



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di Dottorato in Scienze Biomolecolari e biotecnologiche

***Indirizzo: Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia
Molecolare Clinica***

*Polimorfismi genetici dell'interleuchina 1 e dell'interleuchina 6
nella popolazione sarda con particolare riferimento alle fasce
di età avanzata*

Direttore: Prof. Bruno Masala

Relatore: Prof. Luca Deiana

Dottoranda: Dott.ssa Maria Elena Sini

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

<i>Introduzione</i>	<i>Pag 3</i>
<i>L'invecchiamento: review</i>	<i>Pag 4</i>
<i>Il Progetto AKea: i centenari sardi</i>	<i>Pag.7</i>
<i>I processi infiammatori: le citochine</i>	<i>Pag. 15</i>
<i>Obiettivo</i>	<i>Pag. 26</i>
<i>Materiali e metodi</i>	<i>Pag. 27</i>
<i>Risultati</i>	<i>Pag. 40</i>
<i>Discussione e conclusioni</i>	<i>Pag. 66</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>Pag. 71</i>

1. INTRODUZIONE

Un approccio peculiare alla scienza della longevità è il modello naturale dei centenari.

Gli studi condotti su questo genere di popolazione sono particolarmente interessanti perché offrono la possibilità di conoscere i fattori critici che portano all'invecchiamento con successo. Si tratta infatti di una popolazione che è omogenea per longevità, intendendo con questo termine una lunga vita indipendentemente dalla sua qualità.

La progettazione e la successiva realizzazione di uno studio genetico non è privo di ostacoli e barriere, sia dal punto di vista organizzativo (ricerca dei centenari e loro validazione tramite documenti ufficiali) sia perché viviamo in una società multietnica.

La Sardegna ha tutta una serie di sue caratteristiche che la rendono unica per uno studio di popolazione di questo tipo, che si sta realizzando presso l'Università degli Studi di Sassari, attraverso il Progetto AKeA, acronimo dell'augurio tradizionale del dialetto sardo "A Kent'annos".

2. L'INVECCHIAMENTO: REVIEW

I dati riportati in letteratura indicano che la longevità umana potrebbe essere correlata con l'ottimale funzionamento del sistema immunitario.

Quindi uno dei determinanti genetici della longevità potrebbe risiedere in quei polimorfismi che regolano la risposta immune.

In accordo con ciò, studi effettuati sui topi hanno suggerito che il complesso maggiore di istocompatibilità (MIIC), noto per controllare una varietà di funzioni immuni, è associato con la durata della vita.

Negli ultimi venticinque anni, molti studi che ricercavano il ruolo del gene HLA, (l'umano MIIC) nella longevità umana, hanno confrontato le frequenze alleliche tra gruppi di giovani e persone anziane.

I dati pubblicati, tuttavia, presentano alcune conflittualità.

Infatti lo stesso antigene HLA in alcuni studi figura incrementato, in altri diminuito ed in altri ancora rimane invariato.

La longevità, quindi, è associata con una selezione positiva o negativa di alleli (o aplotipi) che, rispettivamente, conferiscono resistenza o suscettibilità alle malattie mediante il controllo delle risposte immuni attraverso l'espressione di peptici o antigeni non specifici.

L'invecchiamento è un processo che cambia le performance di molti sistemi fisiologici ed incrementa la suscettibilità alle malattie o alla morte.

Si ritiene che con l'invecchiamento si abbia una disregolazione del sistema immune che contribuisce alla morbilità o mortalità nell'uomo, data la grande incidenza di infezioni e tumori; anche i fenomeni autoimmuni sono coinvolti nelle malattie correlate con l'età, come l'aterosclerosi.

Un punto cruciale è strettamente correlato con i cambiamenti delle funzioni delle cellule T. Infatti la funzione di queste ultime è alterata sia "in vitro" che "in vivo", come evidenziato nel confronto fra l'anziano ed il gruppo di giovani controlli, portando ad uno stato definito "immunosenescenza".

In accordo con ciò, diversi studi hanno suggerito una positiva associazione tra il buon funzionamento "in vitro" delle cellule T ed individui longevi.

Recenti studi effettuati negli uomini molto longevi, suggeriscono che la sopravvivenza di essi sia prevedibile sulla base di singoli parametri piuttosto che come gruppi di essi.

Tutto ciò indica che un globale buono stato di conservazione delle funzioni immuni è associato con la longevità estrema.

Sotto questa prospettiva, i centenari sono il miglior esempio di longevità ed invecchiamento con successo, poiché essi si sono sottratti alle maggiori malattie correlate con l'età e si sono spinti oltre il limite della vita umana.

Attualmente numerosi studi sono rivolti ad analizzare il ruolo del network delle citochine nella risposta immunitaria e nella protezione o suscettibilità ad una varietà di malattie.

Si può ipotizzare che questi sistemi giochino un ruolo importante nell'invecchiamento e che particolari polimorfismi delle citochine possono essere rappresentati diversamente nelle persone selezionate per longevità come i centenari.

In particolare lo studio dei polimorfismi delle citochine e dei loro prodotti può essere utile nel verificare il loro ruolo importante nella regolazione della risposta infiammatoria, come è stato dimostrato per alcune interleuchine. Alcuni studi hanno dimostrato che difetti strutturali o regolatori nei geni TNF possono contribuire alla patogenesi delle malattie associate con MHC, specialmente quelle con componenti infiammatori e autoimmuni.

3. IL PROGETTO AKEA: I CENTENARI SARDI

I centenari sono eccezionali individui, che mediante un meccanismo ancora non chiarito, hanno sviluppato un livello di omeostasi biologica che è compatibile con il mantenimento della vita per un'eccezionale periodo di tempo.

I dati attuali suggeriscono che questa estrema longevità non risulta dalla carenza di stimoli ambientali potenzialmente danneggianti, ma è il risultato attribuibile ad una speciale capacità dell'individuo di adattarsi e far fronte alle minacce degli agenti interni ed esterni.

Studi effettuati su gemelli anziani suggeriscono che le componenti genetiche non spiegano più del 25% della variabilità nella longevità.

Tuttavia la vera percentuale è probabilmente più alta; infatti i dati usati per valutare queste valore si riferiscono ad un numero esiguo di coppie di gemelli con età oltre gli 85-90 anni.

7

Dott.ssa Maria Elena Sini Polimorfismi genetici dell'interleuchina 1 e dell'interleuchina 6 nella popolazione sarda con particolare riferimento alle fasce di età avanzata Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica Università degli studi di Sassari

I ricercatori probabilmente valutarono la componente genetica dei disordini che causano una significativa mortalità al di sopra dell'aspettativa di vita.

Al contrario, la vera longevità, è il risultato di interazioni particolarmente favorevoli fra background genetico, ambiente e stile di vita.

Inoltre, i centenari potrebbero essere considerati come degli individui con risorse personali che riducono la loro suscettibilità agli insulti senza riferimento ad uno specifico ambiente.

La capacità di sopravvivere è in parte indipendente dalla capacità di mantenere salute e funzioni perfette; in realtà una sostanziale percentuale di individui centenari ha sperimentato un periodo di tempo relativamente lungo, oltre le aspettative di vita, di salute cagionevole e impedimenti fisici.

La parziale indipendenza della probabilità di sopravvivenza dalle funzioni fisiche e mentali, fa in modo che sia difficile identificare i fattori associati all'eccezionale longevità e invecchiamento con successo.

Quest'ambito può essere verificato soltanto selezionando uno studio di popolazione con grande attenzione, così che la variabilità nei fattori ambientali e genetici sia minimizzata.

Data la lunga storia di isolamento dalle altre popolazioni e bassa immigrazione, il pool genico sardo può essere considerato come molto stabile. Insieme ad uno stile di vita relativamente uniforme in tutta l'isola, queste caratteristiche danno alla Sardegna un particolare vantaggio nello studio dei centenari.

In effetti, le caratteristiche della popolazione di riferimento, la scelta di studio dell'intera popolazione dei centenari che vivono in una ben delimitata area geografica, si configura come un ipotetico modello di ricerca.

In particolare lo studio del DNA dei sardi potrebbe essere d'aiuto svelando i fattori che contribuiscono alla longevità umana e alla eterogeneità dei centenari.

Il maggior problema che ogni studio sulla longevità deve affrontare è il confronto con le differenze storiche, culturali e antropologiche, sebbene interessanti risultati emergano dalla semplice descrizione di uno studio di popolazione confrontato con altri dati italiani e internazionali.

La popolazione dei centenari si è incrementata abbastanza rapidamente nell'ultimo decennio. La prevalenza dei centenari nella popolazione sarda è di 22 ogni 100.000 abitanti.

Il rapporto femmine/maschi è di 2:1 e si arriva quasi ad 1/1 nelle zone centrali ed è sostanzialmente più basso confrontato con i valori riportati in altre realtà; per esempio la percentuale dei maschi centenari in Sardegna è tripla di quella della Danimarca. E' qui che la Sardegna diventa diversa dal resto del mondo.

E' un dato particolare, se si considera che nel resto del mondo questo valore è pari a 6/1.

Questo inusuale rapporto femmine/maschi si deve attribuire a dei fattori che promuovono la longevità negli uomini sardi oppure riducono la longevità nelle donne sarde?

Ancora questi fattori non sono noti.

Una particolare selezione genetica probabilmente causata dalla malaria che consiste nella carenza di un segnale chimico, è tra gli elementi che contribuiscono a creare l'eccezionale fenomeno di longevità.

L'enzima G6PD è carente in misura superiore nei centenari rispetto alla popolazione normale.

AKeA è acronimo di "A Kent'Annos", affermazione diffusa in tutta la Sardegna che augura una lunga vita, oltre cent'anni.

Il progetto AKeA studia da oltre dieci anni il fenomeno della longevità nel territorio sardo, regione nella quale sono presenti costantemente 22 centenari ogni 100.000 abitanti.

Il progetto AKeA è basato sulla metodologia della certificazione: si studiano soltanto gli individui in possesso di documentazione ufficiale e le persone in vita che sottoscrivono il consenso informato e accettano la visita a domicilio dei ricercatori dell'Università di Sassari.

Tale studio viene effettuato da un team di ricerca costituito da demografi, medici, biologi, ognuno con un compito preciso.

I demografi si occupano di effettuare una ricerca dei centenari nati in Sardegna, richiedendo agli Uffici dell'anagrafe dei Comuni, certificato di

nascita, di residenza e di eventuale decesso, si occupano inoltre della costruzione degli alberi genealogici della famiglia cui i centenari o supercentenari appartengono. Parallelamente a questo, i medici e i biologi si occupano di effettuare la compilazione di una cartella clinica per ogni centenario arruolato che se sottoscrive il consenso scritto viene sottoposto a prelievo di sangue.

Successivamente il campione viene utilizzato sia per analisi biochimico-cliniche che per la ricerca di genomica, proteomica, metabolomica e di biologia molecolare.

Il gruppo di ricerca AKeA a tutt'oggi ha raccolto la certificazione di oltre 1800 centenari vissuti e viventi in Sardegna consultando sia gli archivi dei Comuni che riportano certificazioni a partire dal 1886, sia gli archivi Parrocchiali i quali consentono di attingere a documenti datati sino al 1500.

I ricercatori del gruppo AKeA dispongono di un "Laboratorio mobile della longevità" arredato ed equipaggiato con strumenti analitici per indagini biochimico-cliniche, che si reca nei 377 Comuni della Sardegna per studiare oltre i centenari, i novantacinquenni, i novantenni, gli ottantenni ed una popolazione di controllo.

