

# Nuove strategie ormetiche per contrastare il processo di invecchiamento: il protocollo D.A.N.I. (dynamic antiaging nutritional intervention)

Ettore Bergamini

## RIASSUNTO.

È assodato che l'invecchiamento, essenziale concausa di tutte le malattie età-associate, dipende in larga misura da un progressivo aumento nelle cellule del numero di mitocondri e perossisomi alterati e quindi dello stress ossidativo. Gli studi sul meccanismo anti-invecchiamento della restrizione calorica hanno rivelato che questo circolo vizioso perverso può essere prevenuto attivando il processo di autofagia (meccanismo che promuove la degradazione selettiva degli organuli cellulari alterati) con interventi di natura dietetica e di incremento della attività fisica e con l'aiuto di farmaci, e può poi essere contrastato potenziando le difese antiossidanti cellulari mediante somministrazione di acidi grassi poli-insaturi e di nutraceutici. I due tipi di intervento operano con meccanismi e tempi diversi e possono avere effetti additivi, e sono stati combinati fra loro in protocolli di intervento (D.A.N.I.: Dynamic Antiaging Nutritional Intervention) molto efficaci sia nell'animale che nell'uomo.

## ABSTRACT

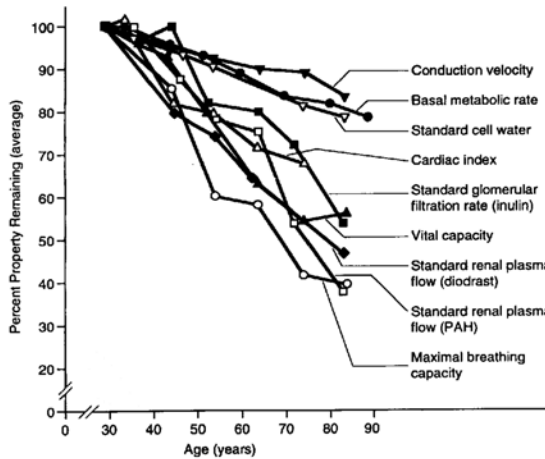
Biological aging, an essential concause of all age-associated diseases, largely results from an age-dependent accumulation of altered mitochondria and peroxisomes and a secondary increase in oxidative stress. Discovery of the antiaging mechanism of dietary restriction unravelled that this vicious circle can be broken by the stimulation of autophagy (by caloric restriction and physical activity and drugs) and that its effects can be minimized by an enforcement of antioxidant defences (via the administration of polyunsaturated fatty acids and functional foods). These two different types of antiaging intervention may have additive effects and can be combined to set antiaging protocols (DANI: Dynamivc Antiaging Nutritional Intervention) that prove to be highly effective both in rodents and humans .

## 1. L'INVECCHIAMENTO, I SUOI EFFETTI E LE MALATTIE ETÀ-ASSOCIATE

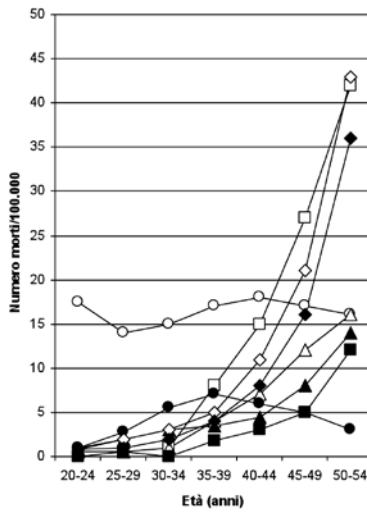
E' consuetudine definire l'invecchiamento in modo descrittivo, come una progressiva alterazione della struttura e delle funzioni di tutti gli organi ed apparati, che si manifesta fin dall'età adulta praticamente in tutti gli esseri viventi (1), e che si associa ad una ridotta capacità di rispondere agli stress ambientali ed a un aumento della probabilità di andare incontro a malattie e a morte. Ormai tutti i gerontologi ritengono che le alterazioni causate dall'invecchiamento siano conseguenza dello sbilanciamento tra gli effetti dei fattori responsabili del danno biologico (endogeni – radicali tossici dell'ossigeno (ROS) prodotti dal metabolismo – e esogeni – quali la luce per il fotoinvecchiamento cutaneo o le polveri fini per l'invecchiamento del polmone) e l'efficacia dei processi riparativi (2). Tanto più grande è questo sbilanciamento, tanto più rapido sarà l'invecchiamento.

Per effetto del divario tra danneggiamento e riparazione, nelle cellule e nei tessuti si accumulano mutazioni (3) e proteine e organuli alterati (4) in quantità progressivamente crescenti, e contestualmente si riducono tutte le funzioni. Nell'uomo, il progressivo declino dell'organismo si manifesta dal termine dello sviluppo, cioè dopo l'età di 30 anni (Fig. 1; 5); ed è proprio a partire dai 30 anni che si constata un progressivo aumento della frequenza di tutte le malattie età-associate (Fig. 2, da 6), che quindi – a rigor di logica – dovrebbero essere chiamate malattie invecchiamento-associate. La diversità della terminologia non ha solo rilevanza semantica: rende chiaro infatti che se non ci fosse l'invecchiamento non ci sarebbero tutte queste malattie, e che se l'invecchiamento fosse ritardato sarebbe ritardata anche la comparsa delle malattie invecchiamento-associate, e ridotta la loro prevalenza. Se l'invecchiamento è il fattore di rischio essenziale di tutte le malattie della età anziana, perché allora non combatterlo?

