µL) con due anticorpi biotinilati specifici anti-estradiolo, si formano immunocomplessi, la cui quantità dipende dalla concentrazione dell'analita nel campione.
2. Il incubazione: dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina e di un derivato dell'estradiolo marcato con un complesso di rutenio, vengono occupati i siti di legame ancora liberi dell'anticorpo biotinilato, formando così un complesso anticorpo-aptene. Il complesso totale si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. Successivamente, si eliminano le sostanze non legate impiegando

ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.

4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nelle donne in menopausa: 18 - 155 pmol/L

25-idrossi vitamina D (25(OH)D)

Per la determinazione quantitativa di 25(OH)D nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettroChemiLuminescenza "ECLIA" in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas* e (kit Vitamin D total, 25-Idrossivitamina D) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test che sfrutta il principio di competizione:

1. I incubazione: incubando il campione (15 µL) con i reattivi di pretrattamento 1 (ditiotreitolo 1 g/L, pH 5.5) e 2 (idrossido di sodio 55 g/L), la 25(OH)D legata viene rilasciata dalla proteina legante la vitamina D.
2. II incubazione: incubando il campione pretrattato con la proteina legante la vitamina D marcata con rutenio, si forma un complesso tra la 25(OH)D e la proteina legante la vitamina D marcata con rutenio.
3. III incubazione: dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina e di 25(OH)D marcata con biotina, vengono occupate le proteine leganti la vitamina D marcate con rutenio non legate. Si forma un complesso costituito dalla proteina legante la vitamina D marcata con rutenio e la 25(OH)D biotinilata, che viene legato alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
4. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.

5. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Valori di riferimento nell'adulto: > 30 µg/L adeguato
21 - 29 µg/L insufficienza
< 20 µg/L carenza

Ormone paratiroideo (PTH)

Per la determinazione quantitativa di PTH nel siero è stato eseguito il test ImmunoAssay in ElettoChemiLuminescenza "ECLIA" in vitro, impiegando immunoanalizzatori *cobas e* (kit PTH, Ormone paratiroideo-PTH, intatto) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test immunologico che sfrutta il principio sandwich:

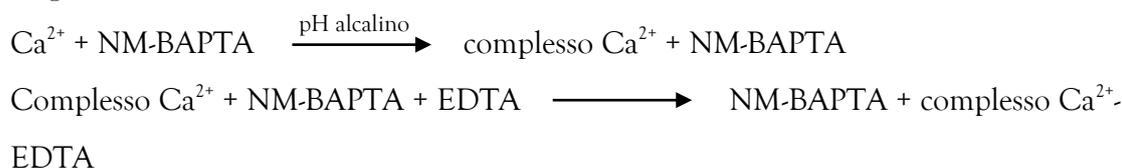
1. I incubazione: 50 µL di campione, un anticorpo monoclonale biotinilato specifico anti-PTH e un anticorpo monoclonale specifico anti-PTH marcato con un complesso di rutenio formano un complesso sandwich.
2. II incubazione: dopo l'aggiunta di microparticelle rivestite di streptavidina, il complesso si lega alla fase solida mediante l'interazione biotina-streptavidina.
3. La miscela di reazione viene aspirata nella cella di misura dove le microparticelle vengono attratte magneticamente alla superficie dell'elettrodo. In seguito, si eliminano le sostanze non legate impiegando ProCell/ProCell M. Applicando una tensione all'elettrodo, si induce l'emissione chemiluminescente che viene misurata mediante il fotomoltiplicatore.
4. I risultati sono calcolati in base ad una curva di calibrazione, che viene generata in modo specifico per lo strumento con una calibrazione a 2 punti e con una curva master.

Intervallo di riferimento nell'adulto: 13 - 64 ng/L

Calcio

Per la determinazione quantitativa del calcio nel siero è stato eseguito un test in vitro, impiegando sistemi *Roche/Hitachi cobas c* (kit CA2, Calcium Gen.2) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test che sfrutta, in una prima fase, la reazione che avviene tra gli ioni calcio e il 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA) in ambiente alcalino, con conseguente formazione del complesso Ca^{2+} -NM-BAPTA. In una seconda fase, questo complesso reagisce con l'EDTA.



La variazione dell'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione di calcio e viene misurata fotometricamente.

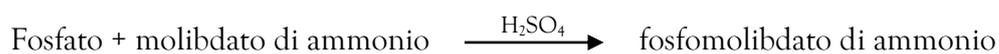
Per l'analisi il volume di campione impiegato è stato di 3.0 μL .

Intervallo di riferimento negli adulti: 8.1 - 10.4 mg/dL

Fosfato inorganico

Per la determinazione quantitativa del fosfato inorganico nel siero è stato eseguito un test in vitro, impiegando sistemi *Roche/Hitachi cobas c* (kit PHOS2, Phosphate Inorganic ver.2) che effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita in ciascun campione.

Si tratta di un test che sfrutta, in una prima fase, la reazione che avviene tra il fosfato inorganico e il molibdato di ammonio, alla presenza di acido solforico, formando un complesso di fosfomolibdato di ammonio secondo la formula $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$.



La concentrazione del fosfomolibdato formatosi è direttamente proporzionale alla concentrazione di fosfato inorganico e viene misurata fotometricamente.

Per l'analisi il volume di campione impiegato è stato di 2.5 μL .

Intervallo di riferimento negli adulti: 2.5 - 4.5 mg/dL

Parametro	Valori di riferimento	
Albumina	3.2 - 5.2 g/dL	
Colesterolo tot	< 200 mg/dl valori raccomandati 200 - 239 mg/dl valori limite superiori ≥ 240 mg/dl valori alti	
BMI	18.5 - 24.9 kg/m ²	
TSH	0.27 - 4.20 µIU/ml	
FT3	2.0 - 4.4 pg/mL	
FT4	9.3 - 17.0 pg/mL	
LH	1.7 - 8.6 U/L	
25(OH)D	> 30 µg/L adeguato 21 - 29 µg/L insufficienza < 20 µg/L carenza	
PTH	13 - 64 ng/L	
Calcio	8.1 - 10.4 mg/dL	
Fosfato inorganico	2.5 - 4.5 mg/dL	
	Uomo	Donna
Circonferenza vita	< 94 cm	< 80 cm
FSH	1.5 - 12.4 U/L	26 - 135 U/L
SHBG	10 - 70 nmol/L	20 - 100 nmol/L
T	6.68 - 25.7 nmol/L	0.10 - 1.42 nmol/L
E2	/	18 - 155 pmol/L

Tabella 2. Valori di riferimento degli indici nutrizionali, ormonali e biochimici.

ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati mediante il programma statistico SPSS/PC (SPSS versione 23, Chicago, IL).

Le variabili sono espresse come media \pm errore standard.

Al fine di confrontare i tre gruppi in esame (centenari, figli di centenari e controlli), per le variabili continue in cui è stata verificata l'ipotesi di una distribuzione gaussiana (albumina, colesterolo totale, circonferenza vita, FT3, FT4, calcio e fosfato inorganico) è stato effettuato il test parametrico ANOVA a una via, seguito dal test di Bonferroni come post-hoc test. Per le variabili continue in cui non è stata verificata l'ipotesi di una distribuzione gaussiana (anni di scolarità, MMSE, ADL, IADL, numero di farmaci/giorno, BMI, TSH, FSH, LH, SHBG, T, E2, 25(OH)D e PTH) sono stati effettuati i test non parametrici a campioni indipendenti ANOVA a una via di Kruskal-Wallis o test U di Mann-Whitney.

Le variabili categoriche sono state confrontate con il test Chi-quadrato.

Allo scopo di valutare le relazioni tra gli indici nutrizionali (albumina, colesterolo totale, BMI e circonferenza vita) e i dosaggi ormonali e biochimici, sono state effettuate delle correlazioni parziali eliminando gli effetti dovuti a sesso ed età.

Per tutte le analisi è stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI ARRUOLATI NELLO STUDIO

In tabella 3 sono riportate, rispettivamente per i centenari, i figli di centenari e i soggetti controllo, le caratteristiche generali (età, sesso e anni di scolarità), gli indici di valutazione dello stato cognitivo (MMSE) e funzionale (ADL e IADL) e il numero di farmaci assunti giornalmente.

	CENTENARI	FIGLI di CENTENARI	CONTROLLI	p
Partecipanti	123	171	81	
Età	102.1±0.2 ^a	70.1±0.5	71.3±0.7	<0.001
Sesso (M/F)	27/96 ^a	70/101	39/42	<0.001
Anni di scolarità	7.6±0.4 ^a	12.3±0.4	10.9±0.4	<0.001
MMSE	18.9±0.8 ^a	29.2±0.1	28.8±0.3	<0.001
ADL	2.4±0.2 ^a	5.9±0.1 ^b	5.6±0.1	<0.001
IADL	1.5±0.2 ^a	7.8±0.1	7.7±0.1	<0.001
n. farmaci/giorno	5.1±0.3	3.0±0.2 ^c	4.2±0.3	<0.001

Tabella 3

I risultati sono espressi come valore medio ± errore standard per età, anni di scolarità, MMSE, ADL, IADL e numero di farmaci assunti giornalmente, mentre per il sesso è riportata la distribuzione dei soggetti.

^a $p < 0.001$ vs figli di centenari e controlli.

^b $p < 0.05$ vs controlli.

^c $p < 0.001$ vs centenari e controlli.

MMSE: Mini Mental State Examination score; ADL: Katz index of independence in Activities of Daily Living scale; IADL: Lawton Instrumental Activities of Daily Living scale.

L'età dei figli dei centenari risulta essere paragonabile a quella dei controlli. Entrambi i gruppi sono di 30 anni più giovani rispetto ai centenari.

Anche la distribuzione maschi/femmine è diversa nei tre gruppi. Nel gruppo dei centenari prevale, infatti, il sesso femminile.

L'istruzione dei centenari è risultata più carente rispetto agli altri soggetti arruolati.

Lo stato cognitivo, valutato mediante MMSE, e lo stato funzionale, valutato mediante le scale ADL e IADL, sono significativamente più compromessi nei centenari rispetto ai loro figli e ai controlli.

Il numero di farmaci assunti giornalmente dai figli dei centenari è significativamente minore rispetto a quello dei centenari e dei controlli, mentre non è stata riscontrata una differenza significativa tra centenari e controlli.

VALUTAZIONI DEGLI INDICI NUTRIZIONALI, ORMONALI E BIOCHIMICI

In tabella 4 sono riportate le valutazioni degli indici nutrizionali (albumina, colesterolo totale e BMI), ormonali (TSH, FT3, FT4, LH, 25(OH)D e PTH) e biochimici (calcio e fosfato inorganico) relative al gruppo dei centenari, dei figli di centenari e dei controlli.