Nei prossimi mesi si arriverà ad avere oltre 2000 centenari certificati e tra questi n° 6 supercentenari (persone che hanno superato i 110 anni di vita) nati in Sardegna: Antonio Todde, nato a Tiana il 22 Gennaio 1889 e morto a Tiana il 3 Gennaio 2002 (età 112 anni 346 giorni); Giovanni Frau nato a

Orroli 29 Dicembre 1890 e morto ad Orroli 19 Giugno 2003 (età 112 anni 172 giorni); Pasquale Frascioni nato a Luogosanto 12 Novembre 1893 e morto ad Aglientu il 16 Marzo 2004 (età 110 anni e 125 giorni); Giuseppa Spolitu Sanna nata a Berchidda il 12 Settembre 1883 e morta a Berchidda 16 Ottobre 1993 (età 110 anni e 34 giorni); Teresa Cesarini nata a Cagliari il 19 Giugno 1894 e morta nel Lazio il 16 Gennaio 2005 (età 110 anni e 215 giorni); Giuseppina Deidda nata a Birori il 25 Gennaio 1900 e attualmente vivente e residente a Birori (età 110 anni e auguriamo ancora molti giorni di vita)

I 6 supercentenari sardi sono conteggiati nei 42 supercentenari italiani compresi nei 984 mondiali riconosciuti dal Gerontology Research Group. I centenari vissuti e viventi in Sardegna sono compresi in più di 900 cognomi; per esempio i Deidda (cognome della supercentenaria in vita) in Sardegna sono 4692 e nella graduatoria dei centenari sono al 28mo posto con n°8 centenari (3 viventi e 5 deceduti) in un elenco decrescente: in questo elenco il primo posto spetta ad un cognome X che ha 23 centenari (tra vivi e morti) in Sardegna, con questo cognome vivono 24587 persone sarde.

Lo studio dei cognomi sardi in rapporto ai centenari certificati elencati nell'”Archivio della Longevità” (ad oggi oltre 1800 certificati) compilato dai ricercatori del progetto AKeA indica come fattore primario il carattere genetico come responsabile della longevità.

Il “caso Sardegna” viene considerato alla stregua di altri paesi del mondo (es. Abkhazia nella Georgia sovietica, il villaggio di Vilcabamba in Ecuador, la popolazione Hunza in Pakistan e l’isola giapponese di Okinawa) dove esagerazioni nel riportare l’età di individui molto anziani soprattutto se maschi non sono state rare e non lo sono ancora; da sottolineare la non verità dei dati giapponesi ultimamente all’attenzione della stampa mondiale. In Sardegna ed in particolare nell’area centrale della Sardegna, con una popolazioni di 200-300mila abitanti, la mortalità maschile dopo gli 85 anni è addirittura inferiore a quella femminile.

Nello studio AKeA l’età dei centenari è stata validata confrontando le informazioni di almeno due fonti: i i registri conservati negli uffici anagrafe dei comuni ed i registri battesimali (Quinque Libri) conservati presso le Parrocchie o gli archivi diocesani.

Anche i fattori culturali sono importanti: stile di vita, tipo di alimentazione, lavoro hanno la loro importanza. Inoltre quasi tutti i centenari ha sempre condotto una vita attiva ed una alimentazione semplice e naturale.

I centenari provengono in generale da famiglie longeve, ma questo non basta a spiegare l’aumento del numero di centenari che si registra in questi anni. Il miglioramento delle condizioni di vita e l’assistenza sanitaria hanno sicuramente giocato un ruolo importante favorendo la sopravvivenza di quegli individui che erano geneticamente predisposti ad avere una lunga vita.

L'originalità dello studio risiede nella possibilità di testare l'ipotesi di una associazione tra alcuni geni e la longevità in una popolazione quale quella sarda che ha caratteristiche genetiche differenti dalla maggior parte delle popolazioni caucasiche.

La longevità umana è attualmente oggetto di numerosi studi in tutti i paesi occidentali. I dati demografici mettono in evidenza un progressivo invecchiamento della popolazione mondiale anche a causa della diminuzione della natalità e dell'aumento dell'età media, dovuta alla costante miglioramento delle condizioni socio sanitarie.

Fra gli individui oggetto di studio nel Progetto AKea rientra al Sig. Antonio Todde di Tiana che ha ottenuto il primato dell'uomo più vecchio del mondo attestato dal Guinness World Record 2001. È stato il più anziano uomo vivente la cui età sia stata certificata attraverso la consultazione dei documenti anagrafici originali e dei certificati di battesimo in possesso degli archivi parrocchiali. Tale primato è stato rivendicato da altri ma finora nessuno tranne il sig. Todde era stato in grado di produrre la documentazione necessaria. La donna più longeva attualmente validata è invece la francese Jeanne Calment deceduta il 4 Agosto 1997 all'età di ben 122 anni.

Al momento della convalida al Guinness World Record 2001 il Todde era vedovo da 11 anni, accudito dalle figlie Laura (79 anni) ed Angela (76 anni). Aveva una cugina anch'essa centenaria; suo padre era morto a 90 anni e

sua madre a 99, mentre la sorella ancora vivente aveva 97 anni. La sua dieta era basata sulla pasta e sulle minestre di verdura, mangiava carne di maiale o di agnello e tutti i giorni beveva un bicchiere e mezzo di vino rosso. Durante la vita camminava lungamente a piedi ed evitava l'automobile; lasciò la Sardegna solo una volta per fare il militare, è stato ferito da una granata durante la I° Guerra Mondiale, nel 1920 sposò la 25enne Mariantonina da cui ebbe due figli e tre figlie.

La prima volta che Todde vide un televisore fu a Nuoro nel '54 e faceva 30 miglia ogni notte per vedere quelle strane creature danzanti. All'età di 110 anni, un po' sordo e con un leggero tremito alle mani, ammetteva di stancarsi facilmente e la sua memoria di tanto in tanto lo tradiva e si sentiva irritato; i familiari dovevano aiutarlo a salire le scale e metterlo a letto. I ricercatori di Sassari hanno attribuito la sua longevità a fattori genetici, alla dieta sarda ed al contesto socio familiare.

4. I PROCESSI INFIAMMATORI: LE CITOCHINE

Le citochine sono una classe eterogenea di proteine secretorie prodotte da vari tipi di cellule, ed hanno la funzione di condizionare il comportamento di altre cellule-specifiche verso cui sono indirizzate. Si comportano quindi da "mediatori" tra le diverse cellule.

La fase effettrice dei meccanismi aspecifici di difesa e dell'immunità mediata da T linfociti nei confronti di organismi estranei, come batteri e virus, è in gran parte mediata da queste proteine con azione di tipo ormonale, prodotte soprattutto dai linfociti T e dai macrofagi.

Esse costituiscono anche il linguaggio molecolare per la comunicazione tra le diverse cellule del sistema immunitario e tra queste e altri sistemi.

Le citochine prodotte dai macrofagi sono chiamate anche monochine, quelle prodotte dai linfociti linfocine, mentre quelle dotate di proprietà chemiotattica sono denominate chemochine. La nomenclatura attuale, considerando che la maggior parte di esse è prodotta e agisce sui leucociti, le ha definite Interleuchine, contrassegnandole con la sigla IL seguita da un numero progressivo man mano che vengono scoperte. Tra le interleuchine sono comprese anche le citochine non prodotte dai leucociti e che non agiscono su di essi.

4.1 CARATTERISTICHE GENERALI DELLE CITOCINE

Si tratta di una famiglia di molecole molto eterogenee, in cui possiamo però identificare alcune caratteristiche comuni:

- * Sono molecole prodotte essenzialmente durante la fase di attivazione e durante la fase effettrice sia dell'immunità naturale che di quella specifica.
- * Alla pari di altri ormoni peptidici, esercitano la loro attività legandosi a specifici recettori presenti sulla superficie delle cellule bersaglio. La cellula bersaglio può essere la stessa produttrice (attività autocrina), una cellula vicina (attività paracrina) o, come nel caso di altri ormoni, una cellula lontana (attività endocrina).
- * I recettori per le citochine hanno un'affinità molto elevata. La loro espressione è regolata da specifici segnali esterni alla cellula, in genere costituiti dalla stessa o da altre citochine; o nel caso dei linfociti dal riconoscimento dell'antigene.
- * La secrezione delle citochine è un fenomeno breve ed autolimitato: non sono accumulate in granuli come molecole preformate, ma prodotte "de novo" in seguito allo stimolo.
- * Numerose citochine sono prodotte da diverse linee cellulari ed agiscono su tipi cellulari diversi (pleiotropismo).
- * L'attività delle citochine è ridondante (diverse citochine possono avere la stessa azione biologica).
- * Molte citochine agiscono come regolatrici della divisione e della differenziazione cellulare.

- * *Due citochine possono interagire tra di loro antagonizzandosi, avere effetto additivo o effetto sinergico (un risultato maggiore della somma degli effetti di ciascuna delle due).*

4.2 CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE

Il gruppo delle citochine comprende una ventina di molecole. La classificazione che viene qui presentata è assai precaria e provvisoria, dato la gran mole di dati che su questo argomento si accumulano continuamente.

1. MEDIATORI DELL'IMMUNITA' INNATA

Ovvero quelle che sono anche considerate "Citochine Infiammatorie", prodotte principalmente da fagociti mononucleati per potenziare o inibire le reazioni infiammatorie. Esse sono: TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, chemochine, IFN- γ .

2. MEDIATORI DELL'IMMUNITA SPECIFICA

Ovvero le "Citochine Immunitarie", prodotte soprattutto da linfociti T in risposta ad un riconoscimento antigenico specifico, per stimolare e sfruttare al massimo le risposte infiammatorie. Esse sono: IL-2, IL-4, TGF- β , IFN- γ , LT, IL-5

3. FATTORI DI CRESCITA DEL SISTEMA EMATOPOIETUCO

Ovvero i "Fattori di crescita Emopoietici". Essi sono: SCF, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, IL-3, IL-7.

I recettori per le citochine a loro volta possono essere raggruppati in 5 famiglie, in base all'omologia strutturale tra i domini extracellulani.

Alcune proteine recettoriali sono membri della super-famiglia delle immunoglobuline, altre fanno parte della categoria dei recettori ematopoietici, altri ancora sono membri del gruppo dei TNF ed infine un gruppo appartiene alla famiglia dei recettori delle chemochine. Ciascuna famiglia recettoriale è diversa dalle altre, e ciascun membro all'interno di una famiglia è una variante proteica con caratteristiche strutturali proprie e capace di indurre una determinata funzione nella cellula che lo espone. Nella famiglia dei recettori ematopoietici la catena α spesso è responsabile per la specificità di legame con la citochina, mentre la catena β trasferisce il segnale alla cellula.

Nel gruppo dei TNF i ligandi possono rimanere associati alla membrana piuttosto che essere secreti. Alcune di queste molecole fungono da modelli anche per altri sistemi biologici.

I recettori per le citochine costituiscono un buon esempio di come la natura agisca come un "bricolier" (non butta niente, e utilizza gli avanzi come pezzi di ricambio): ogni molecola complessa costruita viene impiegata, magari assemblata in altro modo, per tanti altri scopi oltre quello principale.

4.3 MEDIATORI DELL'IMMUNITA INNATA

Fattore di necrosi tumorale (TNF)

Il TNF, come altri mediatori dell'immunità innata, può essere visto sotto un duplice aspetto per l'organismo, in quanto innesca un circolo chiuso in cui partendo dal danno del tessuto come stimolo per produrre citochine, queste generano una risposta infiammatoria, che "aggrava" ulteriormente il danno, e il ciclo ricomincia.

Prodotto dai fagociti mononucleati attivati (soprattutto dal lipopolisaccaride, LPS), ma anche da linfociti T attivati, cellule NK (natural killer) e mastociti.

E' l'anello di congiunzione principale tra immunità ed infiammazione; il principale mediatore della risposta dell'ospite nei confronti dei batteri Gram negativi, ma probabilmente agisce anche nella risposta ad altri patogeni. E' il responsabile di molte manifestazioni sistemiche che spesso complicano le infezioni. Possiede due distinti recettori:

TNF-RI che determina l'attivazione dell'apoptosi e in minor misura attivazione dei fattori di trascrizione; TNF-RfI attiva fattori di trascrizione.