Oggi si può invitare ad un fattivo ottimismo, e dimenticare vecchi tabù, che dipingevano l'invecchiamento come fatto ineluttabile o addirittura come castigo divino. Oggi l'invecchiamento può essere contrastato in modo efficace. I geni determinano le grandi differenze di longevità delle diverse specie, ma contano poco nel determinare le differenze di longevità e salute tra singoli individui (contano meno del 30%). Molto più (70%) dipende dalle scelte di stile di vita (7) e dalle loro conseguenze sui meccanismi di mantenimento della qualità delle cellule. I gerontologi ormai hanno scoperto le cause e i meccanismi dell'invecchiamento e degli interventi anti-invecchiamento, e sanno come contrastare il decadimento senile e prevenire ad un tempo la comparsa di tutte le principali malattie dell'età anziana (cardio e cerebrovascolari, degenerative, neoplastiche, diabetiche ecc.). Ciò che ostacola la prevenzione gerontologica non è la mancanza di conoscenza, ma il fatto che occorre cominciare a combattere l'invecchiamento quando si è ancora giovani, e purtroppo ancora non si pensa alla vecchiaia (8).



**Figura 1.** Effetto dell'età sulle funzioni di alcuni organi ed apparati (ridisegnata dai dati di uno studio trasversale (N. Shock, 5)). Pur con pendenze diverse, tutte le funzioni sembrano ridursi con un andamento esponenziale negativo, qui reso lineare con l'uso di una scala semilogaritmica.



**Figura 2.** Effetto dell'età anagrafica sulla mortalità (numero di morti per 100000 abitanti) per malattia nella popolazione femminile negli USA nell'anno 1999. Nel grafico a sinistra l'asse delle ordinate è stato espanso di 100 volte. Sulle ascisse classi di età. La mortalità per malattie età associate aumenta con un andamento progressivo di natura esponenziale a partire dai 30 anni di età. (adattato da [www.cdc.gov/nchs/data/sttab/vs00199\\_tabl21or.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/sttab/vs00199_tabl21or.pdf)). CLRD: malattie croniche delle vie respiratorie inferiori; DM: diabete mellito; IHD: cardiopatia ischemica; AD: malattia di Alzheimer.

## 2. PERCHÉ SI INVECCHIA

Molti ritengono che l'invecchiamento dipenda in larga misura dagli effetti dei ROS prodotti dal normale metabolismo cellulare (Fig. 3; 9). Le nostre cellule producono energia bruciando gli alimenti in modo non perfettamente "pulito": solo il 99% dell'ossigeno che consumiamo produce energia pulita, 1% genera ROS. Questa quantità apparentemente modesta, con il tempo causa danni ingenti: ogni nostra cellula deve neutralizzare circa 100 milioni di ROS e riparare 10000 lesioni (cioè mutazioni) del proprio DNA ogni giorno (10).

Il danno in parte è inevitabile, perché il livello basale dello stress ossidativo non può essere soppresso senza danno perché certifica il buon funzionamento della cellula. La assunzione di anti-ossidanti è però consigliabile nei soggetti di età matura o anziana, le cui cellule non sono più integre. I ROS sono prodotti principalmente da mitocondri, perossisomi, e membrane del reticolo endoplasmatico (in queste ultime, la quantità dei ROS è funzione del carico di sostanze chimiche da detossificare); e l'invecchiamento provoca l'accumulo nelle cellule di mitocondri, perossisomi e membrane alterati e malfunzionanti, che generano maggiori quantità dei ROS per unità di lavoro svolto. Si genera così un circolo vizioso che accelera l'invecchiamento (11) e quindi va contrastato.

Lo spazio per un intervento anti-invecchiamento può essere sempre cercato a livello dei meccanismi di riparazione. Le cellule sono dotate di meccanismi che mantengono l'integrità delle cellule, efficaci ma non perfetti, attivi a livello molecolare, subcellulare e cellulare (Tabella 1). Ad esempio, le nostre cellule riescono a riparare solo 9999 delle 10000 lesioni giornaliere al DNA, e quindi ogni giorno una nuova mutazione si accumula nel loro DNA (10). (Probabilmente, ciò detta la longevità della specie, ponendo necessariamente il limite della vita delle cellule perenni, quali le cellule nervose, che in età più o meno avanzata muoiono, cariche di mutazioni, in apoptosi, senza poter essere rimpiazzate).

L'accumulo nelle cellule di organuli alterati – che condiziona la longevità dei singoli individui - è almeno in parte conseguenza dell'imperfezione dei meccanismi riparativi. Infatti segue il declino con l'età della funzione della autofagia (13), il processo che individua, isola in vacuoli e degrada i mitocondri, i perossisomi e le citomembrane danneggiati (Figura 4; 14 e dati non pubblicati). La rimozione di questi organuli, è un prerequisito indispensabile per la loro sostituzione, e può avvenire solo quando le cellule devono supplire alla mancanza di cibo proveniente dall'esterno degradando proprie componenti (15). Di regola ciò avviene quando il nostro organismo è a digiuno e sente fame.

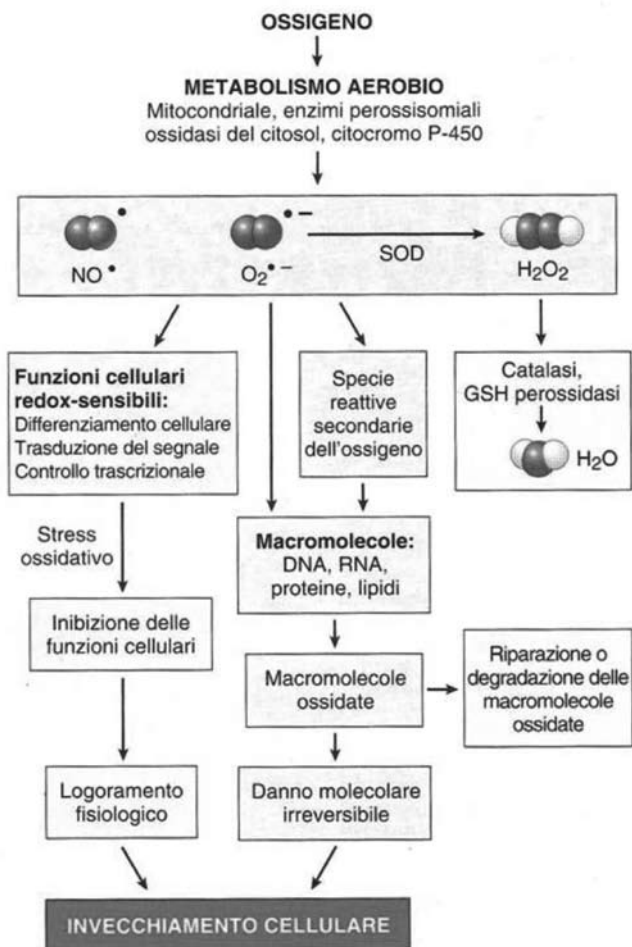
La funzione della autofagia è modulabile con l'alimentazione (è sotto controllo ormonale: è repressa da insulina e IGF-1 e da una aminoacidemia elevata - e quindi