	CENTENARI	FIGLI di CENTENARI	CONTROLLI	<i>p</i>
Albumina (g/dL)	3.68±0.06 ^a	4.37±0.05	4.38±0.07	<0.001
Colesterolo tot (mg/dL)	181.44±3.86 ^a	203.41±2.81	196.69±4.67	<0.001
BMI (kg/m ²)	23.17±0.44 ^a	26.19±0.38 ^b	27.65±0.53	<0.001
TSH (μIU/mL)	3.40±0.43	2.42±0.23	1.92±0.11	ns
FT3 (pg/mL)	2.35±0.04 ^a	3.07±0.02	3.05±0.06	<0.001
FT4 (pg/mL)	11.93±0.21	11.70±0.15	11.82±0.28	ns
LH (U/L)	30.22±3.67 ^a	16.35±3.20	9.56±1.28	<0.001
25(OH)D (μg/L)	7.32±1.14 ^a	19.39±1.57	22.69±2.42	<0.001
PTH (ng/L)	134.83±10.55 ^a	55.98±2.29	54.91±3.97	<0.001
Calcio (mg/dL)	9.70±0.08 ^a	10.31±0.06	10.28±0.09	<0.001
Fosfato inorganico (mg/dL)	3.35±0.07 ^a	3.64±0.07	3.44±0.09	0.009

Tabella 4

Le variabili sono espresse come media ± errore standard.

^a *p* <0.001 vs figli di centenari e controlli.

^b *p* <0.05 vs controlli.

ns: non significativo; BMI: indice di massa corporea; TSH: tirotropina; FT3: triiodotironina libera; FT4: tiroxina libera; LH: ormone luteinizzante; 25(OH)D: 25-idrossi vitamina D; PTH: paratormone.

I valori degli indici nutrizionali (albumina, colesterolo totale e BMI) risultano significativamente diversi nei tre gruppi. In particolare, i centenari mostrano livelli di albumina, colesterolo totale e BMI significativamente più bassi non solo rispetto ai loro figli ma anche rispetto ai controlli. Inoltre, una differenza significativa è stata riscontrata tra il valore di BMI dei figli di centenari e quello dei controlli.

Per quanto riguarda le valutazioni ormonali e biochimiche, i nostri risultati mostrano valori significativamente diversi di FT3, LH, 25(OH)D, PTH, calcio e fosfato inorganico nei tre gruppi, dove FT3, 25(OH)D e calcio risultano più bassi e LH e PTH più alti nei centenari rispetto agli altri due gruppi. Inoltre, emerge che i livelli di fosfato inorganico sono significativamente più bassi nei centenari.

In tabella 5 sono riportate le valutazioni degli indici nutrizionali (albumina, colesterolo totale, BMI e circonferenza vita), ormonali (TSH, FT3, FT4, LH, FSH, SHBG, T, E2, 25(OH)D e PTH) e biochimici (calcio e fosfato inorganico) relative al gruppo dei centenari, dei figli di centenari e dei controlli suddividendo la popolazione in base al sesso.

		CENTENARI	FIGLI di CENTENARI	CONTROLLI	<i>p</i>
Albumina (g/dL)	M	3.84±0.10 ^a	4.35±0.10	4.50±0.08	<0.001
	F	3.66±0.08 ^a	4.35±0.06	4.26±0.11	<0.001
Colesterolo tot (mg/dL)	M	173.80±7.08 ^a	196.72±4.10	184.02±6.72	0.020
	F	183.43±4.50 ^a	208.18±3.76	208.73±5.98	<0.001
BMI (kg/m ²)	M	24.47±0.90 ^b	26.26±0.43	27.28±0.61	0.006
	F	22.78±0.50 ^a	26.13±0.58	28.02±0.86	<0.001
Circonferenza vita (cm)	M	93.67±2.45	95.14±1.11	97.33±1.42	ns
	F	84.47±1.34 ^c	85.04±1.27	90.51±2.11	0.029
TSH (μIU/mL)	M	3.78±0.91	2.38±0.46	1.91±0.16	ns
	F	3.29±0.49	2.46±2.19	1.93±0.15	ns
FT3 (pg/mL)	M	2.37±0.09 ^a	3.12±0.05	3.18±0.06	<0.001
	F	2.35±0.04 ^a	3.03±0.03	2.91±0.10	<0.001
FT4 (pg/mL)	M	11.51±0.47	11.46±1.76	11.69±0.31	ns
	F	12.04±0.24	11.78±0.18	11.97±0.48	ns
LH (U/L)	M	25.06±4.21 ^a	11.85±2.86	9.56±1.28	<0.001
	F	37.45±6.07	35.48±4.69	35.32±5.12	ns
FSH (U/L)	M	34.39±6.31 ^b	19.08±4.02	15.67±3.04	0.015
	F	79.62±14.72	93.90±7.26	94.21±6.23	ns
SHBG (nmol/L)	M	87.57±8.62 ^b	56.22±7.03	56.94±4.72	0.002
	F	102.93±6.09 ^a	72.10±4.49	96.06±14.39	<0.001
T (nmol/L)	M	10.06±1.48 ^c	14.30±1.79	16.75±1.57	0.031
	F	2.83±2.13	0.62±0.06	0.63±0.11	ns
E2 (pmol/L)	F	36.38±6.35 ^a	31.65±5.07	24.06±2.61	ns
25(OH)D (μg/L)	M	5.98±0.81 ^a	23.67±2.78	24.09±3.64	<0.001
	F	7.77±1.64 ^a	17.69±2.02	21.30±3.27	<0.001
PTH (ng/L)	M	108.80±19.89 ^a	52.74±4.18 ^c	41.54±2.90	<0.001
	F	142.94±14.43 ^a	58.04±2.89	68.28±5.73	<0.001
Calcio (mg/dL)	M	9.84±0.10	10.04±0.06	10.37±0.11 ^d	0.001
	F	9.70±0.12 ^a	10.42±0.08	10.17±0.14	<0.001
Fosfato inorganico (mg/dL)	M	3.07±0.13	3.45±0.14	3.13±0.34	ns
	F	3.48±0.08	3.72±0.08	3.74±0.13	ns

Tabella 5

Le variabili sono espresse come media \pm errore standard.

^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.05$ vs figli di centenari e controlli.

^c $p < 0.05$ vs controlli.

^d $p < 0.05$ vs centenari e figli di centenari.

ns: non significativo; BMI: indice di massa corporea; TSH: tirotropina; FT3: triiodotironina libera; FT4: tiroxina libera; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolostimolante; SHBG: globuline leganti gli ormoni sessuali; T: testosterone; E2: estradiolo; 25(OH)D: 25-idrossi vitamina D; PTH: paratormone.

Anche dopo aver distinto la popolazione maschile da quella femminile, l'albumina, il colesterolo totale e il BMI sono risultati significativamente più bassi nei centenari rispetto agli altri due gruppi. La circonferenza vita è significativamente diversa solo all'interno della popolazione femminile, in particolare vi è una differenza statisticamente significativa tra centenari e controlli.

Nessuna differenza è stata riscontrata per TSH e FT4 nei tre gruppi, mentre i dosaggi di FT3 confermano negli uomini e nelle donne la stessa differenza significativa già osservata considerando la popolazione totale tra i centenari e gli altri due gruppi.

Nella popolazione maschile, le concentrazioni di LH, FSH e SHBG sono risultate significativamente più alte nei centenari rispetto ai loro figli e ai controlli. Nella popolazione femminile, solo le SHBG sono maggiormente secrete nei centenari. I livelli di T sono significativamente più bassi nei centenari maschi, in particolar modo, rispetto ai controlli. L'E2 è stato valutato solo nella popolazione femminile ed è risultato significativamente più alto nei centenari.

Le concentrazioni sieriche di 25(OH)D e PTH sono rispettivamente più basse e più alte nei centenari rispetto agli altri due gruppi sia negli uomini che nelle donne, con la particolarità che i figli di centenari possiedono livelli di PTH significativamente maggiori rispetto ai controlli.

I livelli di calcio sono risultati significativamente diversi sia nella popolazione maschile che in quella femminile. In particolare, negli uomini i livelli di calcio sono maggiori nei controlli rispetto ai centenari e ai loro figli; nelle donne sono minori nei centenari rispetto ai loro figli e ai controlli.

Nessuna significatività è stata riscontrata per quanto riguarda le concentrazioni di fosfato inorganico.

CORRELAZIONI TRA INDICI NUTRIZIONALI E LIVELLI ORMONALI

Allo scopo di valutare le relazioni tra gli indici nutrizionali e i dosaggi ormonali e biochimici, sono state effettuate le correlazioni parziali correggendo per gli effetti dovuti a sesso ed età.

In tabella 6 sono riportate le correlazioni parziali tra gli indici nutrizionali e i dosaggi ormonali e biochimici, corrette per sesso ed età, nella popolazione totale.

	Albumina (g/dL)	Colesterolo tot (mg/dL)	BMI (kg/m ²)
TSH (μIU/mL)	ns	ns	ns
FT3 (pg/mL)	p<0.001 R ² =0.434	ns	ns
FT4 (pg/mL)	p=0.047 R ² =-0.177	ns	p=0.045 R ² =0.117
LH (U/L)	ns	ns	ns
25(OH)D (μg/L)	p=0.040 R ² =0.149	p=0.049 R ² =-0.147	p=0.011 R ² =-0.223
PTH (ng/L)	ns	p=0.041 R ² =0.156	ns
Calcio (mg/dL)	p<0.001 R ² =0.519	ns	ns
Fosfato inorganico (mg/dL)	ns	ns	ns

Tabella 6

Correlazioni parziali tra gli indici nutrizionali e i dosaggi ormonali e biochimici, corrette per sesso ed età, nella popolazione totale.

ns: non significativo; BMI: indice di massa corporea; TSH: tirotropina; FT3: triiodotironina libera; FT4: tiroxina libera; LH: ormone luteinizzante; 25(OH)D: 25-idrossi vitamina D; PTH: paratormone.

I risultati riportati in tabella 6 mostrano che l'albumina correla positivamente con i livelli di FT3, 25(OH)D e calcio e negativamente con i livelli di FT4. Inoltre, il colesterolo totale correla positivamente con i livelli di PTH e negativamente con i livelli

di 25(OH)D. Il BMI correla positivamente con i livelli di FT4 e negativamente con i livelli di 25(OH)D.

Le correlazioni parziali tra gli indici nutrizionali e i dosaggi ormonali e biochimici, corrette per età, nella popolazione maschile, sono mostrate in tabella 7.