Principali attività biologiche:

- * Attività locali (l'affinità per il suo recettore è insolitamente bassa per una citochina: K_d circa 10^{-9})*
- * Induce nelle cellule endoteliali l'espressione di molecole di adesione capaci di ancorare inizialmente i neutrofili, successivamente linfociti e monociti.*

- * *Stimola le cellule endoteliali e i macrofagi a secernere chemochine ad azione chemiotattica sui leucociti.*
- * *Stimola i fagociti mononucleati alla produzione di IL-1, IL-6*
- * *Costimolatore delle cellule B*
- * *Induce sintesi G-CSF*
- * *Effetto antivirale simile a IFN → aumenta espressione molecole MHC I classe.*
- * *Induce l'apoptosi su alcuni tipi cellulari*

Attività generali (a concentrazioni particolarmente elevate da svolgere azione endocrina)

- * *pirogeno endogeno insieme all'IL-1 (aumento sintesi prostaglandine da parte delle cellule ipotalamiche, inibita da aspirina)*
- * *stimolo insieme all'IL-1 e IL-6 sugli epatociti per la produzione delle proteine della fase acuta*
- * *inibizione della replicazione delle cellule midollari*
- * *cachessia (soppressione appetito, soppressione sintesi lipoprotein lipasi, aumento catabolismo)*
- * *diminuisce contrattilità del miocardio e il tono della muscolatura vascolare*
- * *aumenta espressione da parte degli endotelioцитi del "fattore tissutale", potente attivatore della coagulazione con conseguente*

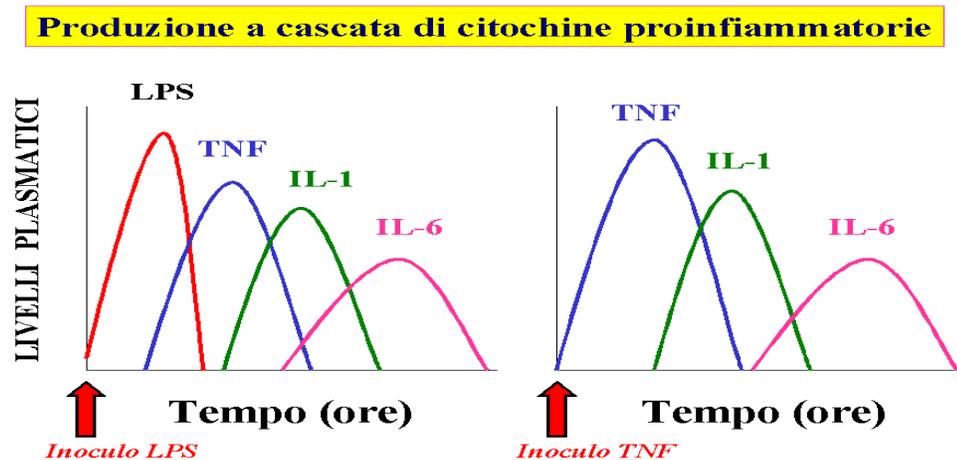
coagulazione intravascolare. La necrosi tumorale provocata dal TNF è dovuta principalmente a questo meccanismo.

A concentrazioni molto elevate induce shock settico con collasso cardiovascolare, coagulazione intravascolare disseminata e alterazioni metaboliche.

Molte delle azioni del TNF sono amplificate dalla contemporanea azione del IFN γ .

Studi recenti hanno dimostrato che l'inoculazione di TNF può praticamente sostituire l'LPS sia nella Reazione Sistemica che Locale di Schwartzman. Infatti, anticorpi anti-TNF conferiscono protezione anche verso LPS. Quindi TNF è considerato il mediatore centrale del danno tissutale indotto da LPS.

Nella Figura 1 viene mostrata la produzione a cascata durante l'esperimento.

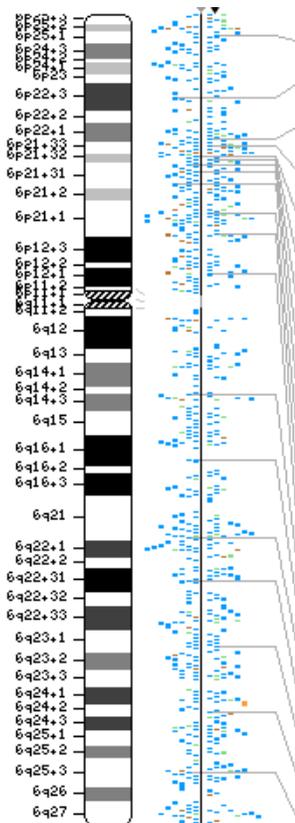


Produzione a cascata di citochine proinfiammatorie nella Reazione di Schwartzman.

STRUTTURA DEL TNF:

E' prodotto da un singolo gene localizzato sul cromosoma 6 (6p21) (Fig. 2) dentro al locus per l'MHC, che contiene 3 regioni che codificano per le tre classi (I, II e III) di proteine HLA. Il TNF- α è localizzato nella zona centrale che contiene i geni per le proteine di classe III.

Viene sintetizzato come omotrimerico e successivamente clivato proteolicamente (Fig. 3) ed immesso in circolo. Si lega al suo recettore (in realtà ce ne sono due) che ha affinità un po' bassa (10^{-9}), tuttavia il TNF viene sintetizzato in grandi quantità perciò può facilmente saturare il suo recettore.



Interleuchina- 1

Storicamente, l'IL-1 è stata “scoperta” tante volte, secondo ciascuna delle sue molteplici azioni: il mediatore endogeno della febbre, lo stimolo della risposta della fase acuta, il riassorbimento della cartilagine e dell'indebolimento muscolare nelle malattie infettive. Solo recentemente tutti questi effetti sono stati attribuiti ad un singolo mediatore, l'IL-1.

L'IL-1 (Fig. 4) è una glicoproteina (PM 17 kD) codificata da due geni, che danno origine a due proteine differenti solo per il punto isoelettrico, α e β .

Le due proteine presentano il 30% di omologia, ma agiscono sullo stesso recettore:

- P80: IL-1 RT 1 (recettore di tipo I) che ha un'affinità lievemente maggiore per IL-1 β che per IL-1 α , è espresso da linfociti T, fibroblasti, epatociti e cellule endoteliali e rappresenta il principale recettore per le risposte mediate da IL-1. Esso trasduce tutti gli effetti della IL-1.
- P68: IL-1 RT 2 (recettore di tipo 2) che ha un'affinità lievemente maggiore per IL-1 α ed è presente sulla membrana dei linfociti B, monociti, macrofagi e neutrofili. E' un recettore fasullo, una sorta di “specchietto per le allodole” che compete con il vero recettore.

Gran parte dell'attività biologica della citochina IL-1 è data da IL-1 β che si lega appunto al recettore di tipo I, il quale è in grado di trasdurre il segnale.

IL-1 β può legarsi anche al recettore di tipo II che però non è in grado di

trasdurre il segnale e funziona sottraendo IL-1 β dal legame col recettore di tipo I.

Vi è poi una terza molecola, prodotta dai fagociti mononucleati, strutturalmente omologa a IL-1 (e quindi in grado di legarsi ai suoi stessi recettori), ma funzionalmente inattiva. Essa agisce quindi da inibitore competitivo di IL-1 e viene detta IL-1 RA (cioè IL-1 Receptor Antagonist).

A differenza del TNF- α , l'IL-1 non provoca danno tissutale (sebbene sia secreta in risposta all'LPS), non è letale non sostituisce TNF nella reazione di Shwartzman, non uccide le cellule tumorali, non aumenta l'espressione di molecole MHC I, potenzia, anziché sopprimere l'azione dei CSF sul midollo, quindi stimola la replicazione delle cellule staminali midollari, è più potente come stimolo per le cellule T.

I geni per la IL-1 sono stati clonati e le proteine vengono ottenute con ingegneria genetica.

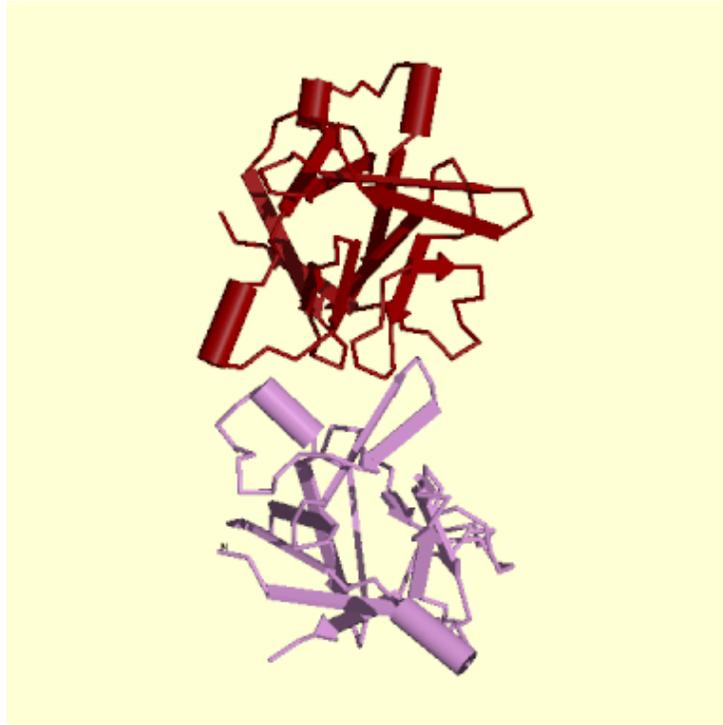
Diversi tipi di cellule sono capaci di produrre IL-1: oltre che i macrofagi, la producono cheratinociti, neutrofili, cellule mesangiali renali, epitelio corneale, linfociti B stimolati, LGL, fibroblasti e cellule endoteliali, così che questa citochina può essere prodotta da sorgenti locali, anche in assenza di densi infiltrati macrofagi.

Principali attività biologiche:

- * induzione alla proliferazione di timociti in presenza di mitogeni (PHA, ConA)*

- * *induzione proliferazione di fibroblasti*
- * *induce nelle cellule endoteliali l'espressione di molecole di membrana in grado di mediare l'adesione dei leucociti*
- * *ad alte concentrazioni esplica un'azione endocrina come i TNF: pirogeno endogeno, induce sintesi proteine della fase acuta, genera cachessia*
- * *induzione alla produzione di IL-2 nei linfociti T helper*
- * *agisce in sinergia ad altre interleuchine nell'indurre proliferazione dei B linfociti*

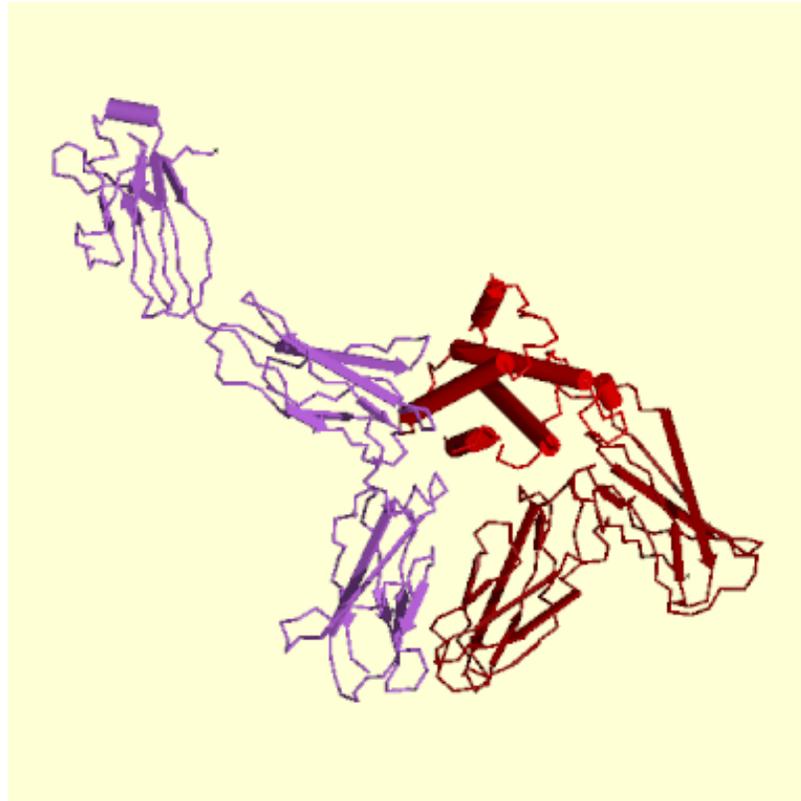
Le azioni dell'IL-1, IL-6 e TNF sono molto simili nonostante agiscano su recettori completamente diversi; la spiegazione di questo fenomeno risiederebbe nel fatto che i recettori delle due citochine trasducono il segnale utilizzando proteine analoghe, ed attivano gli stessi fattori di trascrizione.