è poco attiva nell'individuo ben nutrito - ed è stimolata dagli ormoni controinsulari; Figura 5; 15). La riduzione senile della sensibilità al controllo endocrino di tutte le cellule e tutti i tessuti affievolisce il controllo della funzione dell'autofagia e rende irreversibile il processo (16). Così si genera un circolo vizioso perverso: la prolungata soppressione della autofagia nei soggetti abituati ad alimentarsi senza limite ("alimentati a piacere") favorisce l'accumulo di recettori alterati e malfunzionanti nelle membrane cellulari, affievolisce la sensibilità al controllo ormonale, e col tempo compromette la funzione di regolazione della autofagia fino a rendere inutilizzabile questo importante meccanismo di riparazione (17). Per vivere a lungo e sani bisogna saper sopportare la fame, di tanto in tanto, limitando l'apporto calorico fin da quando si è giovani, per prevenire la comparsa di questo circolo vizioso perverso.

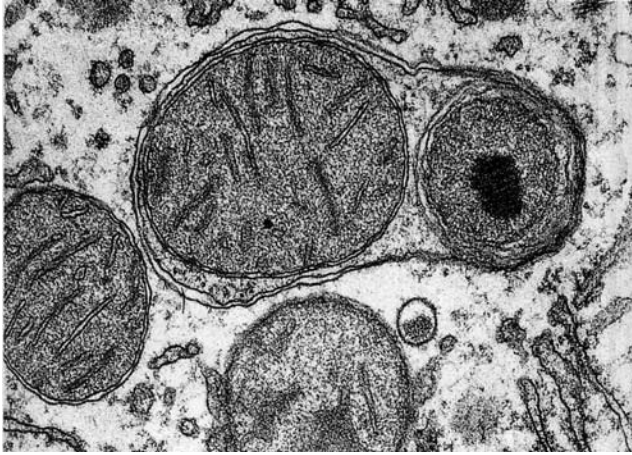
Tabella 1. Meccanismi di controllo della qualità cellulare ad effetto anti-invecchiamento

<b>Meccanismo</b>	<b>Declino senile</b>	<b>Interventi farmacologici anti-invecchiamento</b>
<b>A livello molecolare</b>		
Riparazione del DNA	non provato	nessuno
Proteolisi		
Proteasomica	si	nessuno
Lisosomiale	si	nessuno
Rimpiazzo acidi grassi	non provato	Somministrazione di PUFA
<b>A livello subcellulare</b>		
Autofagia	si	Farmaci antilipolitici Rapamicina Mimetici della restrizione calorica?
<b>A livello cellulare e tissutale</b>		
Apoptosi	si	Stimolatori dell'autofagia? Nutraceutici antiossidanti?

Da (10), aggiornato.



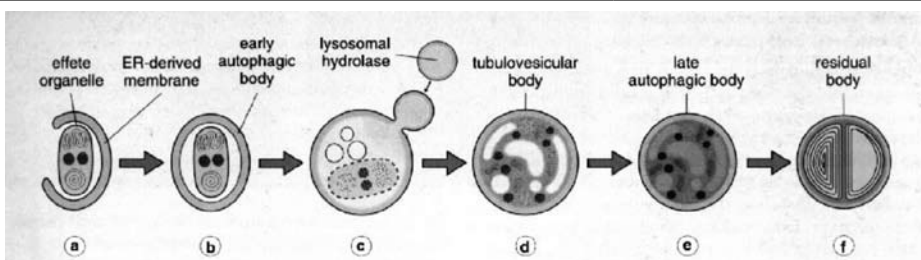
**Figura 3. Stress ossidativo e invecchiamento.** Il metabolismo ossidativo genera metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROS: e.g. anione superossido, acqua ossigenata, ossido di azoto), che possono essere inattivati dalle difese antiossidanti dell'organismo o dare origine ad una varietà di metaboliti reattivi secondari quali il perossinitrito. I ROS possono reagire con le macromolecole cellulari causando modificazioni ossidative sia reversibili che irreversibili. L'accumularsi di danni irreversibili contribuisce all'invecchiamento e a molte malattie. Tra le difese antiossidanti idrosolubili possono essere ricordati il glutathione, la vitamina C, gli urati ed enzimi quali la SOD (superossidodismutasi). Nelle membrane fungono da antiossidanti (cioè catturano e trasferiscono i gruppi reattivi) gli acidi grassi polinsaturi, il dolcicololo, l'ubichinone, la vitamina E e gran parte degli antiossidanti vegetali (polifenoli, resveratrolo, carotenoidi ecc.) (da [9] modificato).



**Figura 4.** Questa micrografia elettronica (da Don Fawcett e Daniel Friend/Photo researchers) mostra un mitocondrio e un perossisoma sequestrati all'interno di un vacuolo autofagico delimitato da doppia membrana. Il vacuolo era destinato a fondersi con un lisosoma che ne avrebbe digerito il contenuto. Si può scommettere che lisosoma e perossisoma erano tra gli organuli cellulari più vecchi e alterati.