	Albumina (g/dL)	Colesterolo tot (mg/dL)	BMI (kg/m ²)	Circonferenza vita (cm)
TSH (μIU/mL)	ns	ns	p=0.050 R ² =-0.177	ns
FT3 (pg/mL)	p=0.050 R ² =0.302	ns	ns	ns
FT4 (pg/mL)	ns	ns	p= 0.023 R ² =0.210	ns
LH (U/L)	p=0.013 R ² =-0.364	ns	ns	ns
FSH (U/L)	ns	ns	ns	ns
SHBG (nmol/L)	p= 0.001 R ² =-0.479	ns	ns	ns
T (nmol/L)	ns	ns	ns	ns
E2 (pmol/L)	ns	ns	ns	ns
25(OH)D (μg/L)	ns	p=0.038 R ² =-0.311	ns	ns
PTH (ng/L)	p=0.028 R ² =-0.320	ns	ns	ns
Calcio (mg/dL)	p<0.001 R ² =0.625	ns	ns	ns
Fosfato inorganico (mg/dL)	ns	ns	ns	ns

Tabella 7

Correlazioni parziali tra gli indici nutrizionali e i dosaggi ormonali e biochimici, corrette per età, nella popolazione maschile.

ns: non significativo; BMI: indice di massa corporea; TSH: tirotropina; FT3: triiodotironina libera; FT4: tiroxina libera; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolostimolante; SHBG: globuline leganti gli ormoni sessuali; T: testosterone; E2: estradiolo; 25(OH)D: 25-idrossi vitamina D; PTH: paratormone.

La tabella 7 mostra che l'albumina correla positivamente con i livelli di FT3 e calcio e negativamente con i livelli di LH, SHBG e PTH. Il colesterolo totale correla

negativamente con i livelli di 25(OH)D, mentre il BMI correla positivamente con i livelli di FT4 e negativamente con i livelli di TSH. La circonferenza vita non correla con nessuno dei parametri ormonali e biochimici analizzati.

In tabella 8 sono riportate le correlazioni parziali tra gli indici nutrizionali e i dosaggi ormonali e biochimici, corrette per età, nella popolazione femminile.

	Albumina (g/dL)	Colesterolo tot (mg/dL)	BMI (kg/m ²)	Circonferenza vita (cm)
TSH (μIU/mL)	ns	ns	ns	ns
FT3 (pg/mL)	p<0.001 R ² =0.479	ns	ns	ns
FT4 (pg/mL)	ns	ns	ns	ns
LH (U/L)	ns	ns	ns	ns
FSH (U/L)	ns	ns	ns	ns
SHBG (nmol/L)	ns	ns	ns	p=0.012 R ² =-0.258
T (nmol/L)	p=0.043 R ² =-0.205	ns	ns	ns
E2 (pmol/L)	p=0.011 R ² =-0.255	ns	ns	ns
25(OH)D (μg/L)	ns	ns	p=0.050 R ² =-0.206	ns
PTH (ng/L)	ns	p=0.050 R ² =0.198	ns	ns
Calcio (mg/dL)	p<0.001 R ² =0.502	ns	ns	ns
Fosfato inorganico (mg/dL)	ns	ns	ns	ns

Tabella 8

Correlazioni parziali tra gli indici nutrizionali e i dosaggi ormonali e biochimici, corrette per età, nella popolazione femminile.

ns: non significativo; BMI: indice di massa corporea; TSH: tirotropina; FT3: triiodotironina libera; FT4: tiroxina libera; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolostimolante; SHBG: globuline leganti gli ormoni sessuali; T: testosterone; E2: estradiolo; 25(OH)D: 25-idrossi vitamina D; PTH: paratormone.

Come è visibile in tabella 8, l'albumina correla positivamente con i livelli di FT3 e calcio e correla negativamente con i livelli di T ed E2. Il colesterolo totale correla positivamente con i livelli di PTH, invece il BMI correla negativamente con i livelli di 25(OH)D. La circonferenza vita correla negativamente con i livelli di SHBG.

DISCUSSIONE

Negli ultimi decenni a causa dell'allungamento della vita media, dell'elevata prevalenza di soggetti anziani nella popolazione generale e dell'incremento della spesa sanitaria e sociale per la cura e l'assistenza degli anziani, sono notevolmente aumentati gli studi sull'invecchiamento [267], definito come il processo che comprende tutti i cambiamenti fisiologici, genetici e molecolari che si verificano con il passare del tempo, dalla pubertà fino alla morte [268]. Le modificazioni età-correlate possono essere attribuite al naturale processo di crescita, a difetti genetici legati all'individuo, al rapporto tra genotipo e ambiente, allo svilupparsi di malattie e all'invecchiamento, che rappresenta il maggiore fattore di rischio per malattie e morte nei paesi sviluppati [269]. I meccanismi alla base di questo processo si possono spiegare con la teoria dell'invecchiamento programmato, secondo cui la durata della vita dipenderebbe da geni che sequenzialmente inviano e bloccano segnali al sistema nervoso, endocrino ed immune, e con la teoria dell'errore, secondo la quale gli insulti ambientali sarebbero responsabili del danno progressivo a vari livelli negli organismi viventi.

Nel processo di invecchiamento, un ruolo rilevante sembra averlo il sistema neuroendocrino. Secondo la "teoria neuroendocrina" l'invecchiamento è una conseguenza dei cambiamenti negli assi ormonali che regolano la riproduzione, la crescita, lo sviluppo e la sopravvivenza attraverso l'adattamento allo stress. Gli organi endocrini più coinvolti sono quelli preposti alla secrezione degli ormoni tiroidei (FT3, FT4), gonadici (E2 e T), paratiroidi (PTH) e ipofisari (TSH, FSH, LH) [270]. Le conseguenze di questi cambiamenti sono molteplici e comprendono la riduzione della massa ossea, della massa muscolare scheletrica e della forza, causando un aumento del tessuto adiposo, agendo sul sistema immunitario e aumentando la fragilità.

Negli ultimi anni, gli studi sull'invecchiamento in buona salute si sono concentrati sui centenari, soggetti che hanno posticipato o evitato del tutto l'insorgenza delle principali patologie età-correlate, spesso causa di morbilità e mortalità nell'anziano [45]. Essi rappresentano il modello per eccellenza per lo studio di fattori biologici, genetici e

ambientali alla base della longevità [271]. Tuttavia, ci sono alcuni svantaggi inerenti al reclutamento di questi individui: casistiche di numerosità limitata (in particolare per il sesso maschile), mancanza di un gruppo di controllo adeguato e fragilità a causa dell'età estrema di questi soggetti. Il modello dei figli di centenari, proposto in questo studio, rappresenta un nuovo e promettente approccio sperimentale per approfondire le basi biologiche della longevità. Si tratta di persone di età compresa tra 65 e 85 anni che sembrerebbero avere un invecchiamento "migliore" ed una maggiore aspettativa di vita rispetto ai loro coetanei. Di questo modello è disponibile un adeguato gruppo di controllo rappresentato dai figli di genitori non longevi di pari età, sesso e provenienza geografica, evitando quindi effetti di coorte [272, 273].

Ad oggi, sono presenti, da un lato, molti studi che confermano la presenza di complesse alterazioni negli assi ormonali durante l'invecchiamento, e dall'altro lato, pochi studi che indagano i cambiamenti ormonali nei centenari. Poiché i centenari sono stati finora poco caratterizzati dal punto di vista ormonale, uno degli obiettivi di questo studio è stato quello di valutare come cambia la secrezione degli ormoni all'interno dei principali assi.

Per quanto riguarda l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide, i nostri risultati non mostrano differenze nei livelli di TSH e FT4 tra i tre gruppi studiati, mentre i livelli di FT3 risultano significativamente inferiori nei centenari rispetto ai loro figli e ai controlli, differenza che si mantiene significativa anche dopo aver considerato separatamente maschi e femmine. È noto che durante l'invecchiamento questo asse ormonale subisce sostanziali modificazioni. I ridotti livelli di FT3 riscontrati nei centenari potrebbero essere il tentativo della frazione T3 di indurre la produzione di TSH, poiché è noto che aumentati livelli di questo ormone sembrano essere associati ad uno stato di salute migliore [76].

Nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, i risultati di questo studio mostrano valori di LH nettamente superiori nei centenari rispetto ai loro figli e ai controlli, risultato che si mantiene solo nella popolazione maschile ma non in quella femminile. Lo stesso risultato si ottiene per il FSH, i cui livelli sono significativamente maggiori nei centenari uomini rispetto agli altri due gruppi, ma non nelle donne dove i valori di FSH sono molto simili tra loro, sebbene molto al di sopra del *range* di normalità.

Alcuni studi hanno mostrato un aumento progressivo di LH e FSH durante l'invecchiamento [274, 275]. In particolare, nell'uomo l'aumento dei livelli di entrambi questi ormoni sembra riflettere la ridotta secrezione di androgeni ed estrogeni da parte delle cellule di Leydig e la diminuita produzione di inibina B da parte delle cellule del Sertoli [274]. Ciò spiegherebbe i valori al di sopra dei *range* di normalità riscontrati soprattutto nel gruppo dei centenari. Nella donna, invece, è noto come la menopausa determini una perdita dei meccanismi di regolazione nei *pattern* adibiti alla secrezione di LH [276]. Questo potrebbe spiegare l'aumento dei livelli di LH ben oltre i *range* di normalità nella popolazione femminile, dove tutti i soggetti sono in post-menopausa.

Nella popolazione maschile, esiste una differenza significativa dei livelli di T tra i tre gruppi analizzati con una riduzione evidente nei centenari rispetto ai controlli, in relazione ad aumentate SHBG sieriche nei centenari rispetto agli altri due gruppi. Nella popolazione femminile, si assiste a un aumento significativo di E2 e di SHBG nei centenari. I nostri risultati dimostrano che l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi è tra quelli che subiscono i cambiamenti più sostanziali con l'invecchiamento. L'andropausa nell'uomo e la menopausa nella donna, infatti, rappresentano eventi critici sul piano biologico e fisiologico. I loro effetti risultano essere particolarmente evidenti in questi soggetti caratterizzati da un'età estrema.

Riguardo alla vitamina D, i nostri risultati evidenziano una differenza significativa tra le concentrazioni sieriche di 25(OH)D nei tre gruppi; in particolare, si denota una riduzione drastica di 25(OH)D nei centenari rispetto ai loro figli e ai controlli, risultato in linea con la maggior parte degli studi sulla vitamina D [241-248]. Il nostro dato conferma, infatti, che la carenza di 25(OH)D si accentua progressivamente con l'avanzare dell'età. I livelli di PTH, invece, subiscono un incremento notevole nei centenari rispetto agli altri due gruppi, andamento che si mantiene anche dopo la distinzione tra i due sessi. Nei centenari, le concentrazioni di PTH risultano essere molto maggiori rispetto al *range* di normalità. Questo incremento potrebbe essere la conseguenza della significativa riduzione dell'assorbimento intestinale di calcio che si verifica quando i livelli di 25(OH)D sono drasticamente ridotti [183] con conseguente incremento della sintesi di PTH da parte delle cellule C delle paratiroidi [184-186]. Particolarmente interessante è la differenza osservata nella popolazione maschile tra le

concentrazioni di PTH nei figli di centenari e nei controlli. Anche i livelli di calcio e di fosfato inorganico sono significativamente diversi tra i tre gruppi di soggetti.