Struttura secondaria dell'IL-1Ra (da PDB).

INTERLEUCHINA-6

E' una proteina di peso molecolare che oscilla fra 22000 e 30000 D, a seconda del grado di fosforilazione e glicosilazione del singolo polipeptide Prodotta da macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti in risposta all'IL-1 ed in minor misura al TNF. Le cellule bersaglio sono da un lato i linfociti B, dall'alto lato gli epatociti: negli ultimi anni è stato dimostrato che l'IL-6 ha un ruolo importante, complementare a quello della IL-1, nell'infiammazione acuta. Essa determina, infatti, la sintesi da parte degli epatociti di una serie di proteine denominate "della fase acuta": proteina C reattiva, fibrinogeno, etc.



Struttura secondaria dell'Interleuchina-6 (da PDB).

5. OBIETTIVO

Il lavoro svolto in questi anni si è focalizzato sullo studio del cluster dell'interleuchina 1 e alcuni polimorfismi dell'interleuchina 6.

Lo studio dei geni presenti nel cluster dell'interleuchina 1, che esprime 3 diverse proteine, due agonisti, l'interleuchina 1 alfa e l'interleuchina 1 beta ed un antagonista, l'interleuchina 1 Ra è stato eseguito su:

- ❖ un vntr (minisatellite) da 86 bp nell'introne 2 del gene per interleuchina 1 Ra.*
- ❖ la mutazione puntiforme, la -511 C/T nel promotore del gene per interleuchina 1 beta;*

❖ *la mutazione puntiforme, la -889 C/T nel promotore del gene per interleuchina 1 alfa.*

Lo studio dell'interleuchina 6 è stato fatto su 3 polimorfismi del suo promotore:

❖ *-174 G/C*

❖ *- 572 G/C*

❖ *-597 G/A.*

Al termine del lavoro è stata svolta un'indagine statistica al fine di valutare un'associazione fra questi polimorfismi e l'invecchiamento con successo.

6. MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati 1038 campioni di DNA di residenti sardi di età compresa fra 60 anni, centenari e ultracentenari facenti parte del Progetto AKeA.

Il DNA è stato estratto, in seguito a prelievo di sangue, dai globuli bianchi con il metodo standard fenolo-cloroformio.

6-1 INTERLEUCHINA 6

I tre polimorfismi del promotore dell'interleuchina-6 sono stati studiati mediante reazione a catena della DNA polimerasi (PCR) seguita dall'analisi dei frammenti di restrizione (RFLP).

Sono stati studiati 3 polimorfismi del promotore del gene per l'interluchina 6, -174 G/C, -597 G/A e -574 G/C.

Polimorfismo -174 G/C

Il polimorfismo -174 G/C è stato analizzato amplificando un frammento di DNA genomico con la seguente coppia di primers:

primer forward (F): 5'-TGACCTTCAGCTTTACTCTTTTGT-3'

primer reverse (R) : 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAAG-3'

con il seguente protocollo:

n. di cicli	T °C	Tempo
5	96	9 min
	95	1 min
	72	3 min
35	95	1 min
	55	1 min
	72	1 min

Reattivo	Concentrazione finale
Buffer Taq	1 x
dNTPs	0.1 μ M
Primer F	0.25 μ M
Primer R	0.25 μ M
Taq polimerasi	1 U

Al termine dell'amplificazione veniva effettuata una corsa elettroforetica in gel d'agaroso all'1% al fine di rilevare il prodotto di PCR.

Successivamente un'aliquota dell'amplificato veniva sottoposto a digestione enzimatica a 37°C overnight con l'enzima di restrizione Hsp92II.

La determinazione del genotipo avveniva mediante corsa elettroforetica con tampone TBE in un gel di poliacrilamide all'8% colorato con bromuro di etidio e successivamente esposto ai raggi UV ed i genotipi venivano attribuiti come mostrato nella seguente simulazione.

Omozigote normale Genotipo GG	Eterozigote Genotipo GC	Omozigote mutato Genotipo CC
_____ 196 bp	_____ 196 bp	

	_____ 167 bp	_____ 167 bp
	_____ 31 bp	_____ 31 bp

Polimorfismo -597 G/A e polimorfismo -572 G/C

Per l'analisi di questi 2 polimorfismi si è messa a punto una metodica che prevede l'utilizzo di una sola coppia di primers che contiene entrambe i siti di restrizione polimorfici.

La PCR è stata ottimizzata i seguenti primers:

primer forward (F): 5'-GGAGACGCCTTGAAGTAACTGC-3'

primer reverse (R): 5'-GACGCTACCTCAGTCTCCTTTGTG-3'

e con le seguenti condizioni di reazione:

n. di cicli	T °C	Tempo
1	94	4 min

35	95	40 sec
	56	40 sec
	72	1 min

Reattivo	Concentrazione finale
Buffer Taq	1x
dNTPs	0.2 μ M
Primer F	0.26 μ M
Primer R	0.25 μ M
Taq polimerasi	1 U

La presenza dell'amplificato (163 bp) veniva valutata con una corsa elettroforetica in gel d'agaroso all'1%.

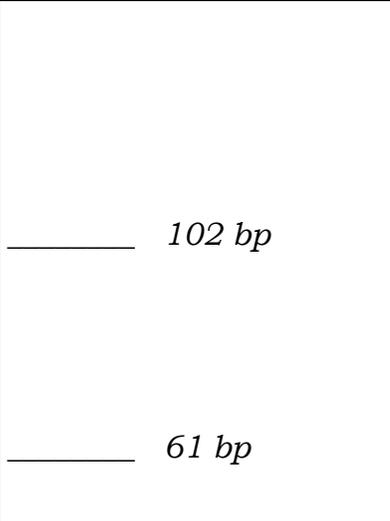
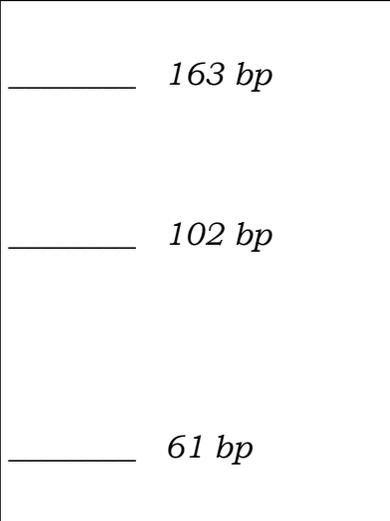
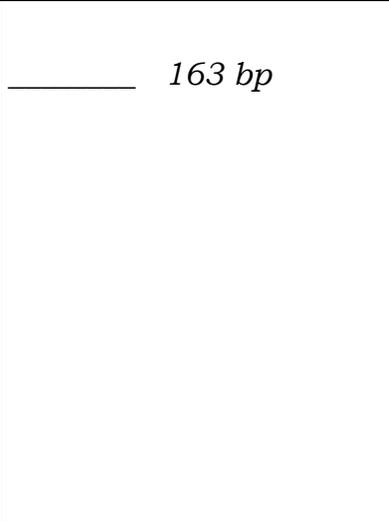
Successivamente un'aliquota dell'amplificato veniva sottoposto a digestione enzimatica a 37°C per 1 ora con l'enzima di restrizione Fok I.

La visualizzazione dei risultati avveniva mediante corsa elettroforetica in un gel di poliacrilamide all'8% con tampone TBE e successiva colorazione con bromuro di etidio e seguente esposizione ai raggi UV ed i genotipi attribuiti come mostrato nella seguente simulazione.

--	--	--

Omozigote normale Genotipo GG	Eterozigote Genotipo GA	Omozigote mutato Genotipo AA
<p>_____ 163 bp</p>	<p>_____ 163 bp</p> <p>_____ 116 bp</p> <p>_____ 47 bp</p>	<p>_____ 116 bp</p> <p>_____ 47 bp</p>

Un'aliquota dell'amplificato veniva sottoposto ad altra digestione enzimatica con Mbi I per 3 ore e mediante corsa elettroforetica in un gel di poliacrilamide all'8% con tampone TBE e successiva colorazione con bromuro di etidio ed esposizione ai raggi UV e i genotipi venivano attribuiti come mostrato nella seguente simulazione:

<i>Omozigote normale</i> <i>Genotipo GG</i>	<i>Eterozigote</i> <i>Genotipo GC</i>	<i>Omozigote mutato</i> <i>Genotipo CC</i>
		

Interluchina-1 Ra

Il polimorfismo di questo gene è legato alla presenza di alleli diversi che differiscono per la sequenza ripetuta (VNTR) di 86 bp presente nell'introne 2.

Il metodo applicato prevede l'uso della seguente coppia di primers:

5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3' e 5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'.

Il protocollo di PCR usato è il seguente:

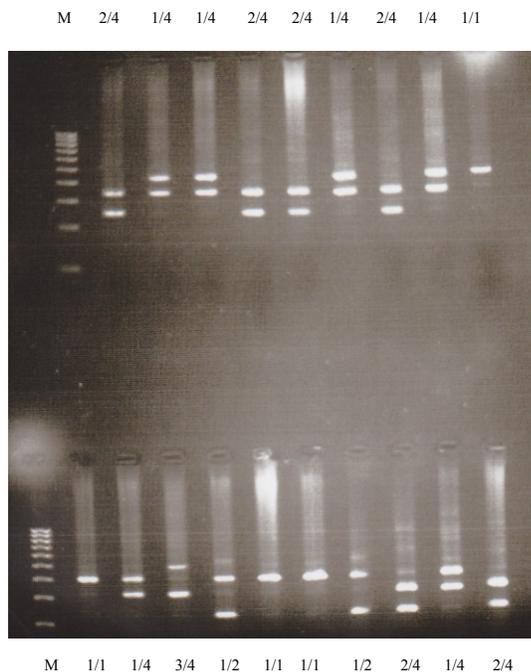
<i>n. di cicli</i>	<i>T °C</i>	<i>Tempo</i>
<i>1</i>	<i>95</i>	<i>1 min</i>

35	95	1 min
	54	40 sec
	72	30 sec

Reattivo	Concentrazione finale
Buffer Taq	1x
dNTPs	0.15 μ M
Primer F	0.20 μ M
Primer R	0.20 μ M
Taq polimerasi	1 U

La visualizzazione del prodotto di PCR è stato fatto utilizzando per il gel elettroforetico un nuovo tipo di agaroso, definito commercialmente Metaphor®, che ha permesso di sostituire il gel di poliacrilamide, riducendo notevolmente i tempi di lavoro e i rischi connessi con l'uso dell'acrilamide e bis-acrilamide pur mantenendo ottime risoluzioni. In particolare, al fine di limitare il costo economico del prodotto, si è ottimizzato il protocollo mescolando in opportune proporzioni l'agaroso tradizionale ed il Metaphor®. A genotipi venivano assegnati seguendo la seguente nomenclatura:

- * allele 1: 410 bp (4 ripetizioni)
- * allele 2: 240 bp (2 ripetizioni)
- * allele 3: 500 bp (5 ripetizioni)
- * allele 4 : 330 bp (3 ripetizioni)