Riduzione dei livelli plasmatici di GLUCOSIO, AMINO ACIDI, INSULINA, GFs,  
Aumento dei livelli di GLUCAGONE e GLUCOCORTICOIDI

### ATTIVAZIONE DELLA AUTOFAGIA



#### Liberazione di nutrienti

Mortimore GE and Poso AR  
Annu Rev Nutr 7: 539-64, 1987

#### Accelerazione del ricambio di proteine e organuli cellulari

**Figura 5.** Controllo endocrino e metabolico del processo di autofagia (Disegno tratto in parte e modificato da Stevens, Lowe e Scott, Patologia, CEA, Milano 2010)

### 3. COME SI PUÒ CONTRASTARE LA PROGRESSIONE DELL'INVECCHIAMENTO

La ricerca gerontologica ha individuato quattro interventi dotati di azione anti-invecchiamento:

1. La restrizione dell'apporto calorico;
2. L'esercizio fisico;
3. L'elevato apporto dietetico di pesce, olio di pesce o acidi grassi poli-insaturi;
4. La assunzione di cibi o bevande ad alto contenuto di antiossidanti di origine vegetale.

La restrizione dell'apporto calorico e l'attività fisica possono contrastare l'invecchiamento in tutte le forme viventi. In particolare, nei roditori entrambe allungano la vita: la restrizione calorica allunga sia la durata mediana che la durata massima della vita, ritarda nel tempo la comparsa delle malattie età-associate e ne riduce l'incidenza, allunga cioè la vita sana contrastando l'invecchiamento biologico (18); l'attività fisica invece avrebbe invece solo l'effetto di prolungare la durata mediana della vita (Tabella 2; 19). Questi effetti benefici si manifestano anche nell'uomo, come è confermato dall'esperienza clinica dei vari specialisti (cardiologi, oncologi, neurologi, diabetologi) impegnati nella prevenzione delle malattie dell'età anziana di loro competenza (tutti suggeriscono di moderare l'assunzione di cibo, di preferire pesce, frutta e verdura, di fare attività fisica). Che gli acidi grassi poli-insaturi omega-3 e molti antiossidanti vegetali abbiano effetti benefici è fatto dimostrato da molti studi epidemiologici (20). E' anche noto che le donne, notoriamente più longeve degli uomini, hanno livelli epatici e plasmatici di acido docoesanoico significativamente più elevati dei maschi (21). Gli effetti sulla longevità della restrizione calorica e di una alimentazione ricca di omega-3 sarebbero additivi (22).



Tabella 2. Effetti della Restrizione calorica e dell'esercizio fisico sulla mortalità di roditori

Età (mesi)	15	20	25	30	35	40	45	50	55
<b>Topi C3B10RF<sub>1</sub> femmine</b>									
Controlli (totale)	0	4	18	22	38	88	100	-	-
(tumore)	0	3	6	11	27	39	39		
CR 60% (totale)	0	0	0	0	1	13	25	45	100
(tumore)	0	0	0	0	1	6	15	18	18
<b>Ratti Long Evans femmine</b>									
Controlli (totale)	0	1	7	44	73	98	100	-	-
Allenati (totale)	0	0	1	27	64	93	100	-	-

*E' riportata la mortalità cumulativa totale e (in corsivo) da neoplasia in funzione della età cronologica. Rielaborato da dati riportati in Mastro EJ, Handbook of Physiology Section 11 – Aging. Oxford University Press, N.,Y., 1995*

#### 4. I MECCANISMI DEGLI INTERVENTI ANTI-INEVECCHIAMENTO E LA FUNZIONE DELL'AUTOFAGIA

Molti indizi fanno pensare che sia gli interventi sull'alimentazione che l'esercizio fisico attivino la autofagia, e favoriscano quindi la degradazione delle componenti cellulari danneggiate preparando il terreno per la loro sostituzione con componenti nuove e ben funzionanti. In altre parole, entrambi i trattamenti contribuirebbero a migliorare la "qualità" di cellule e tessuti accelerando il ricambio delle componenti guaste. La restrizione calorica agirebbe primariamente sugli organi che contengono il pool proteico viscerale, mentre l'attività fisica avrebbe come primo bersaglio la muscolatura scheletrica. Che questa sia la spiegazione dell'effetto anti-invecchiamento è fatto ampiamente documentato nel caso della restrizione calorica (23). Al momento dell'alimentazione, gli animali a questo regime dietetico si gettano avidamente sul cibo e lo consumano in 4-6 ore, e poi trascorrono la parte più lunga della giornata (18-20 ore) in condizioni di digiuno (Fig. 6; 23). Ciò causa un alternarsi di lunghi periodi di digiuno, durante i quali l'autofagia

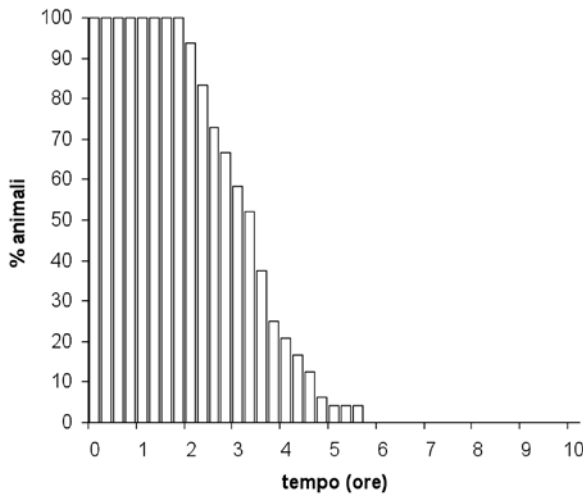
rimuove i materiali danneggiati, e di brevi periodi di ipernutrizione, durante i quali iperglicemia, iperinsulinemia e elevata disponibilità di aminoacidi promuovono l'anabolismo e la sostituzione delle componenti perdute (Fig.7; 23). L'abbondante disponibilità di cibo di buona qualità al termine del digiuno è un requisito altrettanto importante della stimolazione della autofagia ai fini del ringiovanimento: solo così, infatti, si potrà assicurare il rimpiazzo di tutti gli organuli perduti, evitando atrofie da inanizione dei tessuti .

Per l'attività fisica le prove sono meno certe. Si sa però che l'attività fisica accelera il ricambio muscolare a seguito del danneggiamento che tale attività provoca su proteine, membrane e organuli, ponendo le basi per la loro degradazione e l'escrezione nelle urine di prodotti di ossidazione non riciclabili (24). La accelerazione del ricambio contrasta l'accumulo senile di mitocondri alterati nelle fibre muscolari (25). E' interessante notare che dati recentissimi non ancora pubblicati dimostrano che stimolazione dell'autofagia e esercizio fisico hanno effetti additivi sulla escrezione urinaria di 8-OHdG, sostanza verosimilmente derivata dalla degradazione di mitocondri danneggiati.