Le differenze riscontrate nei livelli di PTH tra i controlli e i figli di centenari e nei livelli di calcio dei controlli rispetto ai centenari e ai loro figli nella popolazione maschile, potrebbero indurre a considerare il PTH e il calcio come parametri predittivi di longevità, poiché è stato largamente dimostrato che i figli di centenari sembrano aver ereditato dai loro genitori i tratti genetici che predispongono alla longevità [272].

Con i risultati ottenuti in questo studio, si delinea un profilo ormonale caratteristico dei soggetti centenari. In molti avevano già identificato la presenza di numerose alterazioni fisiologiche negli assi ormonali durante l'invecchiamento, ma in pochi si erano spinti a studiarle in soggetti oltre i 100 anni d'età. I centenari sembrano rappresentare una categoria a parte, con tratti che li identificano chiaramente dalla popolazione settantenne. L'invecchiamento è associato all'accumulo di sottili ma percettibili cambiamenti nella secrezione ipofisaria. La presenza di morbilità concomitanti, come ad esempio obesità, diabete mellito, ridotta nutrizione, malattie sistemiche e uso di farmaci, sembrerebbe alterare le modalità con cui l'invecchiamento agisce sui singoli assi ormonali. Anche il sesso dell'individuo gioca un effetto considerevole sulla funzione ipofisaria durante tutto il corso della vita. I meccanismi alla base dei cambiamenti ormonali che si verificano con l'invecchiamento richiedono sicuramente ulteriori indagini, anche se ipotizziamo che la longevità dei centenari possa essere il risultato del progressivo accumulo di cambiamenti favorevoli negli assi ipofisari e che, quindi, potrebbero favorire la sopravvivenza.

Questo studio ha mostrato numerose differenze tra la popolazione maschile e la popolazione femminile nel gruppo dei centenari. Molti dei parametri indagati, infatti, risultano significativamente diversi se confrontati nei maschi o nelle femmine, come ad indicare una forte influenza giocata dal sesso nella variazione degli assi ormonali durante l'invecchiamento di successo. Da un lato, le differenze riscontrate tra le due popolazioni potrebbero essere la conseguenza di un bias metodologico dovuto al numero esiguo di uomini rispetto alle donne nel gruppo dei centenari (rapporto 1:3.6, rispettivamente). Ma dall'altro lato, questi numeri confermano che, all'interno della popolazione degli "oldest old", le femmine vivono significativamente più a lungo rispetto

ai maschi, in accordo con i precedenti studi condotti sui centenari [288]. Questo dato sembra indicare che la longevità umana sia strettamente influenzata dal sesso, definito come la combinazione di specifiche caratteristiche biologiche e fattori ambientali quali il comportamento, il ruolo sociale e lo stile di vita [277-280]. Nelle donne, il vantaggio di sopravvivenza si associa però ad una peggiore qualità della vita in età avanzata, caratterizzata da un aumento della disabilità e della prevalenza di malattie degenerative [281]. Pertanto, oltre ad avere una possibilità differente di raggiungere un'età estrema, gli uomini e le donne vanno incontro ad un processo di invecchiamento qualitativamente diverso. Questo paradosso, comunemente definito come “paradosso della mortalità-morbilità”, spiega la presenza di un così basso numero di uomini centenari: i sopravvissuti sono fisicamente più “robusti” e in buona salute e quindi in grado di sopravvivere fino ad un'età estrema. Un recente studio ha affermato che la capacità della popolazione femminile di sopravvivere così a lungo potrebbe essere la conseguenza che gli effetti ormonali hanno sull'organismo durante tutto il corso della vita, dalla nascita all'età adulta [282]. L'impatto della differenza di sesso sul processo di invecchiamento è stato ampiamente approfondito negli anni, ma lo studio dell'interazione tra fattori ormonali, immunologici e metabolici e profilo genetico rimane tuttora ampiamente da indagare.

Negli ultimi decenni, è stato universalmente riconosciuto che l'alimentazione è in grado di influenzare profondamente lo stato di salute e che l'adeguatezza della dieta costituisce il prerequisito essenziale per il mantenimento di uno stato di buona salute. Quindi, vista l'esistenza di una correlazione tra alimentazione e rischio di malattie, risulta importante avere a disposizione strumenti idonei per la valutazione dello stato nutrizionale e della dieta. In particolare, con il progressivo invecchiamento della popolazione, è evidente come la malnutrizione calorico-proteica età-correlata sia un problema sempre più diffuso [255], che va affrontato e trattato al fine di minimizzare il rischio di malattie o complicanze associate all'avanzare dell'età.

La valutazione dello stato nutrizionale richiede l'utilizzo di molteplici metodologie e indicatori diagnostici. In questo studio, per valutare lo stato nutrizionale, ci siamo serviti di due marker bioumorali: l'albumina, la cui concentrazione sierica è stata vista ridursi progressivamente con l'aumentare dell'età in casi di malnutrizione proteico-

viscerale [257-261] e il colesterolo totale, i cui livelli tendono ad aumentare nell'età adulta, per poi ridursi nell'anziano [263]. I nostri risultati hanno mostrato una riduzione significativa dei livelli di albumina e colesterolo totale nel gruppo dei centenari rispetto ai loro figli e ai controlli, riduzione che è stata confermata anche dopo la distinzione maschi-femmine. È interessante notare come i soggetti in trattamento farmacologico con statine rappresentino solo l'1.8% nei centenari, il 18.3% nei figli dei centenari e il 58% nei soggetti controllo. Questi dati dimostrano che, a fronte di valori di colesterolo totale entro il *range* di normalità in tutti e 3 gruppi, i centenari e i loro figli sono significativamente meno soggetti ad ipercolesterolemia rispetto ai controlli, confermando i dati precedentemente pubblicati secondo cui i figli dei centenari sembrano essere caratterizzati da un invecchiamento e uno stato di salute migliori rispetto a soggetti controllo di pari età [9, 273, 283-285].

Un altro dei fattori da indagare per valutare lo stato nutrizionale è il cambiamento della composizione corporea. Per rilevare questi cambiamenti, abbiamo utilizzato due misurazioni antropometriche: il BMI, che unitamente alla perdita di peso e alla riduzione della massa muscolare, rappresenta un marcatore indiretto di malnutrizione [264] e la circonferenza vita, che è un indicatore della distribuzione del tessuto adiposo corporeo, correlato al rischio di malattia e di morte nel soggetto anziano. Nella nostra popolazione generale e nello specifico, sia in quella maschile che in quella femminile, questo studio ha rilevato una differenza significativa tra i valori di BMI nei tre gruppi, con una riduzione nei centenari rispetto ai loro figli e ai controlli. Interessante è la differenza riscontrata nei valori di BMI tra i figli di centenari e i controlli, con valori significativamente più bassi nei figli di centenari rispetto ai controlli. È già noto che valori bassi di BMI sono associati ad un miglior stato di salute e i risultati di questo studio sembrano suggerire la possibilità di considerare il BMI come un parametro predittivo di longevità. La differenza tra le misure della circonferenza vita è risultata significativa solo nella popolazione femminile sottolineando l'importanza che questo parametro riveste soprattutto nelle donne.

Dopo aver valutato lo stato nutrizionale di tutti i soggetti in studio, lo abbiamo correlato al profilo ormonale. Il nostro obiettivo era indagare se la nutrizione potesse

avere un ruolo o fosse correlata alle variazioni dell'assetto endocrino che caratterizzano il processo di invecchiamento.

I risultati di questo studio hanno mostrato la presenza di correlazioni significative tra gli indici nutrizionali e alcune delle valutazioni ormonali effettuate, suggerendo una relazione tra stato nutrizionale e metabolismo endocrino.

Questa relazione tra stato nutrizionale e metabolismo endocrino è già stata evidenziata nella condizione di "fragilità", che rappresenta la sindrome biologica per eccellenza in età avanzata. La fragilità è associata ad aumentata vulnerabilità agli stress causata da una riduzione della riserva fisiologica dell'individuo che va perdendosi con l'invecchiamento [136, 286]. La prevalenza di fragilità è molto elevata nei soggetti anziani e conferisce loro un notevole rischio di cadute, disabilità, ospedalizzazione e mortalità. Si tratta di una condizione pro-infiammatoria diffusa che si verifica durante l'invecchiamento e si manifesta in seguito alla disregolazione di sistemi interconnessi quali il sistema immunitario (produzione anomala di citochine), il sistema neuroendocrino (alterazione della secrezione ormonale) e cambiamenti nella composizione corporea (perdita di massa e forza muscolare) [287]. La diagnosi di fragilità viene fatta sulla base di alcuni indici che valutano la forza e la resistenza fisica, la composizione corporea e lo stato nutrizionale dell'individuo. I valori degli indici nutrizionali ottenuti nei centenari arruolati in questo studio suggeriscono che questi soggetti, oltre ad essere molto anziani, sono anche fragili. I centenari sono caratterizzati da un fenotipo molto eterogeneo, risultato dell'interazione tra l'uomo e l'ambiente e della combinazione di processi biologici che esercitano i loro effetti lungo tutto il corso della vita [288]. Ogni centenario presenta, infatti, caratteristiche peculiari che lo distinguono dagli altri. Inoltre, i risultati di questo studio hanno rivelato la presenza di uno specifico stato nutrizionale e di un ben definito profilo ormonale che sembrano coesistere nei nostri centenari e che quindi potrebbero contribuire sinergicamente nel determinare lo stato di salute e la qualità del processo di invecchiamento in questi soggetti. In conclusione, i risultati del nostro studio potrebbero confermare l'ipotesi di un'interazione tra stato nutrizionale e assi ormonali, interazione che potrebbe giocare un ruolo fondamentale nell'invecchiamento in buona salute e nella longevità.