M = 100 bp ladder

Interleuchina 1 beta

Il polimorfismo -511 C/T è stato analizzato amplificando un frammento di DNA genomico con il seguente protocollo:

<i>n. di cicli</i>	<i>T °C</i>	<i>Tempo</i>

1	95	1 min
	55	2 min
	74	1 min
35	95	1 min
	55	2 min
	72	2 min

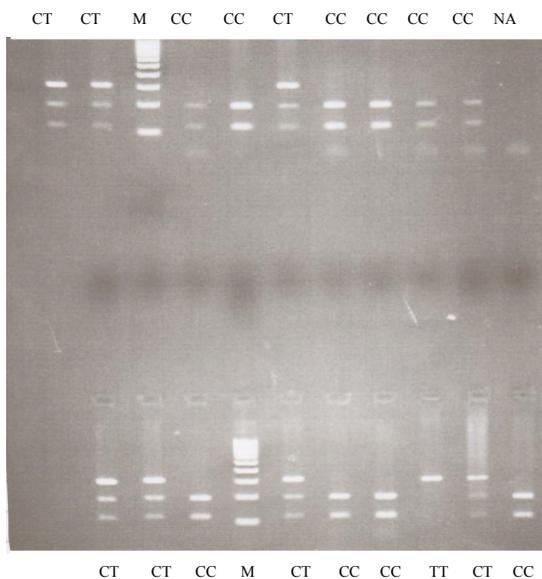
Reattivo	Concentrazione finale
Buffer Taq	1 x
dNTPs	0.15 μ M
Primer F	0.20 μ M
Primer R	0.20 μ M
Taq polimerasi	1 U

Al termine dell'amplificazione veniva effettuata una corsa elettroforetica in gel d'agaroso all'1% al fine di rilevare il prodotto di PCR rappresentato da un frammento da 304 bp.

Successivamente un'aliquota dell'amplificato veniva sottoposto a digestione enzimatica a 37°C overnight con l'enzima di restrizione Eco88I (AVAI).

La determinazione del genotipo avveniva mediante corsa elettroforetica con gel misto agaroso/Metaphor® ed i genotipi venivano attribuiti come mostrato nella seguente simulazione.

Omozigote normale Genotipo CC	Eterozigote Genotipo TT	Omozigote mutato Genotipo CT
<p style="text-align: center;">_____ 190 bp</p> <p style="text-align: center;">_____ 114 bp</p>	<p style="text-align: center;">_____ 304 bp</p>	<p style="text-align: center;">_____ 304 bp</p> <p style="text-align: center;">_____ 190 bp</p> <p style="text-align: center;">_____ 114 bp</p>



M = 100 bp ladder

Interluchina 1 alfa

Il polimorfismo -889 C/T è stato analizzato amplificando un frammento di DNA genomico con il seguente protocollo:

<i>n. di cicli</i>	<i>T °C</i>	<i>Tempo</i>
1	95	2 min
40	95	1 min
	57	2 min
	72	2 min

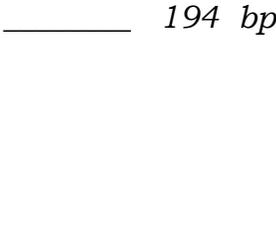
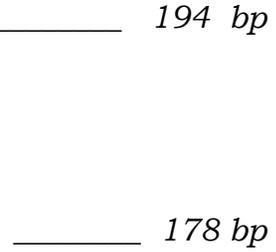
<i>Reattivo</i>	<i>Concentrazione finale</i>
Buffer Taq	1x

dNTPs	0.15 μ M
Primer F	0.20 μ M
Primer R	0.20 μ M
Taq polimerasi	1 U

Al termine dell'amplificazione veniva effettuata una corsa elettroforetica in gel d'agaroso all'1% al fine di rilevare il prodotto di PCR rappresentato da un frammento da 194 bp.

Successivamente un'aliquota dell'amplificato veniva sottoposto a digestione enzimatica a 37°C overnight con l'enzima di restrizione NCOI.

La determinazione del genotipo avveniva mediante corsa elettroforetica con gel misto agaroso/Metaphor® ed i genotipi venivano attribuiti come mostrato nella seguente simulazione.

Omozigote normale Genotipo CC	Eterozigote Genotipo TT	Omozigote mutato Genotipo CT
 _____ 178 bp	 _____ 194 bp _____ 178 bp	 _____ 194 bp _____ 178 bp

_____ 16 bp		_____ 16 bp
-------------	--	-------------

7. RISULTATI

Sono stati testati 1038 campioni di DNA di cui 849 sono risultati test validi.

La distribuzione dei genotipi e la frequenza degli alleli è stata valutata suddividendo gli individui nelle seguenti fasce di età: centenari, novantacinquenni, novantenni, ottantenni e sessantenni.

Inoltre è stata fatta una comparazione fra i sessi.

ETA'	TOTALE	SESSO		%
CENTENARI	266	F	151	56.77
		M	115	43.23

ETA'	TOTALE	SESSO		%
NOVANTACINQUENNI	129	F	68	52.71
		M	61	47.29

<i>ETA'</i>	<i>TOTALE</i>	<i>SESSO</i>		<i>%</i>
NOVANTENNI	180	F	91	50.55
		M	89	49.55

<i>ETA'</i>	<i>TOTALE</i>	<i>SESSO</i>		<i>%</i>
OTTANTENNI	168	F	89	52.98
		M	79	47.02

<i>ETA'</i>	<i>TOTALE</i>	<i>SESSO</i>		<i>%</i>
SESSANTENNI	106	F	68	64.15
		M	38	35.85

INTERLEUCHINA 1 BETA

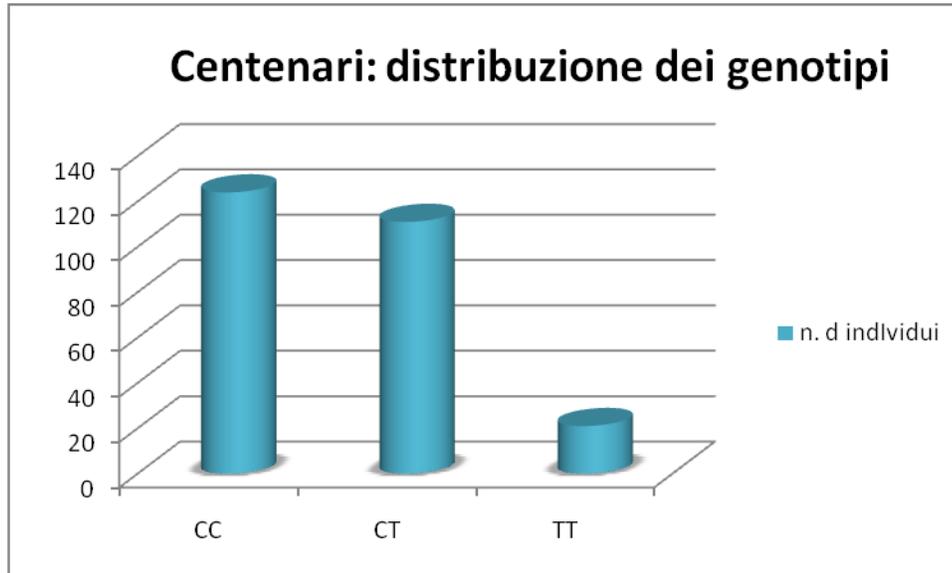
Le determinazioni per il polimorfismo -511 C/T dell'interleuchina 1 beta sono state svolte su un totale di 849 campioni validi.

CENTENARI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,701172
T	0,298828

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	124
CT	111
TT	21

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,307934**

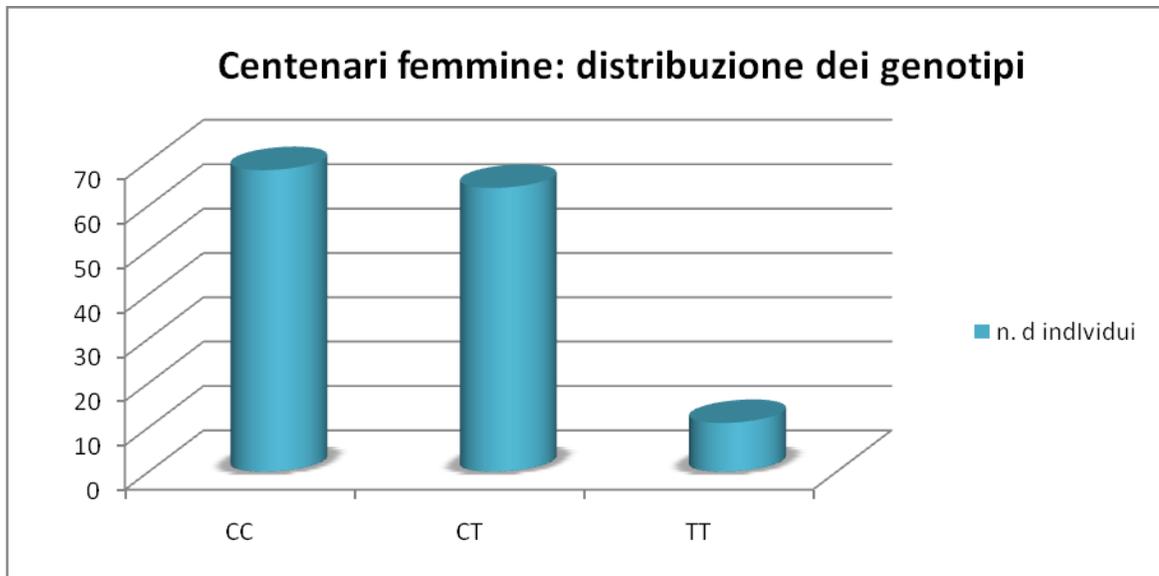


CENTENARI FEMMINE

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,699301
T	0,300699

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	68
CT	64
TT	11

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,589138**

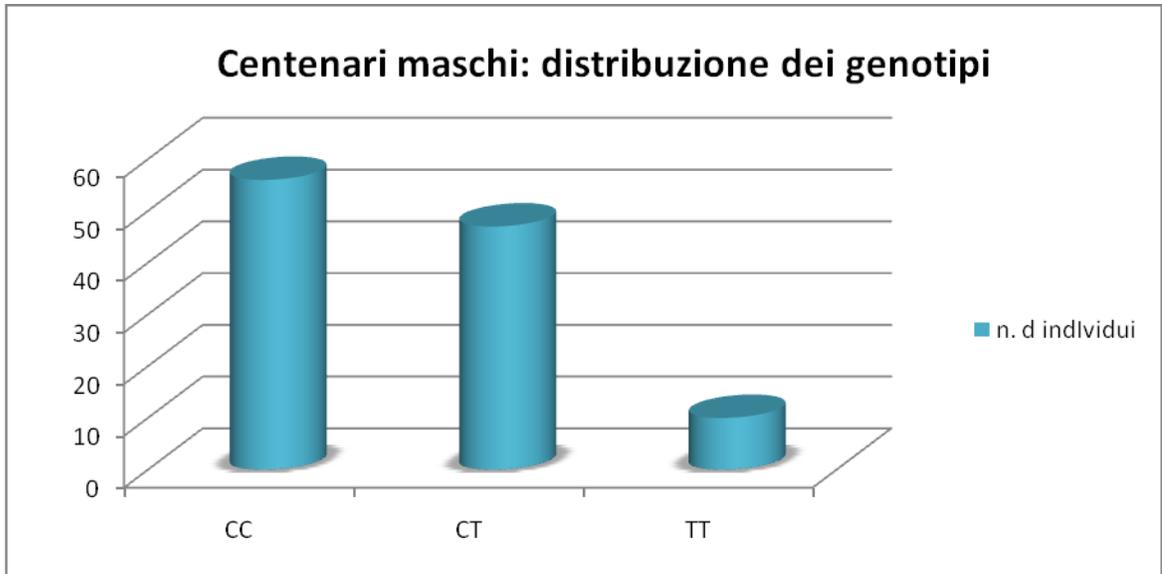


CENTENARI MASCHI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,70354
T	0,29646