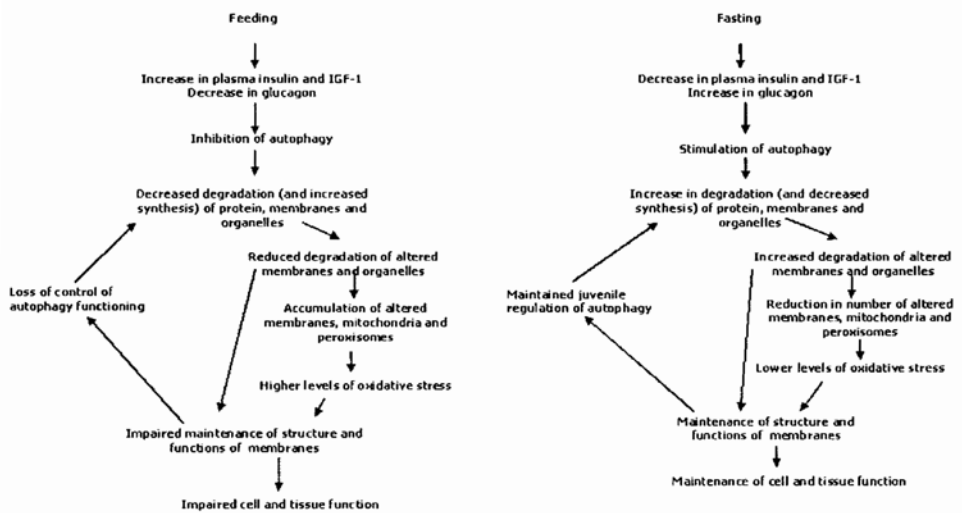
Per comprendere come gli acidi grassi poli-insaturi possano ritardare l'invecchiamento occorre ricordare come organuli e citomembrane siano protetti dall'azione lesiva dei ROS. E' stato proposto che nelle membrane esista un meccanismo capace di intrappolare e convogliare i ROS al citosol per la neutralizzazione (26). Questo meccanismo avrebbe molte analogie con il parafulmine di Benjamin Franklin, che cattura e scarica a terra i fulmini. Anche in questo meccanismo è individuabile una antenna (gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi, che catturano i radicali), un cavo di connessione (il dolicolo, parente del colesterolo e dell'ubichinone, molecola altamente insatura, posta tra i due foglietti del doppio strato lipidico, a strettissimo contatto con un migliaio di acidi grassi, vedi 27) e un cavo di terra (l'ubichinone). L'efficienza di questo meccanismo si affievolisce negli animali anziani a dieta libera per l'aumento del rapporto tra acidi grassi monoinsaturi e PUFA nei fosfolipidi (28). L'assunzione di una dieta ricca di PUFA previene questa alterazione (28) e può così mantenere buona la capacità delle membrane di proteggere le proprie proteine dal danno ossidativo.

Gli antiossidanti di origine vegetale, assunti con la dieta, assorbiti e penetrati in circolo, si possono inserire nelle membrane delle cellule animali conferendo loro le potenti difese di cui i vegetali si sono dotati per sopravvivere in condizioni ambientali estreme. Il loro impiego richiede qualche cautela, perché i meccanismi di azione non sono ancora ben noti, e note non sono le interazioni e le interferenze con i dispositivi antiossidanti delle membrane animali. Ad esempio, il resveratrolo da solo può aumentare la sensibilità alla lipoperossidazione di cellule isolate (aumentando la produzione di malondialdeide e il consumo di vitamina E e ubichi-

none) e invece esercita un significativo effetto di protettivo in presenza di miscele di polifenoli dell'uva rossa. Questi risultati confermano le conclusioni raggiunte da James Joseph studiando gli effetti neuroprotettivi di molti antiossidanti vegetali (di mirtillo, fragola ecc.): queste sostanze sarebbero più utili se assunte in forma di sistemi complessi, cioè con i cibi o nel rispetto delle proporzioni naturalmente presenti negli alimenti naturali (29).



**Figura 6.** Il tempo richiesto dagli animali (ratti maschi Sprague Dawley dell'età di 3 mesi) a restrizione calorica del 40% per consumare tutta la razione di cibo ricevuta varia tra 2 ore (per i più voraci) e 5 ore e 30, con un tempo mediano di circa 3 ore. Terminato il cibo, gli animali dovranno poi affrontare un lungo periodo di digiuno attivando lipolisi e processi degradativi.



**Figura 7.** Negli animali a restrizione calorica l'alternarsi di periodi di digiuno e di buona alimentazione mantiene elevato il ricambio e previene l'accumulo di danni nelle cellule (da 23).

## 5. L'ATTIVAZIONE FARMACOLOGICA DEL PROCESSO DI AUTOFAGIA: VANTAGGI E SVANTAGGI

E' ormai certo che l'autofagia ha un ruolo importantissimo nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e nel ricambio delle proteine residenti e degli organuli cellulari danneggiati o funzionalmente ridondanti (30). Nell'ultimo decennio è stato dimostrato che oltre a produrre substrati ossidabili quando il nutrimento scarseggia questo processo protegge dall'invecchiamento e da tutte le malattie che nell'invecchiamento trovano un fattore di rischio o di aggravamento, inclusi tumori, neurodegenerazioni (31), cardiopatie (32), diabete e infezioni (30).

Come si è detto, l'autofagia è una parte essenziale del meccanismo anti-invecchiamento della restrizione calorica (23). La restrizione calorica attiva l'autofagia con i meccanismi fisiologici (cioè abbassando l'insulinemia e innalzando i livelli degli ormoni controinsulari) durante la fase di digiuno. Purtroppo nel corso dell'evoluzione la funzione del processo è stata sottodimensionata per favorire la crescita e il rapido conseguimento del successo riproduttivo (un fenomeno ben noto ai genetisti, battezzato con il nome di pleiotropia antagonista). Inoltre, l'efficacia dell'intervento dietetico si affievolisce rapidamente con l'aumentare dell'età (e quasi si annulla fin dall'età matura) per la riduzione della sensibilità dei tessuti anziani al controllo metabolico e endocrino (16).