BIBLIOGRAFIA

1. Candore, G., et al., *Immunogenetics, gender, and longevity*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1089**: p. 516-37.
2. Hekimi, S., *How genetic analysis tests theories of animal aging*. Nat Genet, 2006. **38**(9): p. 985-91.
3. Brooks-Wilson, A.R., *Genetics of healthy aging and longevity*. Hum Genet, 2013. **132**(12): p. 1323-38.
4. Vacante, M., et al., *Centenarians and supercentenarians: a black swan. Emerging social, medical and surgical problems*. BMC Surg, 2012. **12 Suppl 1**: p. S36.
5. Franceschi, C., et al., *The extreme longevity: the state of the art in Italy*. Exp Gerontol, 2008. **43**(2): p. 45-52.
6. Newman, A.B. and J.M. Murabito, *The epidemiology of longevity and exceptional survival*. Epidemiol Rev, 2013. **35**: p. 181-97.
7. Perls, T., L. Kunkel, and A. Puca, *The genetics of aging*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(3): p. 362-9.
8. Perls, T. and A. Puca, *The genetics of aging- implications for pharmacogenomics*. Pharmacogenomics, 2002. **3**(4): p. 469-84.
9. Perls, T.T., et al., *Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8442-7.
10. Atzmon, G., et al., *Clinical phenotype of families with longevity*. J Am Geriatr Soc, 2004. **52**(2): p. 274-7.
11. Motta, M., et al., *Genealogy of centenarians and their relatives: a study of 12 families*. Arch Gerontol Geriatr, 2007. **45**(1): p. 97-102.
12. Perls, T., et al., *What does it take to live to 100?* Mech Ageing Dev, 2002. **123**(2-3): p. 231-42.
13. Westendorp, R.G., et al., *Nonagenarian siblings and their offspring display lower risk of mortality and morbidity than sporadic nonagenarians: The Leiden Longevity Study*. J Am Geriatr Soc, 2009. **57**(9): p. 1634-7.
14. Perls, T. and D. Terry, *Genetics of exceptional longevity*. Exp Gerontol, 2003. **38**(7): p. 725-30.
15. Perls, T. and D. Terry, *Understanding the determinants of exceptional longevity*. Ann Intern Med, 2003. **139**(5 Pt 2): p. 445-9.
16. Capri, M., et al., *The genetics of human longevity*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1067**: p. 252-63.
17. De Benedictis, G., et al., *Recent advances in human gene-longevity association studies*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(9): p. 909-20.
18. Carrieri, G., et al., *Mitochondrial DNA haplogroups and APOE4 allele are non-independent variables in sporadic Alzheimer's disease*. Hum Genet, 2001. **108**(3): p. 194-8.

19. De Benedictis, G., et al., *DNA multiallelic systems reveal gene/longevity associations not detected by diallelic systems. The APOB locus.* Hum Genet, 1997. **99**(3): p. 312-8.
20. Bonafe, M., et al., *Polymorphic variants of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor and phosphoinositide 3-kinase genes affect IGF-I plasma levels and human longevity: cues for an evolutionarily conserved mechanism of life span control.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(7): p. 3299-304.
21. Papazoglu, C. and A.A. Mills, *p53: at the crossroad between cancer and ageing.* J Pathol, 2007. **211**(2): p. 124-33.
22. Vasto, S., et al., *Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity.* Mech Ageing Dev, 2007. **128**(1): p. 83-91.
23. Lio, D., et al., *Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity.* Genes Immun, 2002. **3**(1): p. 30-3.
24. Lio, D., et al., *Opposite effects of interleukin 10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease.* J Med Genet, 2004. **41**(10): p. 790-4.
25. Harris, T.B., et al., *Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly.* Am J Med, 1999. **106**(5): p. 506-12.
26. Di Bona, D., et al., *Effect of interleukin-6 polymorphisms on human longevity: a systematic review and meta-analysis.* Ageing Res Rev, 2009. **8**(1): p. 36-42.
27. Caruso, C., et al., *Immunogenetics of longevity. Is major histocompatibility complex polymorphism relevant to the control of human longevity? A review of literature data.* Mech Ageing Dev, 2001. **122**(5): p. 445-62.
28. Lio, D., et al., *Association between the HLA-DR alleles and longevity: a study in Sardinian population.* Exp Gerontol, 2003. **38**(3): p. 313-7.
29. Gussago, C., et al., *Impact of vitamin D receptor polymorphisms in centenarians.* Endocrine, 2016. **53**(2): p. 558-64.
30. De Benedictis, G., et al., *Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans.* FASEB J, 1999. **13**(12): p. 1532-6.
31. Rakyan, V.K., et al., *Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains.* Genome Res, 2010. **20**(4): p. 434-9.
32. Fraga, M.F., R. Agrelo, and M. Esteller, *Cross-talk between aging and cancer: the epigenetic language.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 60-74.
33. Gentilini, D., et al., *Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring.* Age (Dordr), 2013. **35**(5): p. 1961-73.
34. Sozou, P.D. and R.M. Seymour, *To age or not to age.* Proc Biol Sci, 2004. **271**(1538): p. 457-63.
35. Partridge, L. and D. Gems, *Mechanisms of ageing: public or private?* Nat Rev Genet, 2002. **3**(3): p. 165-75.
36. Melov, S., et al., *Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics.* Science, 2000. **289**(5484): p. 1567-9.
37. Park, C.B. and N.G. Larsson, *Mitochondrial DNA mutations in disease and aging.* J Cell Biol, 2011. **193**(5): p. 809-18.

38. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. 37: p. 614-36.
39. Blackburn, E.H., *Telomere states and cell fates*. Nature, 2000. 408(6808): p. 53-6.
40. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. 279(5349): p. 349-52.
41. Kim, N.W., et al., *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer*. Science, 1994. 266(5193): p. 2011-5.
42. Reddel, R.R., *The role of senescence and immortalization in carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2000. 21(3): p. 477-84.
43. Wick, G., et al., *A Darwinian-evolutionary concept of age-related diseases*. Exp Gerontol, 2003. 38(1-2): p. 13-25.
44. Sansoni, P., et al., *The immune system in extreme longevity*. Exp Gerontol, 2008. 43(2): p. 61-5.
45. Franceschi, C. and M. Bonafe, *Centenarians as a model for healthy aging*. Biochem Soc Trans, 2003. 31(2): p. 457-61.
46. Capri, M., et al., *Human longevity within an evolutionary perspective: the peculiar paradigm of a post-reproductive genetics*. Exp Gerontol, 2008. 43(2): p. 53-60.
47. Franceschi, C., M. Bonafe, and S. Valensin, *Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space*. Vaccine, 2000. 18(16): p. 1717-20.
48. Pawelec, G., et al., *Is immunosenescence infectious?* Trends Immunol, 2004. 25(8): p. 406-10.
49. Vescovini, R., et al., *Different contribution of EBV and CMV infections in very long-term carriers to age-related alterations of CD8+ T cells*. Exp Gerontol, 2004. 39(8): p. 1233-43.
50. Zanni, F., et al., *Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence*. Exp Gerontol, 2003. 38(9): p. 981-7.
51. Baggio, G., et al., *Lipoprotein(a) and lipoprotein profile in healthy centenarians: a reappraisal of vascular risk factors*. FASEB J, 1998. 12(6): p. 433-7.
52. Mari, D., et al., *Hypercoagulability in centenarians: the paradox of successful aging*. Blood, 1995. 85(11): p. 3144-9.
53. McGeer, E.G. and P.L. McGeer, *Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications*. Curr Pharm Des, 1999. 5(10): p. 821-36.
54. Ross, R., *Atherosclerosis-an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. 340(2): p. 115-26.
55. Franceschi, C., et al., *Inflamming and anti-inflamming: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans*. Mech Ageing Dev, 2007. 128(1): p. 92-105.
56. Finch, C.E., *The regulation of physiological changes during mammalian aging*. Q Rev Biol, 1976. 51(1): p. 49-83.
57. Christensen, K., et al., *Ageing populations: the challenges ahead*. Lancet, 2009. 374(9696): p. 1196-208.
58. Russell, S.J. and C.R. Kahn, *Endocrine regulation of ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(9): p. 681-91.

59. Masoro, E.J., *Overview of caloric restriction and ageing*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 913-22.
60. Costa-e-Sousa, R.H. and A.N. Hollenberg, *Minireview: The neural regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis*. Endocrinology, 2012. **153**(9): p. 4128-35.
61. Chiamolera, M.I. and F.E. Wondisford, *Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism*. Endocrinology, 2009. **150**(3): p. 1091-6.
62. Scanlan, T.S., et al., *3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone*. Nat Med, 2004. **10**(6): p. 638-42.
63. Chidakel, A., D. Mentuccia, and F.S. Celi, *Peripheral metabolism of thyroid hormone and glucose homeostasis*. Thyroid, 2005. **15**(8): p. 899-903.
64. Debaveye, Y., et al., *Regulation of tissue iodothyronine deiodinase activity in a model of prolonged critical illness*. Thyroid, 2008. **18**(5): p. 551-60.
65. Hansen, J.M., L. Skovsted, and K. Siersbaek-Nielsen, *Age dependent changes in iodine metabolism and thyroid function*. Acta Endocrinol (Copenh), 1975. **79**(1): p. 60-5.
66. Herrmann, J., et al., *Free triiodothyronine (t3) and thyroxine (t4) serum levels in old age*. Horm Metab Res, 1974. **6**(3): p. 239-40.
67. Hesch, R.D., et al., *TBG-dependency of age related variations of thyroxine and triiodothyronine*. Horm Metab Res, 1977. **9**(2): p. 141-6.
68. Hesch, R.D., et al., *Total and free triiodothyronine and thyroid-binding globulin concentration in elderly human persons*. Eur J Clin Invest, 1976. **6**(2): p. 139-45.
69. Lipson, A., et al., *A study of age-dependent changes in thyroid function tests in adults*. J Nucl Med, 1979. **20**(11): p. 1124-30.
70. Pawlikowski, T., et al., *Blood serum thyroxine and triiodothyronine in men over sixty*. Endokrynol Pol, 1975. **26**(6): p. 593-601.
71. Rubenstein, H.A., V.P. Butler, Jr., and S.C. Werner, *Progressive decrease in serum triiodothyronine concentrations with human aging: radioimmunoassay following extraction of serum*. J Clin Endocrinol Metab, 1973. **37**(2): p. 247-53.
72. Westgren, U., et al., *Blood levels of 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine: differences between children, adults, and elderly subjects*. Acta Med Scand, 1976. **200**(6): p. 493-5.
73. Hollowell, J.G., et al., *Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(2): p. 489-99.
74. Bremner, A.P., et al., *Age-related changes in thyroid function: a longitudinal study of a community-based cohort*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(5): p. 1554-62.
75. Waring, A.C., et al., *Longitudinal changes in thyroid function in the oldest old and survival: the cardiovascular health study all-stars study*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(11): p. 3944-50.
76. Gussekloo, J., et al., *Thyroid status, disability and cognitive function, and survival in old age*. JAMA, 2004. **292**(21): p. 2591-9.
77. Blanc, S., et al., *Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(1): p. 16-23.
78. Longo, V.D. and C.E. Finch, *Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians?* Science, 2003. **299**(5611): p. 1342-6.