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	56
CT	47
TT	10

Chi quadro (gdl = 1) = 0,000957

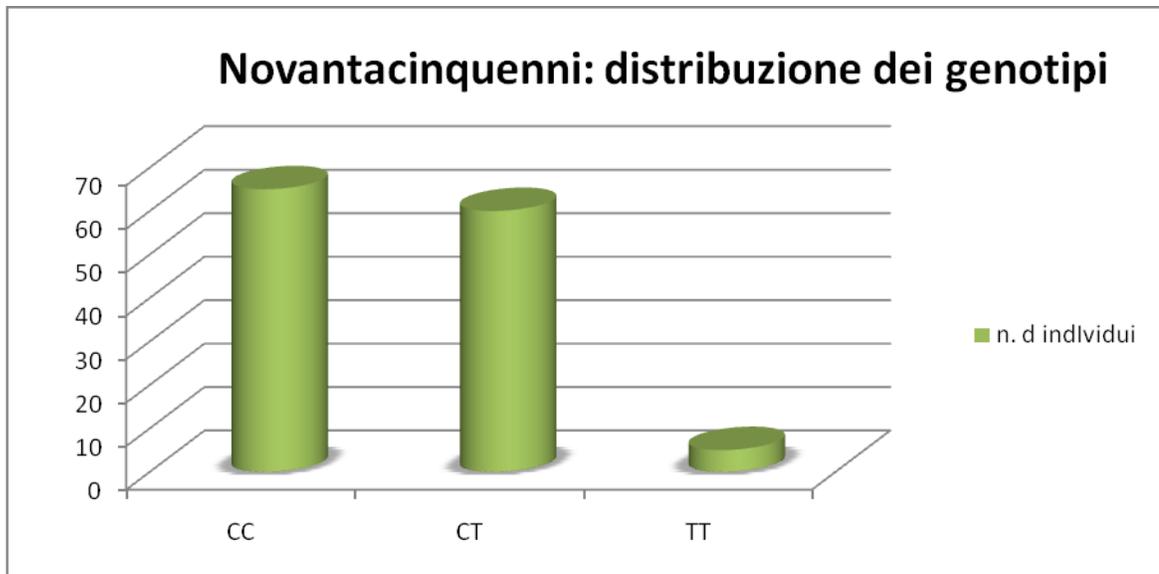


NOVANTACINQUENNI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,730769
T	0,269231