Può quindi essere utile ricorrere a farmaci che attivino il processo di autofagia. Tra questi, l'ACIPIMOX, farmaco antilipolitico da tempo in commercio come ipotrigliceridemizzante e ipocolesterolemizzante, è certamente la scelta più semplice e sicura in quanto corregge il sottodimensionamento dei fenomeni degradativi intensificando l'azione del controllo fisiologico, praticamente senza effetti collaterali indesiderati. Somministrato durante il digiuno, riducendo l'afflusso di acidi grassi ai tessuti, ACIPIMOX abbassa la glicemia e l'insulinemia e esalta l'aumento degli ormoni controinsulari, e rende così più intense le risposte endocrine al digiuno (33,34). ACIPIMOX, assunto a digiuno, promuove l'escrezione urinaria di 8-OH-desossiguanosina (indice di un aumento della degradazione dei mitocondri alterati) sia nei roditori che nell'uomo (in preparazione). Nei roditori di età matura, il trattamento corregge in pochi giorni l'ipercolesterolemia senile e, se associato a restrizione calorica, ripristina la regolarità del controllo metabolico ed endocrino del processo di autofagia. Anche nell'uomo, ACIPIMOX corregge in breve tempo molte alterazioni metaboliche tipiche dell'età anziana (dati non ancora pubblicati).

Sembra che risultati anti-invecchiamento significativi possano essere ottenuti anche con la somministrazione di farmaci che stimolano l'autofagia agendo direttamente su mTOR (Rapamicina – Sirolimus - o del suo derivato Everolimus) (35). Sono recentissime le dimostrazioni che il trattamento con questo antibiotico ritarda l'invecchiamento e allunga la vita del lievito (36), di *C. elegans* (37) e dei roditori (38). In modelli sperimentali è stato accertato che la rapamicina può avere effetti positivi anche in patologie età-associate quali le lesioni da ischemia/riperfusion (39), le malattie neurodegenerative (40); l'invecchiamento cardiaco (41). Non va dimenticato però che questi farmaci hanno un effetto immunodepressivo e citostatico (sono in via di sperimentazione come anti-leucemici e sono impiegati con successo per prevenire il rigetto dei trapianti: e.g. 42), e che un uso continuato aumenta il rischio di diabete e causa ipertensione e dislipidemia (ipertrigliceridemia e ipercolesterolemia) (43) sensibile alla somministrazione di acidi grassi polinsaturi omega-3 (44).

## 6. IL PROTOCOLLO D.A.N.I. (DYNAMIC ANTIAGING NUTRITIONAL INTERVENTION)

La scoperta del meccanismo dell'azione anti-invecchiamento della restrizione calorica ha fatto comprendere che il segreto di una vita lunga e sana sta nella rapidità del ricambio di tutte le componenti delle nostre cellule e dei nostri tessuti, e che, come si è detto, il ricambio va ottenuto avvicinando momenti di degradazione con momenti di sintesi, cioè in un intervento di tipo ometico. Abbracciare

questo concetto, in apparenza semplice, quasi banale, porta a cambiamenti di prospettiva rivoluzionari. Ad esempio, cambia la percezione del significato biologico delle relazioni tra bioritmi, invecchiamento, salute, prevenzione delle malattie e longevità (45); travolge dogmi di nutrizionisti, esperti di metabolismo e endocrinologi, tutti volti a minimizzare l'ampiezza delle escursioni dei valori omeostatici; aiuta anche a comprendere sorprendenti coincidenze di effetti di fattori dotati di azioni fra loro opposte quando siano applicati continuativamente nel tempo (ad esempio, spiega perché terapia la HAART, antiproteasica, e la terapia immunosoppressiva con inibitori di mTOR, che stimolano l'autofagia, causino entrambe ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia, iperglicemia, diabete e sindrome metabolica). Merita osservare che gli effetti dismetabolici dovuti all'effetto pro-invecchiante di HAART possono risentire favorevolmente del trattamento DANI (Tabella 3).

E' facile dedurre che per rendere più efficaci gli interventi anti-invecchiamento conviene avvicinare l'applicazione di due stimoli ad azione fra loro opposta, aumentando la loro intensità in modo bilanciato e sfalsandoli opportunamente nel tempo, regolando poi la frequenza degli avvicendamenti al valore ottimale. Questa strategia è stata seguita nella formulazione del protocollo DANI, in cui si avvicinano stimoli degradativi e anabolizzanti, si potenzia la funzione di degradazione stimolando la funzione della autofagia mediante somministrazione di ACIPIMOX, e si bilancia l'aumento della degradazione con la successiva fase di anabolismo, prendendo come obiettivo il mantenimento del BMI a valori prossimi a quello ottimale dell'individuo. La scelta della frequenza di applicazione di questo ciclo è la cosa più impegnativa. I risultati ottenuti negli animali da esperimento inviterebbero a cicli frequenti, anche giornalieri (nei roditori gli effetti migliori sono ottenuti con restrizioni caloriche giornaliere del 40%, che esauriscono il ciclo digiuno/alimentazione nell'arco di 24 ore; risultati molto soddisfacenti sono ottenuti anche con la nutrizione libera alternata a giorni di digiuno, cioè con cicli della durata di 48 ore; risultati significativi ma quantitativamente molto più modesti si conseguono con un intervento settimanale (46,47). Nell'uomo le uniche indicazioni vengono dal precetto del digiuno periodico presente in tutte le religioni di tradizione millenaria. Cristianesimo e Ebraismo raccomandano un digiuno di frequenza settimanale da continuarsi per tutta la vita, effettuato nel giorno prefestivo (e quindi seguito dal pasto più ricco della settimana); la religione islamica raccomanda invece una frequenza giornaliera limitata però ad un mese (il ramadan) all'anno. Sembra quindi che nell'uomo i tempi non debbano essere molto diversi da quelli dei roditori. Al momento possiamo dire solo che un intervento di frequenza trisettimanale, applicato a giorni alterni, di intensità amplificata con ACIPIMOX, è risultato estremamente efficace nel far regredire in breve tempo alterazioni metaboliche attribuibili ad un invecchiamento accelerato da una terapia HAART della durata