79. Mobbs, C.V., et al., *Neuroendocrine and pharmacological manipulations to assess how caloric restriction increases life span*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56 Spec No 1**: p. 34-44.
80. van den Beld, A.W., et al., *Thyroid hormone concentrations, disease, physical function, and mortality in elderly men*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(12): p. 6403-9.
81. Atzmon, G., et al., *Genetic predisposition to elevated serum thyrotropin is associated with exceptional longevity*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(12): p. 4768-75.
82. Biondi, B., *Thyroid and obesity: an intriguing relationship*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(8): p. 3614-7.
83. Vagenakis, A.G., et al., *Effect of starvation on the production and metabolism of thyroxine and triiodothyronine in euthyroid obese patients*. J Clin Endocrinol Metab, 1977. **45**(6): p. 1305-9.
84. Choi, J.W. and H.S. Choi, *The regulatory effects of thyroid hormone on the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase*. Endocr Res, 2000. **26**(1): p. 1-21.
85. Asvold, B.O., et al., *The association between TSH within the reference range and serum lipid concentrations in a population-based study. The HUNT Study*. Eur J Endocrinol, 2007. **156**(2): p. 181-6.
86. Wang, F., et al., *Thyroid-stimulating hormone levels within the reference range are associated with serum lipid profiles independent of thyroid hormones*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(8): p. 2724-31.
87. Burki, T.K., *TSH, blood pressure, and lipid levels*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2013. **1 Suppl 1**: p. s12.
88. Araujo, R.L., et al., *High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole-body fat oxidation*. Endocrinology, 2010. **151**(7): p. 3460-9.
89. Sari, R., et al., *The effect of body weight and weight loss on thyroid volume and function in obese women*. Clin Endocrinol (Oxf), 2003. **59**(2): p. 258-62.
90. Pujanek, M., et al., *Pathomechanisms of the development of obesity in some endocrinopathies - an overview*. Endokrynol Pol, 2013. **64**(2): p. 150-5.
91. Ghamari-Langroudi, M., et al., *Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(12): p. 2366-81.
92. Rotondi, M., et al., *Raised serum TSH levels in patients with morbid obesity: is it enough to diagnose subclinical hypothyroidism?* Eur J Endocrinol, 2009. **160**(3): p. 403-8.
93. Kok, P., et al., *High circulating thyrotropin levels in obese women are reduced after body weight loss induced by caloric restriction*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(8): p. 4659-63.
94. Reinehr, T., et al., *Thyroid hormones and their relation to weight status*. Horm Res, 2008. **70**(1): p. 51-7.
95. Mehran, L., et al., *Association between serum TSH concentration and body mass index in euthyroid subjects: the role of smoking*. Arch Iran Med, 2012. **15**(7): p. 400-3.
96. Reinehr, T., *Obesity and thyroid function*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **316**(2): p. 165-71.

97. Lips, M.A., et al., *Roux-en-Y gastric bypass and calorie restriction induce comparable time-dependent effects on thyroid hormone function tests in obese female subjects*. Eur J Endocrinol, 2013. **169**(3): p. 339-47.
98. Khan, S.M., et al., *Leptin as a modulator of neuroendocrine function in humans*. Yonsei Med J, 2012. **53**(4): p. 671-9.
99. Rosner, W., *Sex steroids and the free hormone hypothesis*. Cell, 2006. **124**(3): p. 455-6; author reply 456-7.
100. Handelsman, D.J., *Update in andrology*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4505-11.
101. Centenera, M.M., et al., *The contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signaling*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(11): p. 2373-82.
102. MacLean, H.E., et al., *Novel androgen receptor gene mutations in Australian patients with complete androgen insensitivity syndrome*. Hum Mutat, 2004. **23**(3): p. 287.
103. Jones, M.E., et al., *Recognizing rare disorders: aromatase deficiency*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. **3**(5): p. 414-21.
104. Gennari, L., R. Nuti, and J.P. Bilezikian, *Aromatase activity and bone homeostasis in men*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(12): p. 5898-907.
105. Khosla, S., L.J. Melton, 3rd, and B.L. Riggs, *Clinical review 144: Estrogen and the male skeleton*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(4): p. 1443-50.
106. Bhasin, S., et al., *Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(6): p. 2536-59.
107. Fink, H.A., et al., *Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(10): p. 3908-15.
108. Meier, C., et al., *Endogenous sex hormones and incident fracture risk in older men: the Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study*. Arch Intern Med, 2008. **168**(1): p. 47-54.
109. Bhasin, S., et al., *Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(2): p. 678-88.
110. Page, S.T., et al., *Exogenous testosterone (T) alone or with finasteride increases physical performance, grip strength, and lean body mass in older men with low serum T*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(3): p. 1502-10.
111. Sattler, F.R., et al., *Testosterone and growth hormone improve body composition and muscle performance in older men*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(6): p. 1991-2001.
112. Srinivas-Shankar, U., et al., *Effects of testosterone on muscle strength, physical function, body composition, and quality of life in intermediate-frail and frail elderly men: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(2): p. 639-50.
113. Isidori, A.M., et al., *Effects of testosterone on body composition, bone metabolism and serum lipid profile in middle-aged men: a meta-analysis*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **63**(3): p. 280-93.
114. Allan, C.A., et al., *Testosterone therapy increases sexual desire in ageing men with low-normal testosterone levels and symptoms of androgen deficiency*. Int J Impot Res, 2008. **20**(4): p. 396-401.

115. Isidori, A.M., et al., *Effects of testosterone on sexual function in men: results of a meta-analysis*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **63**(4): p. 381-94.
116. Cunningham, G.R. and S.M. Toma, *Clinical review: Why is androgen replacement in males controversial?* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(1): p. 38-52.
117. Kaufman, J.M. and A. Vermeulen, *The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications*. Endocr Rev, 2005. **26**(6): p. 833-76.
118. Yeap, B.B., *Testosterone and ill-health in aging men*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2009. **5**(2): p. 113-21.
119. Yeap, B.B., *Androgens and cardiovascular disease*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(3): p. 269-76.
120. Rubinow, K.B., et al., *Acute testosterone deprivation reduces insulin sensitivity in men*. Clin Endocrinol (Oxf), 2012. **76**(2): p. 281-8.
121. Grossmann, M., E.J. Gianatti, and J.D. Zajac, *Testosterone and type 2 diabetes*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(3): p. 247-56.
122. Snyder, P.J., et al., *Effects of Testosterone Treatment in Older Men*. N Engl J Med, 2016. **374**(7): p. 611-24.
123. Yeap, B.B., A.B. Araujo, and G.A. Wittert, *Do low testosterone levels contribute to ill-health during male ageing?* Crit Rev Clin Lab Sci, 2012. **49**(5-6): p. 168-82.
124. Feldman, H.A., et al., *Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(2): p. 589-98.
125. Harman, S.M., et al., *Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 724-31.
126. Liu, P.Y., et al., *Age-related changes in serum testosterone and sex hormone binding globulin in Australian men: longitudinal analyses of two geographically separate regional cohorts*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(9): p. 3599-603.
127. Ferrini, R.L. and E. Barrett-Connor, *Sex hormones and age: a cross-sectional study of testosterone and estradiol and their bioavailable fractions in community-dwelling men*. Am J Epidemiol, 1998. **147**(8): p. 750-4.
128. Lapauw, B., et al., *The decline of serum testosterone levels in community-dwelling men over 70 years of age: descriptive data and predictors of longitudinal changes*. Eur J Endocrinol, 2008. **159**(4): p. 459-68.
129. Morley, J.E., et al., *Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men*. Metabolism, 1997. **46**(4): p. 410-3.
130. Orwoll, E., et al., *Testosterone and estradiol among older men*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(4): p. 1336-44.
131. Yeap, B.B., et al., *In men older than 70 years, total testosterone remains stable while free testosterone declines with age. The Health in Men Study*. Eur J Endocrinol, 2007. **156**(5): p. 585-94.
132. Muller, M., et al., *Endogenous sex hormones in men aged 40-80 years*. Eur J Endocrinol, 2003. **149**(6): p. 583-9.
133. Wu, F.C., et al., *Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men*. N Engl J Med, 2010. **363**(2): p. 123-35.

134. Ahmed, N., R. Mandel, and M.J. Fain, *Frailty: an emerging geriatric syndrome*. Am J Med, 2007. **120**(9): p. 748-53.
135. Fairhall, N., et al., *Treating frailty-a practical guide*. BMC Med, 2011. **9**: p. 83.
136. Fried, L.P., et al., *Frailty in older adults: evidence for a phenotype*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56**(3): p. M146-56.
137. Bhasin, S., *The brave new world of function-promoting anabolic therapies: testosterone and frailty*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(2): p. 509-11.
138. Schaap, L.A., et al., *The association of sex hormone levels with poor mobility, low muscle strength and incidence of falls among older men and women*. Clin Endocrinol (Oxf), 2005. **63**(2): p. 152-60.
139. O'Donnell, A.B., et al., *Testosterone, dehydroepiandrosterone, and physical performance in older men: results from the Massachusetts Male Aging Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(2): p. 425-31.
140. LeBlanc, E.S., et al., *Higher testosterone levels are associated with less loss of lean body mass in older men*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(12): p. 3855-63.
141. Cawthon, P.M., et al., *Sex hormones and frailty in older men: the osteoporotic fractures in men (MrOS) study*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(10): p. 3806-15.
142. Travison, T.G., et al., *Changes in reproductive hormone concentrations predict the prevalence and progression of the frailty syndrome in older men: the concord health and ageing in men project*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(8): p. 2464-74.
143. Hall, S.A., et al., *Correlates of low testosterone and symptomatic androgen deficiency in a population-based sample*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(10): p. 3870-7.
144. Allen, N.E., et al., *Lifestyle and nutritional determinants of bioavailable androgens and related hormones in British men*. Cancer Causes Control, 2002. **13**(4): p. 353-63.
145. Svartberg, J., et al., *The associations of age, lifestyle factors and chronic disease with testosterone in men: the Tromso Study*. Eur J Endocrinol, 2003. **149**(2): p. 145-52.
146. Yeap, B.B., et al., *Healthier lifestyle predicts higher circulating testosterone in older men: the Health In Men Study*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **70**(3): p. 455-63.
147. Ly, L.P., et al., *Accuracy of calculated free testosterone formulae in men*. Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **73**(3): p. 382-8.
148. Mohr, B.A., et al., *The effect of changes in adiposity on testosterone levels in older men: longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study*. Eur J Endocrinol, 2006. **155**(3): p. 443-52.
149. Katsuki, A., et al., *Acute and chronic regulation of serum sex hormone-binding globulin levels by plasma insulin concentrations in male noninsulin-dependent diabetes mellitus patients*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(7): p. 2515-9.
150. Yki-Jarvinen, H., et al., *Portal insulin concentrations rather than insulin sensitivity regulate serum sex hormone-binding globulin and insulin-like growth factor binding protein 1 in vivo*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(11): p. 3227-32.
151. Giagulli, V.A., J.M. Kaufman, and A. Vermeulen, *Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **79**(4): p. 997-1000.
152. Lima, N., et al., *Decreased androgen levels in massively obese men may be associated with impaired function of the gonadostat*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24**(11): p. 1433-7.