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	65
CT	60
TT	5

Chi quadro ($gdl = 1$) = **3,887727**

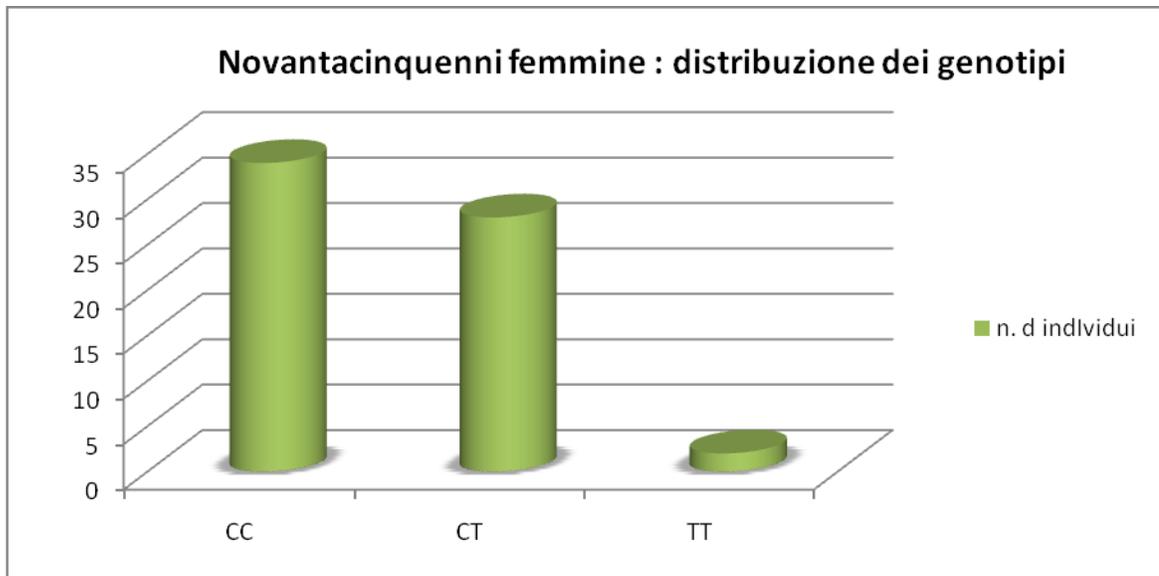


NOVANTACINQUENNI FEMMINE

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,75
T	0,25

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	34
CT	28
TT	2

Chi quadro ($gdl = 1$) = **1,777778**

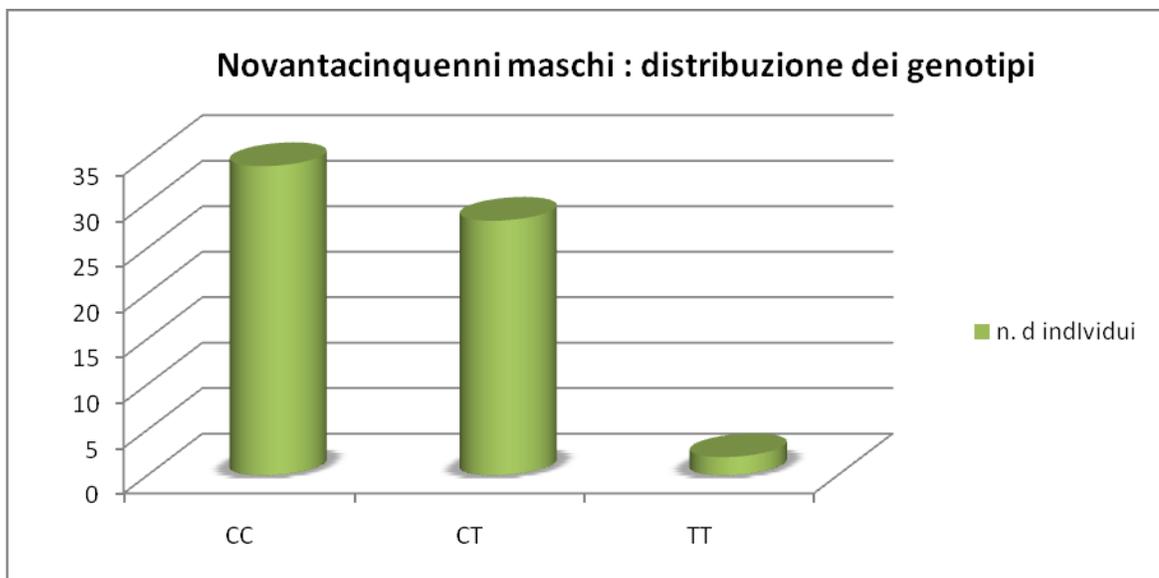


NOVANTACINQUENNI MASCHI

Allele	Frequenza genica
C	0,737705
T	0,262295

genotipo	n. di individui osservati
CC	31
CT	28
TT	2

Chi quadro ($gdl = 1$) = **2,112878**

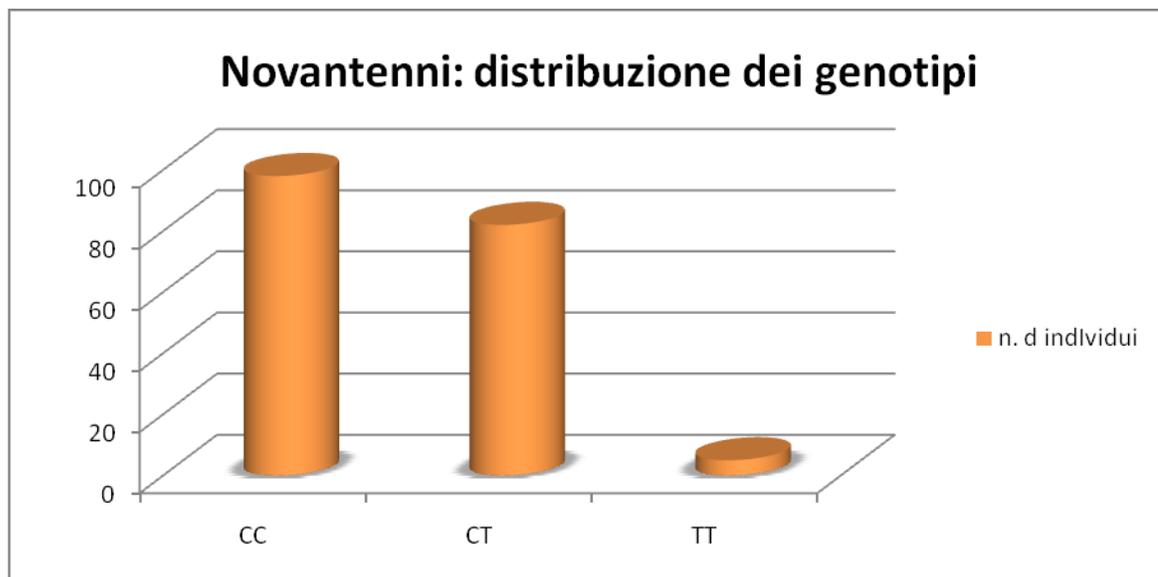


NOVANTENNI

Allele	Frequenza genica
C	0,751351
T	0,248649

genotipo	n. di individui osservati
CC	98
CT	82
TT	5

Chi quadro ($gdl = 1$) = **6,418743**

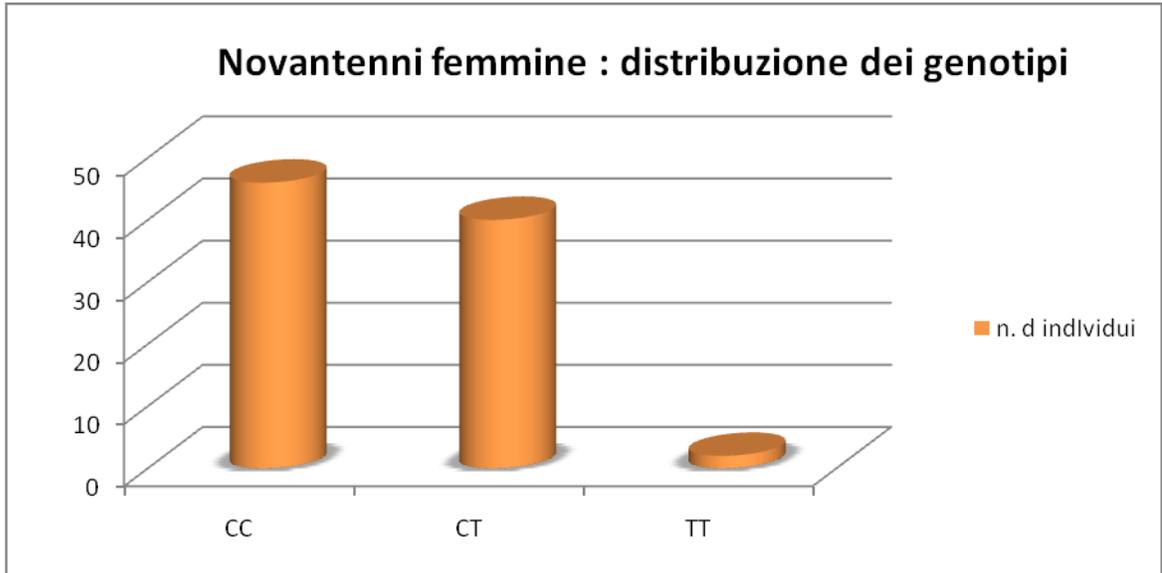


NOVANTENNI FEMMINE

Allele	Frequenza genica
C	0,75
T	0,25

genotipo	n. di individui osservati
CC	46
CT	40
TT	2

Chi quadro ($gdl = 1$) = **3,959596**

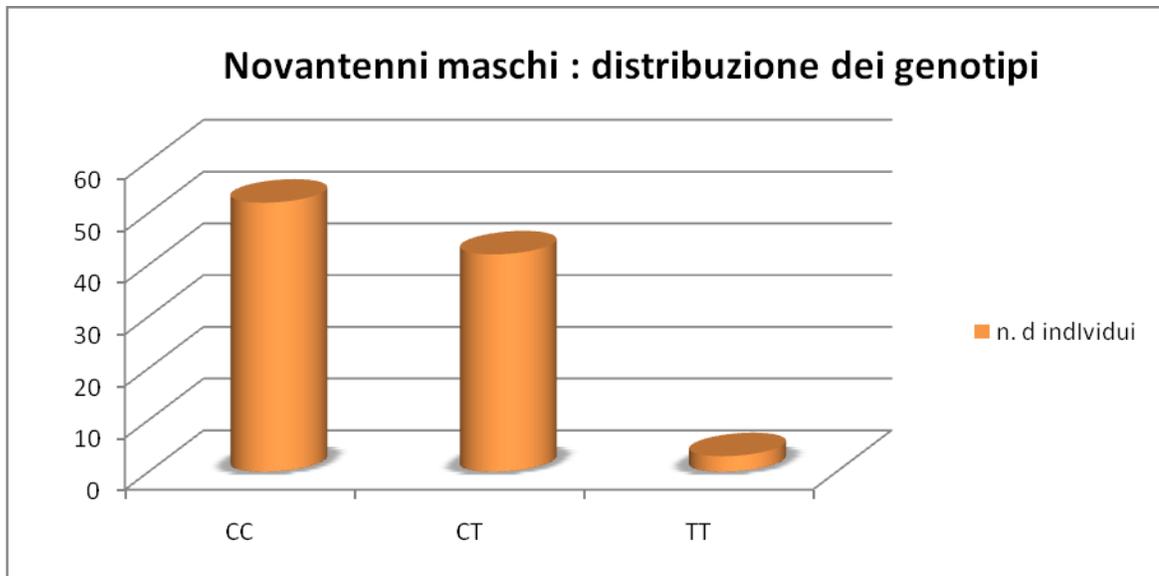


NOVANTENNI MASCHI

Allele	Frequenza genica
C	0,752577
T	0,247423

genotipo	n. di individui osservati
CC	52
CT	42
TT	3

Chi quadro ($gdl = 1$) = **2,566807**

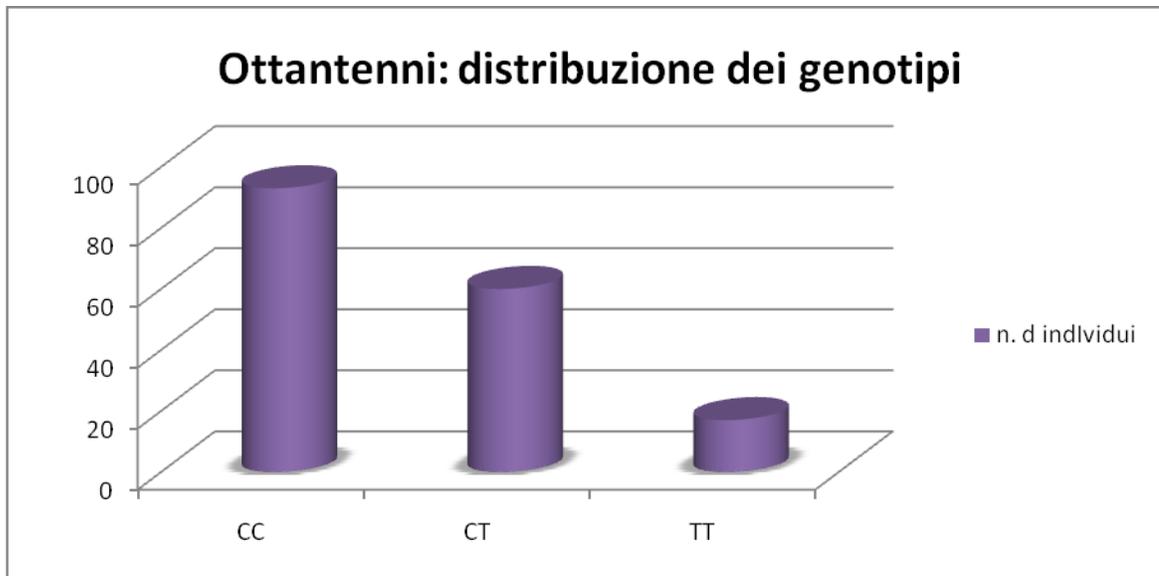


OTTANTENNI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,752577
T	0,247423

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	93
CT	60
TT	17

Chi quadro (gdl = 1) = 2,35905

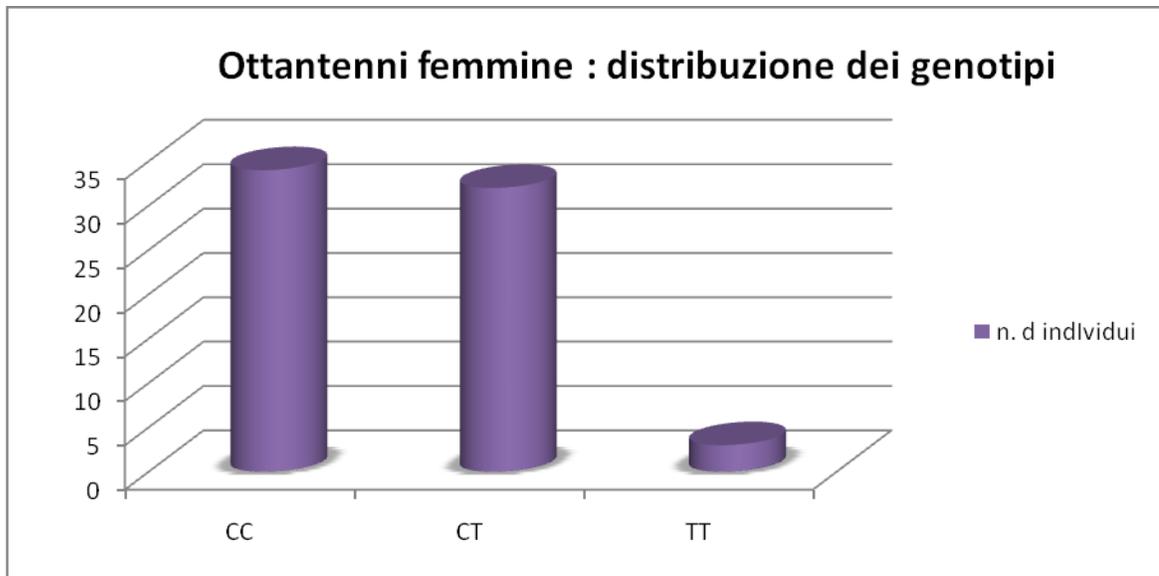


OTTANTENNI FEMMINE

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,724638
T	0,275362

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	34
CT	32
TT	3

Chi quadro (gdl = 1) = 1,81319

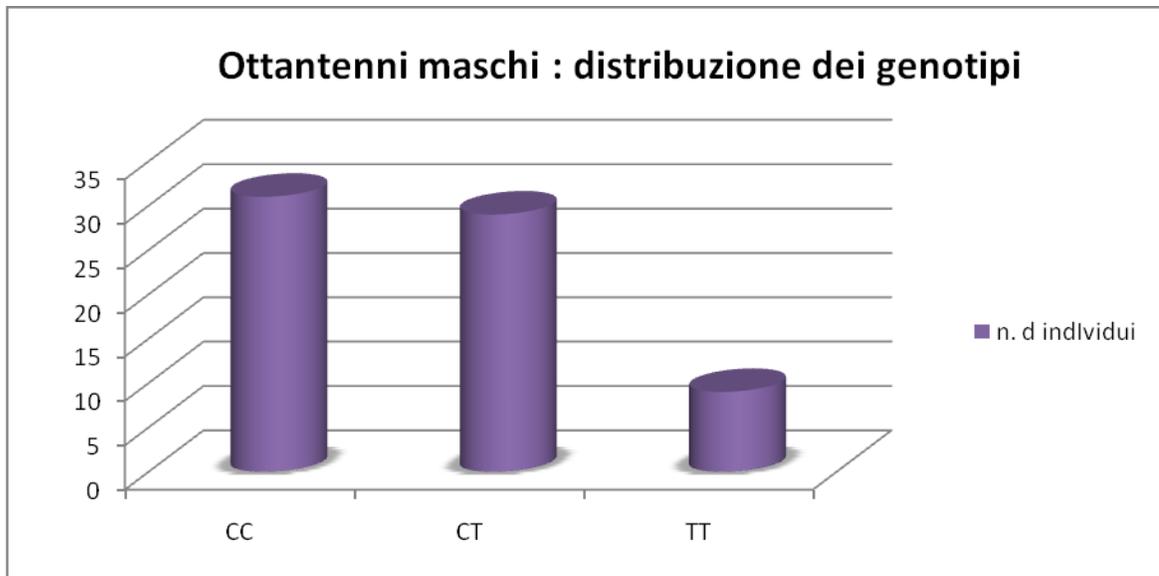


OTTANTENNI MASCHI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,65942
T	0,34058