di 3 anni (Tab. 3; e 48) e può ritardare la progressione del processo aterosclerotico. Recentissimamente sono apparsi sul mercato prodotti contenenti i fitocomplessi dell'uva e del vino rossi potenziati con resveratrolo a concentrazione ottimale (Davinin, Revidox). Questi prodotti hanno solo effetti estetici importanti (proteggono la cute dal fotoinvecchiamento, riducono le discromie senili, contrastano la formazione delle rughe). Grazie alla azione anti-radicalica, il loro abbinamento con il protocollo DANI si è dimostrato prezioso, consentendo addirittura di migliorare quadri di ischemia miocardica silente (non pubblicato).

Tabella 3. Effetti favorevoli della adozione del protocollo DANI da parte di un paziente Hiv positivo sottoposto a terapia HAART per tre anni

Mesi di trattamento DANI	0	1	3	5
Età (anni)	49			
Altezza (cm)	174			
Peso corporeo (Kg)	72		72	70,5
Glicemia a digiuno (mg/dl)	110	109	90	92
Insulinemia (nU/ml)		48	43	17
Indice HOMA		12	9,5	3,9
Colesterolo totale (mg/dl)	284	228	221	213
Trigliceridi (mg/100 ml)	566	148	194	133

## BIBLIOGRAFIA

1. MASORO EJ. *Biochemical and molecular mechanisms of aging: from model systems to human longevity*. Preface. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1790(10):949-50.
2. MASORO EJ. *Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: a critique of proposed mechanisms*. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1790(10):1040-8.
3. DUBEY A, FORSTER MJ, LAHL H, SOHAL RS. *Effects of age and caloric restriction on protein oxidation on different brain regions and on behavioural functions of the mouse*. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333: 189-197.
4. SOHAL RS, DUBEY A. *Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging*. *Free Rad Biol Med* 1994; 16: 921-926.
5. SHOCK NW. *Age changes in some physiologic processes*. *Geriatrics*. 1957;12:40-8.
6. DUNAIF A. *Women's health*. In Harrison's Principles of Internal Medicine, (Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo D, Jameson LJ eds) cap 5, p. 29.
7. SHIMIZU T, SHIRASAWA T. *The present and future of antiaging*. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2008 Jan;35(1):1-5.
8. MILLER RA. *"Dividends" from research on aging--can biogerontologists, at long last, find something useful to do?* *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009; 64:157-60
9. WEINDRUCH R, SOHAL RS. *Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging*. *N Engl J Med*. 1997; 337:986-94.
10. KARP G, *Cell and molecular biology*. 3<sup>rd</sup> Ed. Wiley & Sons, N.Y., 2002, p. 572
11. MA YS, WU SB, LEE WY, CHENQ JS, WEI YH. *Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging*. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1021-1029
12. BERGAMINI E. *Targets for antiageing drugs*. *Expert Opin Ther Targets*. 2005; 9:77-82.
13. DONATI A, CAVALLINI G, PARADISO C, VITTORINI S, POLLERA M ET AL. *Age-related changes in the regulation of autophagic proteolysis in rat isolated hepatocytes*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001; 56: B288-93
14. CAVALLINI G, DONATI A, TADDEI M, BERGAMINI E. *Evidence for selective mitochondrial autophagy and failure in aging*. *Autophagy*. 2007; 3: 26-7
15. MORTIMORE GE, PÖSÖ AR, LARDEUX BR. *Mechanism and regulation of protein degradation in liver*. *Diabetes Metab Rev*. 1989; 5: 49-70.
16. DONATI A, RECCHIA G, CAVALLINI G, BERGAMINI E. *Effect of aging and anti-aging caloric restriction on the endocrine regulation of rat liver autophagy*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008; 63: 550-5.
17. DEL ROSO A, VITTORINI S, CAVALLINI G, DONATI A, GORI Z, MASINI M, POLLERA M, BERGAMINI E. *Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis*. *Exp Gerontol*. 2003; 38:519-27