153. Pitteloud, N., et al., *Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(5): p. 2636-41.
154. Vermeulen, A., et al., *Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men.* J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(5): p. 1140-6.
155. Allan, C.A., et al., *Testosterone therapy prevents gain in visceral adipose tissue and loss of skeletal muscle in nonobese aging men.* J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(1): p. 139-46.
156. Yialamas, M.A., et al., *Acute sex steroid withdrawal reduces insulin sensitivity in healthy men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism.* J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(11): p. 4254-9.
157. Colangelo, L.A., et al., *Association of endogenous sex hormones with diabetes and impaired fasting glucose in men: multi-ethnic study of atherosclerosis.* Diabetes Care, 2009. **32**(6): p. 1049-51.
158. Muller, M., et al., *Endogenous sex hormones and metabolic syndrome in aging men.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(5): p. 2618-23.
159. Yeap, B.B., et al., *Lower serum testosterone is independently associated with insulin resistance in non-diabetic older men: the Health In Men Study.* Eur J Endocrinol, 2009. **161**(4): p. 591-8.
160. Cannell, J.J., et al., *Diagnosis and treatment of vitamin D deficiency.* Expert Opin Pharmacother, 2008. **9**(1): p. 107-18.
161. Holick, M.F., *Vitamin D deficiency.* N Engl J Med, 2007. **357**(3): p. 266-81.
162. Vieth, R., *Why "Vitamin D" is not a hormone, and not a synonym for 1,25-dihydroxy-vitamin D, its analogs or deltanoids.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. **89-90**(1-5): p. 571-3.
163. Chen, T.C., et al., *Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D.* Arch Biochem Biophys, 2007. **460**(2): p. 213-7.
164. DeLuca, H.F., *Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.* Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6 Suppl): p. 1689S-96S.
165. Holick, M.F., *Resurrection of vitamin D deficiency and rickets.* J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2062-72.
166. Armas, L.A., B.W. Hollis, and R.P. Heaney, *Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(11): p. 5387-91.
167. Holick, M.F., *The vitamin D epidemic and its health consequences.* J Nutr, 2005. **135**(11): p. 2739S-48S.
168. Nair, R. and A. Maseeh, *Vitamin D: The "sunshine" vitamin.* J Pharmacol Pharmacother, 2012. **3**(2): p. 118-26.
169. Gilchrest, B.A., *Sun exposure and vitamin D sufficiency.* Am J Clin Nutr, 2008. **88**(2): p. 570S-577S.
170. Holick, M.F., *Vitamin D: a D-Lightful health perspective.* Nutr Rev, 2008. **66**(10 Suppl 2): p. S182-94.
171. Holick, M.F. and T.C. Chen, *Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences.* Am J Clin Nutr, 2008. **87**(4): p. 1080S-6S.
172. Holick, M.F., et al., *Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story.* J Bone Miner Res, 2007. **22** Suppl 2: p. V28-33.

173. MacLaughlin, J.A., R.R. Anderson, and M.F. Holick, *Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin*. Science, 1982. **216**(4549): p. 1001-3.
174. Moan, J., et al., *Addressing the health benefits and risks, involving vitamin D or skin cancer, of increased sun exposure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 668-73.
175. Holick, M.F., *Vitamin D: extraskelatal health*. Rheum Dis Clin North Am, 2012. **38**(1): p. 141-60.
176. MacLaughlin, J. and M.F. Holick, *Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1536-8.
177. Heaney, R.P., et al., *Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(1): p. 204-10.
178. Lee, J.H., et al., *Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor?* J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(24): p. 1949-56.
179. Hossein-nezhad, A. and M.F. Holick, *Optimize dietary intake of vitamin D: an epigenetic perspective*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2012. **15**(6): p. 567-79.
180. Passeri, G., et al., *Calcium metabolism and vitamin D in the extreme longevity*. Exp Gerontol, 2008. **43**(2): p. 79-87.
181. Norman, A.W., *Intestinal calcium absorption: a vitamin D-hormone-mediated adaptive response*. Am J Clin Nutr, 1990. **51**(2): p. 290-300.
182. Heaney, R.P., *Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6 Suppl): p. 1706S-9S.
183. Heaney, R.P., et al., *Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D*. J Am Coll Nutr, 2003. **22**(2): p. 142-6.
184. Chapuy, M.C., et al., *Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population*. Osteoporos Int, 1997. **7**(5): p. 439-43.
185. Holick, M.F., et al., *Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3215-24.
186. Thomas, M.K., et al., *Hypovitaminosis D in medical inpatients*. N Engl J Med, 1998. **338**(12): p. 777-83.
187. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky, *Vitamin D*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F8-28.
188. Bakhtiyarova, S., et al., *Vitamin D status among patients with hip fracture and elderly control subjects in Yekaterinburg, Russia*. Osteoporos Int, 2006. **17**(3): p. 441-6.
189. Bischoff-Ferrari, H.A., et al., *Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(1): p. 18-28.
190. Boonen, S., et al., *Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence*. Calcif Tissue Int, 2006. **78**(5): p. 257-70.
191. Chapuy, M.C., et al., *Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women*. N Engl J Med, 1992. **327**(23): p. 1637-42.
192. Holick, M.F., *Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(3): p. 362-71.

193. Holick, M.F., *High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(3): p. 353-73.
194. Holick, M.F., *Optimal vitamin D status for the prevention and treatment of osteoporosis*. Drugs Aging, 2007. **24**(12): p. 1017-29.
195. Larsen, E.R., L. Mosekilde, and A. Foldspang, *Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based 3-year intervention study*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(3): p. 370-8.
196. Lips, P., *Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications*. Endocr Rev, 2001. **22**(4): p. 477-501.
197. McKenna, M.J., *Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly*. Am J Med, 1992. **93**(1): p. 69-77.
198. Malabanan, A., I.E. Veronikis, and M.F. Holick, *Redefining vitamin D insufficiency*. Lancet, 1998. **351**(9105): p. 805-6.
199. Boivin, G., et al., *Ultrastructural immunocytochemical localization of endogenous 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its receptors in osteoblasts and osteocytes from neonatal mouse and rat calvaria*. Bone Miner, 1987. **3**(2): p. 125-36.
200. Narbaitz, R., et al., *Autoradiographic localization of target cells for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ in bones from fetal rats*. Calcif Tissue Int, 1983. **35**(2): p. 177-82.
201. Dhese, J.K., et al., *Neuromuscular and psychomotor function in elderly subjects who fall and the relationship with vitamin D status*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(5): p. 891-7.
202. Janssen, H.C., M.M. Samson, and H.J. Verhaar, *Vitamin D deficiency, muscle function, and falls in elderly people*. Am J Clin Nutr, 2002. **75**(4): p. 611-5.
203. Pettifor, J.M., *Rickets and vitamin D deficiency in children and adolescents*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2005. **34**(3): p. 537-53, vii.
204. Schott, G.D. and M.R. Wills, *Muscle weakness in osteomalacia*. Lancet, 1976. **1**(7960): p. 626-9.
205. Glerup, H., et al., *Hypovitaminosis D myopathy without biochemical signs of osteomalacic bone involvement*. Calcif Tissue Int, 2000. **66**(6): p. 419-24.
206. Holick, M.F., et al., *Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(4): p. 1153-8.
207. Pfeifer, M., et al., *Effects of a long-term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals*. Osteoporos Int, 2009. **20**(2): p. 315-22.
208. Kilkkinen, A., et al., *Vitamin D status and the risk of cardiovascular disease death*. Am J Epidemiol, 2009. **170**(8): p. 1032-9.
209. Pilz, S., et al., *Vitamin D deficiency and myocardial diseases*. Mol Nutr Food Res, 2010. **54**(8): p. 1103-13.
210. Rendina, D., G. De Filippo, and P. Strazzullo, *Should vitamin D status be assessed in patients with congestive heart failure?* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. **20**(9): p. 627-32.
211. Lind, L., et al., *Reduction of blood pressure during long-term treatment with active vitamin D (alphacalcidol) is dependent on plasma renin activity and calcium status. A double-blind, placebo-controlled study*. Am J Hypertens, 1989. **2**(1): p. 20-5.

212. Pfeifer, M., et al., *Effects of a short-term vitamin D(3) and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(4): p. 1633-7.
213. Wu, J., et al., *1,25(OH)2D3 suppresses expression and secretion of atrial natriuretic peptide from cardiac myocytes.* Am J Physiol, 1995. **268**(6 Pt 1): p. E1108-13.
214. Chiu, K.C., et al., *Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction.* Am J Clin Nutr, 2004. **79**(5): p. 820-5.
215. Scragg, R., *Vitamin D and type 2 diabetes: are we ready for a prevention trial?* Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2565-6.
216. Scragg, R., M. Sowers, and C. Bell, *Serum 25-hydroxyvitamin D, diabetes, and ethnicity in the Third National Health and Nutrition Examination Survey.* Diabetes Care, 2004. **27**(12): p. 2813-8.
217. Ford, E.S., et al., *Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults.* Diabetes Care, 2005. **28**(5): p. 1228-30.
218. Boucher, B.J., *Inadequate vitamin D status: does it contribute to the disorders comprising syndrome 'X'?* Br J Nutr, 1998. **79**(4): p. 315-27.
219. Clark, S.A., W.E. Stumpf, and M. Sar, *Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on insulin secretion.* Diabetes, 1981. **30**(5): p. 382-6.
220. Cigolini, M., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and prevalence of cardiovascular disease among type 2 diabetic patients.* Diabetes Care, 2006. **29**(3): p. 722-4.
221. Giulietti, A., et al., *Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory.* Diabetes Res Clin Pract, 2007. **77**(1): p. 47-57.
222. Bouillon, R., et al., *Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice.* Endocr Rev, 2008. **29**(6): p. 726-76.
223. Annweiler, C., D.J. Llewellyn, and O. Beauchet, *Low serum vitamin D concentrations in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis.* J Alzheimers Dis, 2013. **33**(3): p. 659-74.
224. Wilkins, C.H., et al., *Vitamin D deficiency is associated with low mood and worse cognitive performance in older adults.* Am J Geriatr Psychiatry, 2006. **14**(12): p. 1032-40.
225. Meehan, M. and S. Penckofer, *The Role of Vitamin D in the Aging Adult.* J Aging Gerontol, 2014. **2**(2): p. 60-71.
226. Richards, J.B., et al., *Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women.* Am J Clin Nutr, 2007. **86**(5): p. 1420-5.
227. Schottker, B., et al., *Vitamin D and mortality: meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and the United States.* BMJ, 2014. **348**: p. g3656.
228. Zittermann, A., J.F. Gummert, and J. Bergermann, *Vitamin D deficiency and mortality.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2009. **12**(6): p. 634-9.
229. Binkley, N., et al., *Current status of clinical 25-hydroxyvitamin D measurement: an assessment of between-laboratory agreement.* Clin Chim Acta, 2010. **411**(23-24): p. 1976-82.
230. Bischoff-Ferrari, H.A., et al., *Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults.* Am J Med, 2004. **116**(9): p. 634-9.

231. Bischoff-Ferrari, H.A., et al., *Dietary calcium and serum 25-hydroxyvitamin D status in relation to BMD among U.S. adults*. J Bone Miner Res, 2009. **24**(5): p. 935-42.
232. Ebeling, P.R., et al., *Evidence of an age-related decrease in intestinal responsiveness to vitamin D: relationship between serum 1,25-dihydroxyvitamin D3 and intestinal vitamin D receptor concentrations in normal women*. J Clin Endocrinol Metab, 1992. **75**(1): p. 176-82.
233. Riggs, B.L., A. Hamstra, and H.F. DeLuca, *Assessment of 25-hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase reserve in postmenopausal osteoporosis by administration of parathyroid extract*. J Clin Endocrinol Metab, 1981. **53**(4): p. 833-5.
234. Slovik, D.M., et al., *Deficient production of 1,25-dihydroxyvitamin D in elderly osteoporotic patients*. N Engl J Med, 1981. **305**(7): p. 372-4.
235. Adami, S., et al., *Relationship between serum parathyroid hormone, vitamin D sufficiency, age, and calcium intake*. Bone, 2008. **42**(2): p. 267-70.
236. Isaia, G., et al., *Prevalence of hypovitaminosis D in elderly women in Italy: clinical consequences and risk factors*. Osteoporos Int, 2003. **14**(7): p. 577-82.
237. Rossini, M., et al., *[Risk factors for hip fracture in elderly persons]*. Reumatismo, 2010. **62**(4): p. 273-82.
238. Bikle, D.D., *Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic requirements*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(6): p. 375-84.
239. Gallagher, J.C. and A.J. Sai, *Vitamin D insufficiency, deficiency, and bone health*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(6): p. 2630-3.
240. Sai, A.J., et al., *Relationship between vitamin D, parathyroid hormone, and bone health*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(3): p. E436-46.
241. Bettica, P., et al., *High prevalence of hypovitaminosis D among free-living postmenopausal women referred to an osteoporosis outpatient clinic in northern Italy for initial screening*. Osteoporos Int, 1999. **9**(3): p. 226-9.
242. Carnevale, V., et al., *Longitudinal evaluation of vitamin D status in healthy subjects from southern Italy: seasonal and gender differences*. Osteoporos Int, 2001. **12**(12): p. 1026-30.
243. Giusti, A., et al., *High prevalence of secondary hyperparathyroidism due to hypovitaminosis D in hospitalized elderly with and without hip fracture*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(9): p. 809-13.
244. Lips, P., et al., *A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 1212-21.
245. Oudshoorn, C., et al., *Ageing and vitamin D deficiency: effects on calcium homeostasis and considerations for vitamin D supplementation*. Br J Nutr, 2009. **101**(11): p. 1597-606.
246. Passeri, G., et al., *Low vitamin D status, high bone turnover, and bone fractures in centenarians*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(11): p. 5109-15.
247. Romagnoli, E., et al., *Hypovitaminosis D in an Italian population of healthy subjects and hospitalized patients*. Br J Nutr, 1999. **81**(2): p. 133-7.
248. van der Wielen, R.P., et al., *Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe*. Lancet, 1995. **346**(8969): p. 207-10.
249. Muscarella, S., et al., *Vitamin D status in inpatients admitted to an internal medicine department*. Horm Res, 2006. **66**(5): p. 216-20.

250. Holick, M.F., L.Y. Matsuoka, and J. Wortsman, *Age, vitamin D, and solar ultraviolet*. *Lancet*, 1989. **2**(8671): p. 1104-5.
251. Wortsman, J., et al., *Decreased bioavailability of vitamin D in obesity*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **72**(3): p. 690-3.
252. Brown, A.J., *Therapeutic uses of vitamin D analogues*. *Am J Kidney Dis*, 2001. **38**(5 Suppl 5): p. S3-S19.
253. Holick, M.F., *Vitamin D for health and in chronic kidney disease*. *Semin Dial*, 2005. **18**(4): p. 266-75.
254. Shimada, T., et al., *FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis*. *J Bone Miner Res*, 2004. **19**(3): p. 429-35.
255. Agarwal, E., et al., *Malnutrition in the elderly: a narrative review*. *Maturitas*, 2013. **76**(4): p. 296-302.
256. Keller, H.H., *Malnutrition in institutionalized elderly: how and why?* *J Am Geriatr Soc*, 1993. **41**(11): p. 1212-8.
257. Baumgartner, R.N., et al., *Serum albumin is associated with skeletal muscle in elderly men and women*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **64**(4): p. 552-8.
258. Cooper, J.K. and C. Gardner, *Effect of aging on serum albumin*. *J Am Geriatr Soc*, 1989. **37**(11): p. 1039-42.
259. Gom, I., et al., *Relationship between serum albumin level and aging in community-dwelling self-supported elderly population*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2007. **53**(1): p. 37-42.
260. Sahyoun, N.R., et al., *Use of albumin as a predictor of mortality in community dwelling and institutionalized elderly populations*. *J Clin Epidemiol*, 1996. **49**(9): p. 981-8.
261. Salive, M.E., et al., *Serum albumin in older persons: relationship with age and health status*. *J Clin Epidemiol*, 1992. **45**(3): p. 213-21.
262. Champion, E.W., L.O. deLabry, and R.J. Glynn, *The effect of age on serum albumin in healthy males: report from the Normative Aging Study*. *J Gerontol*, 1988. **43**(1): p. M18-20.
263. Wilson, P.W., et al., *Determinants of change in total cholesterol and HDL-C with age: the Framingham Study*. *J Gerontol*, 1994. **49**(6): p. M252-7.
264. Flood, A., et al., *The use of hand grip strength as a predictor of nutrition status in hospital patients*. *Clin Nutr*, 2014. **33**(1): p. 106-14.
265. Miller, M.D., et al., *BMI: a simple, rapid and clinically meaningful index of under-nutrition in the oldest old?* *Br J Nutr*, 2009. **101**(9): p. 1300-5.
266. Sergi, G., et al., *Role of visceral proteins in detecting malnutrition in the elderly*. *Eur J Clin Nutr*, 2006. **60**(2): p. 203-9.
267. Weinert, B.T. and P.S. Timiras, *Invited review: Theories of aging*. *Journal of applied physiology*, 2003. **95**(4): p. 1706-16.
268. Sacher, G.A., *Evolutionary theory in gerontology*. *Perspectives in biology and medicine*, 1982. **25**(3): p. 339-53.
269. Harman, D., *The free radical theory of aging*. *Antioxidants & redox signaling*, 2003. **5**(5): p. 557-61.
270. Dilman, V.M., S.Y. Revskoy, and A.G. Golubev, *Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging*. *International review of neurobiology*, 1986. **28**: p. 89-156.

271. Willcox, D.C., et al., *Life at the extreme limit: phenotypic characteristics of supercentenarians in Okinawa*. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 2008. **63**(11): p. 1201-8.
272. Tedone, E., et al., *Leukocyte telomere length and prevalence of age-related diseases in semisupercentenarians, centenarians and centenarians' offspring*. Experimental gerontology, 2014. **58**: p. 90-5.
273. Terry, D.F., et al., *Lower all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in centenarians' offspring*. Journal of the American Geriatrics Society, 2004. **52**(12): p. 2074-6.
274. Tenover, J.S., et al., *Decreased serum inhibin levels in normal elderly men: evidence for a decline in Sertoli cell function with aging*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1988. **67**(3): p. 455-9.
275. Nieschlag, E., et al., *Reproductive functions in young fathers and grandfathers*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1982. **55**(4): p. 676-81.
276. Pincus, S.M., et al., *Older males secrete luteinizing hormone and testosterone more irregularly, and jointly more asynchronously, than younger males*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(24): p. 14100-5.
277. Barford, A., et al., *Life expectancy: women now on top everywhere*. BMJ, 2006. **332**(7545): p. 808.
278. Franceschi, C., et al., *Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian Multicenter Study on Centenarians (IMUSCE)*. Aging, 2000. **12**(2): p. 77-84.
279. Passarino, G., et al., *Male/female ratio in centenarians: a possible role played by population genetic structure*. Experimental gerontology, 2002. **37**(10-11): p. 1283-9.
280. Regitz-Zagrosek, V., *Sex and gender differences in health*. Science & Society Series on Sex and Science. EMBO reports, 2012. **13**(7): p. 596-603.
281. Van Oyen, H., et al., *Gender differences in healthy life years within the EU: an exploration of the "health-survival" paradox*. International journal of public health, 2013. **58**(1): p. 143-55.
282. Austad, S.N. and A. Bartke, *Sex Differences in Longevity and in Responses to Anti-Aging Interventions: A Mini-Review*. Gerontology, 2015. **62**(1): p. 40-6.
283. Adams, E.R., et al., *Centenarian offspring: start healthier and stay healthier*. Journal of the American Geriatrics Society, 2008. **56**(11): p. 2089-92.
284. Guerresi, P., et al., *Does the longevity of one or both parents influence the health status of their offspring?* Experimental gerontology, 2013. **48**(4): p. 395-400.
285. Ostan, R., et al., *Metabolic syndrome in the offspring of centenarians: focus on prevalence, components, and adipokines*. Age, 2013. **35**(5): p. 1995-2007.
286. Bandeen-Roche, K., et al., *Phenotype of frailty: characterization in the women's health and aging studies*. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 2006. **61**(3): p. 262-6.
287. Varadhan, R., et al., *Stimulus-response paradigm for characterizing the loss of resilience in homeostatic regulation associated with frailty*. Mechanisms of ageing and development, 2008. **129**(11): p. 666-70.

288. Ostan, R., et al., *Gender, aging and longevity in humans: an update of an intriguing/neglected scenario paving the way to a gender-specific medicine*. *Clinical science*, 2016. **130**(19): p. 1711-25.