18. PUGH TD, KLOPP RG, WEINDRUCH R. *Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys*. Neurobiol Aging. 1999;20:157-65
19. HOLLOSZY JO. *Minireview: Exercise and longevity*. Studies on rats. J Gerontol 1988; 43: B149-151
20. ROCKENFELLER P, MADEO F. *Ageing and eating*. Biochim Biophys Acta. 2010 Jan 13. [Epub ahead of print]
21. CHILDS CE, ROMEU-NADAL M, BURDGE GC, CALDER PC *The polyunsaturated Fatty Acid composition of hepatic and plasma lipids differ by both sex and dietary fat intake in rats*. J Nutr. 2010; 140:245-50..
22. JOLLY CA, MUTHUKUMAR A, AVULA CP, TROYER D, FERNANDES G. *Life span is prolonged in food-restricted autoimmune-prone (NZB x NZW)F(1) mice fed a diet enriched with (n-3) fatty acids*. J Nutr. 2001;131:2753-60.
23. BERGAMINI E, CAVALLINI G, DONATI A, GORI Z. *The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction*. Ann N Y Acad Sci. 2007; 1114:69-78..
24. ORHAN H, VAN HOLLAND B, KRAB B, MOEKEN J, VERMEULEN NP, HOLLANDER P, MEERMAN JH. *Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine excretion in humans*. Free Radic Res. 1997; 26:507-14.
25. FIGUEIREDO PA, POWERS SK, FERREIRA RM, AMADO F, APPELL HJ, DUARTE JA. *Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2009; 64:927-39.
26. BERGAMINI E, BIZZARRI R, CAVALLINI G, CERBAI B, CHIELLINI E, DONATI A, GORI Z, MANFRINI A, PARENTINI I, SIGNORI F, TAMBURINI I. *Ageing and oxidative stress: a role for dolichol in the antioxidant machinery of cell membranes?* J Alzheimers Dis. 2004; 6:129-35
27. SWIEZEWSKA E, DANIKIEWICZ W. *Polyisoprenoids: structure, biosynthesis and function*. Prog Lipid Res. 2005;44:235-58.
28. TAMBURINI I, QUARTACCI MF, IZZO R, BERGAMINI E. *Effects of dietary restriction on age-related changes in the phospholipid fatty acid composition of various rat tissues*. Aging Clin Exp Res. 2004; 16:425-31
29. JOSEPH JA, NADEAU D, UNDERWOOD A. *The color code*. Hyperion, N.Y., 2002
30. MEIJER AJ, CODOGNO P. *Autophagy: regulation and role in disease*. Crit Rev Clin Lab Sci. 2009;46:210-40
31. YU WH, DORADO B, FIGUEROA HY, WANG L, PLANEL E, COOKSON MR, CLARK LN, DUFF KE. *Metabolic activity determines efficacy of macroautophagic clearance of pathological oligomeric alpha-synuclein*. Am J Pathol. 2009; 175:736-47.
32. INUZUKA Y, OKUDA J, KAWASHIMA T, KATO T, NIIZUMA S, TAMAKI Y, IWANAGA Y, YOSHIDA Y, KOSUGI R, WATANABE-MAEDA K, MACHIDA Y, TSUJI S, ABURATANI H, IZUMI T, KITA T, SHIOI T. *Suppression of phosphoinositide 3-kinase prevents cardiac aging in mice*. Circulation. 2009; 120):1695-703.

36. ALVERS AL, WOOD MS, HU D, KAYWELL AC, DUNN WA JR, ARIS JP. *Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin*. 4. *Autophagy*. 2009; 5:847-9.
37. HANSEN M, CHANDRA A, MITIC LL, ONKEN B, DRISCOLL M, KENYON C. *A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in C.elegans*. *PLoS Genet*. 2008 Feb;4(2):e24
38. HARRISON DE, STRONG R, SHARP ZD, NELSON JF, ASTLE CM, FLURKEY K, NADON NL, WILKINSON JE, FRENKEL K, CARTER CS, PAHOR M, JAVORS MA, FERNANDEZ E, MILLER RA. *Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice*. *Nature*. 2009; 460(7253):392-5
39. SUYANI E, DERICI UB, SAHIN T, OFLUOGLU E, PASAOGLU H, ERDEM O, BARIT G, REIS KA, ERTEN Y, ARINSOY T, SINDEL S. *Effects of everolimus on cytokines, oxidative stress, and renal histology in ischemia-reperfusion injury of the kidney*. *Ren Fail*. 2009;31:698-703
40. YU WH, DORADO B, FIGUEROA HY, WANG L, PLANEL E, COOKSON MR, CLARK LN, DUFF KE. *Metabolic activity determines efficacy of macroautophagic clearance of pathological oligomeric alpha-synuclein*. *Am J Pathol*. 2009; 175:736-47.
41. INUZUKA Y, OKUDA J, KAWASHIMA T, KATO T, NIIZUMA S, TAMAKI Y, IWANAGA Y, YOSHIDA Y, KOSUGI R, WATANABE-MAEDA K, MACHIDA Y, TSUJI S, ABURATANI H, IZUMI T, KITA T, SHIOI T. *Suppression of phosphoinositide 3-kinase prevents cardiac aging in mice*. *Circulation*. 2009; 120:1695-703
42. KOFLER S, BIGDELI AK, KACZMAREK I, KELLERER D, MÜLLER T, SCHMOECKEL M, STEINBECK G, UBERFUHR P, REICHART B, MEISER B. *Long-term outcomes after 1000 heart transplantations in six different eras of innovation in a single center*. *Transpl Int*. 2009; 22:1140-50
43. B.L. KASISKE, A. DE MATTOS, S.M. FLECHNER, L. GALLON, H.U. MEIER-KRIESCHE, M.R. WEIR and A. WILKINSON. *Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Dyslipidemia in Kidney Transplant Recipients*. *Am J Transplantation* 2008; 8: 1384-1392
44. S. CELIK, A. DOESH, C. ERBEL, E. BLESSING, K. AMMON, A. KOCH, H.A. KATUS, T.J. DENGLER *Beneficial effects of omega-3 fatty acids on sirolimus- or everolimus-induced hypertriglyceridemia in heart transplant recipients*. *Transplantation* 2008; 86: 245-250
45. GIBSON, E.M, WILLIAMS W.P. III., KRIEGSFELD. L.J. *Aging in the circadian system: consideration for health, disease prevention and longevity*. *Exp Gerontol* 2009; 44: 51-56
46. DUFFY PH, LEWIS SM, MAYHUGH MA, TROTTER RW, THORN BT, FEUERS RJ, TURTURRO A. *The effects of different levels of dietary restriction on non-neoplastic diseases in male Sprague-Dawley rats*. *Aging Clin Exp Res*. 2004;16:68-78
47. DUFFY PH, LEWIS SM, MAYHUGH MA, TROTTER RW, LATENDRESSE JR, THORN BT, FEUERS RJ. *The effects of different levels of dietary restriction on neoplastic pathology in the male Sprague-Dawley rat*. *Aging Clin Exp Res*. 2004;16:448-56.
48. CAVALLINI G, DONATI A, GORI Z, PARENTINI I, BERGAMINI E *Low level dietary restriction retards age-related dolichol accumulation*. *Aging Clin Exp Res*. 2002 Apr;14:152-4.

49. CAVALLINI G, DONATI A, GORI Z, PARENTINI I, BERGAMINI E. *Low level dietary restriction retards age-related dolichol accumulation*. Aging Clin Exp Res. 2002; 14:152-4.
50. E. BERGAMINI, R. PARDELLI. *Dalla ricerca sull'invecchiamento più speranza per i pazienti infetti da Hiv*. Sant'Anna News, 2010, in stampa