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	31
CT	29
TT	9

Chi quadro (gdl = 1) = 0,285257

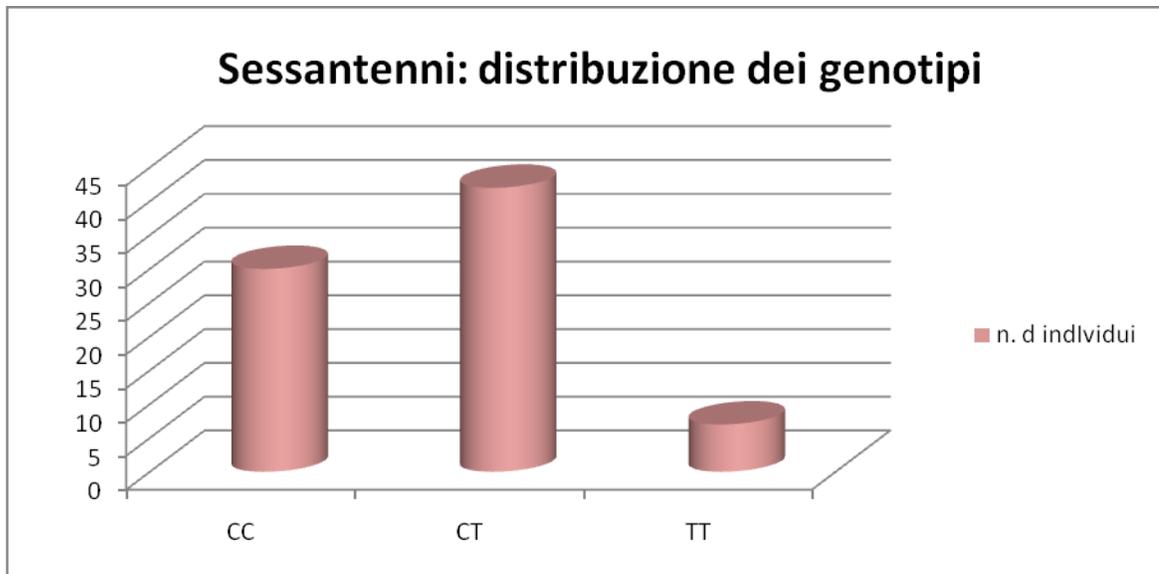


SESSANTENNI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,64557
T	0,35443

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	30
CT	42
TT	7

Chi quadro ($gdl = 1$) = **2,067258**

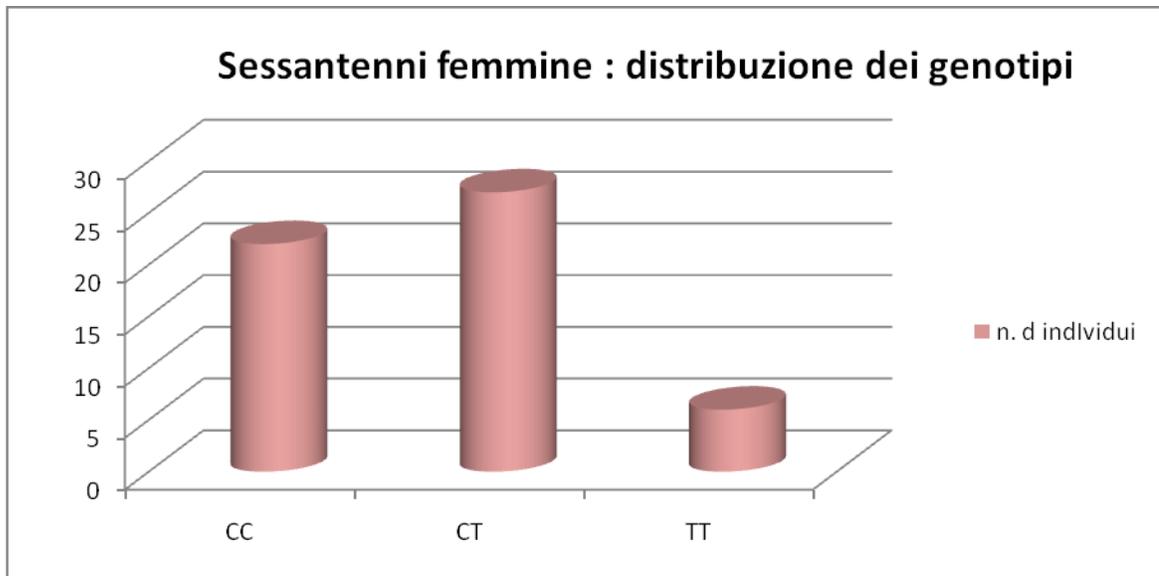


SESSANTENNI FEMMINE

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,645455
T	0,354545

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	22
CT	27
TT	6

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,289807**

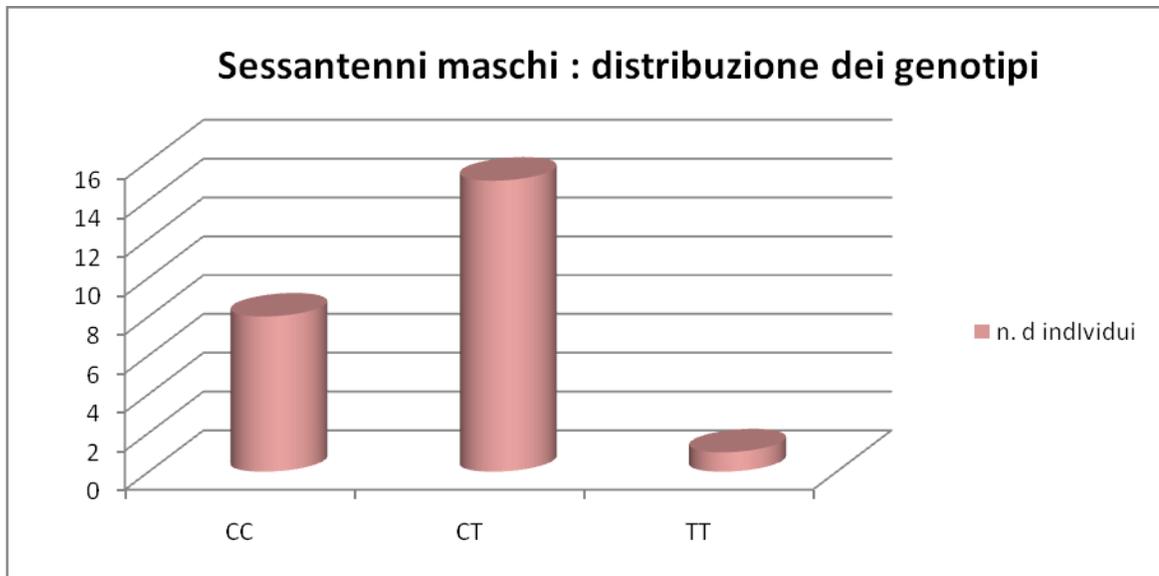


SESSANTENNI MASCHI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,645833
T	0,354167

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	8
CT	15
TT	1

Chi quadro (*gdl* = 1) = **3,218879**



INTERLEUCHINA 1 alfa (-889 C/T)

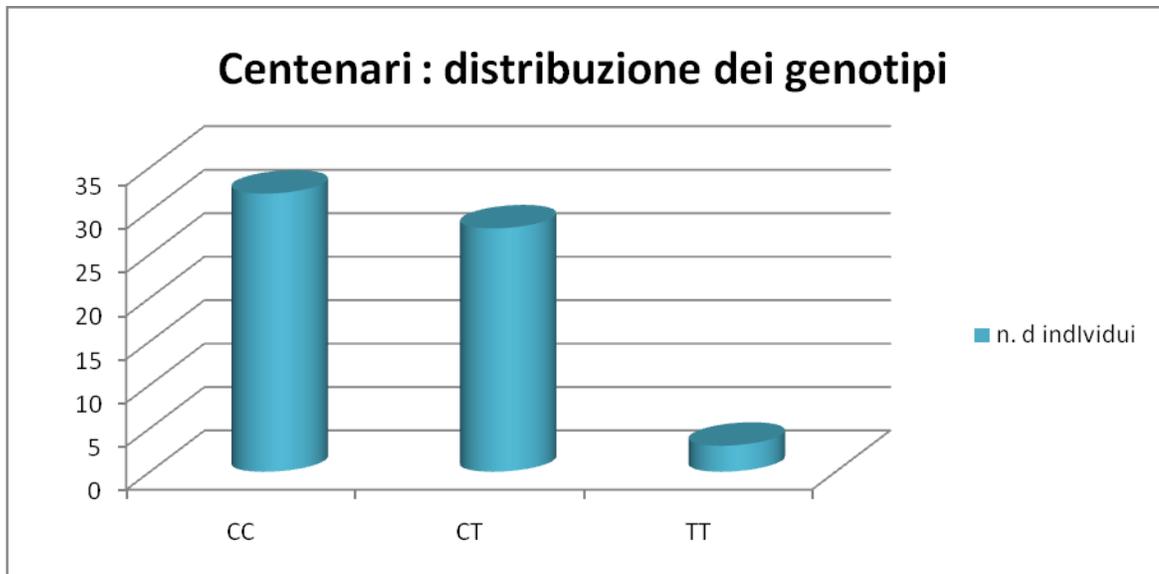
Le determinazioni per l'interleuchina 1 alfa sono state condotte su un totale di 127 campioni e la loro caratterizzazione è attualmente ancora in corso.

CENTENARI

Allele	Frequenza genica
C	0,730159
T	0,269841

genotipo	n. di individui osservati
CC	32
CT	28
TT	3

Chi quadro ($gdl = 1$) = **1,030213**

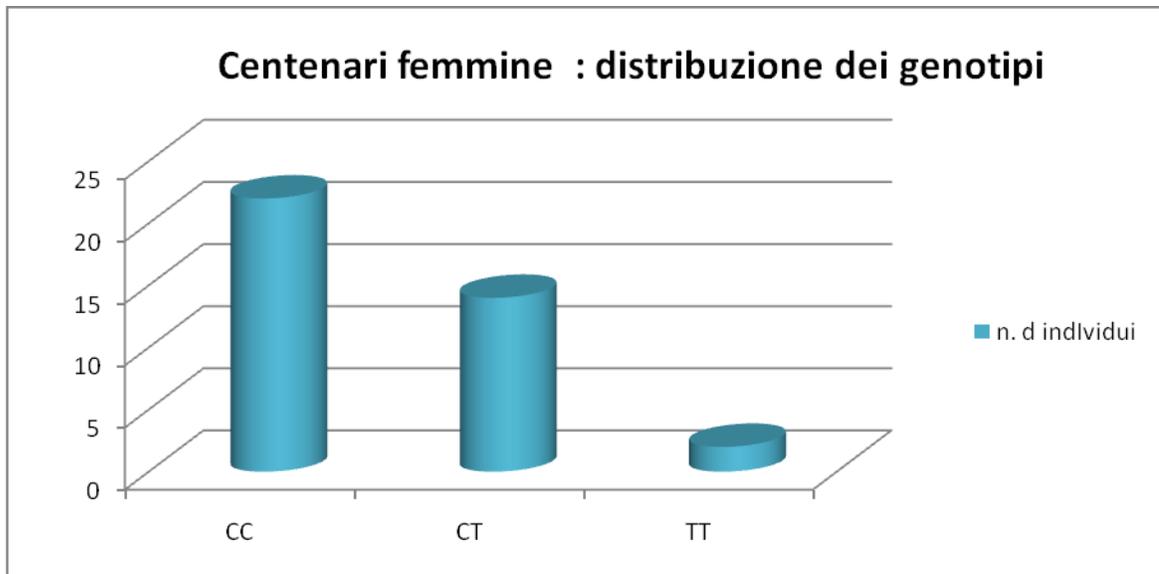


CENTENARI FEMMINE

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,763158
T	0,236842

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	22
CT	14
TT	2

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,013946**

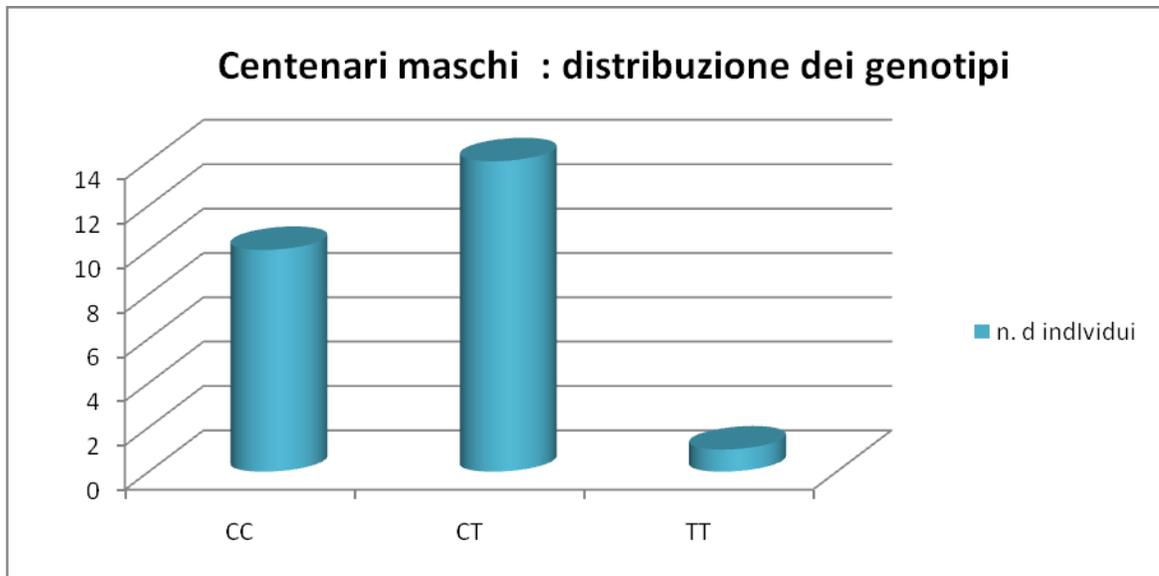


CENTENARI MASCHI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,68
T	0,32

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	10
CT	14
TT	1

Chi quadro (gdl = 1) = 2,05585

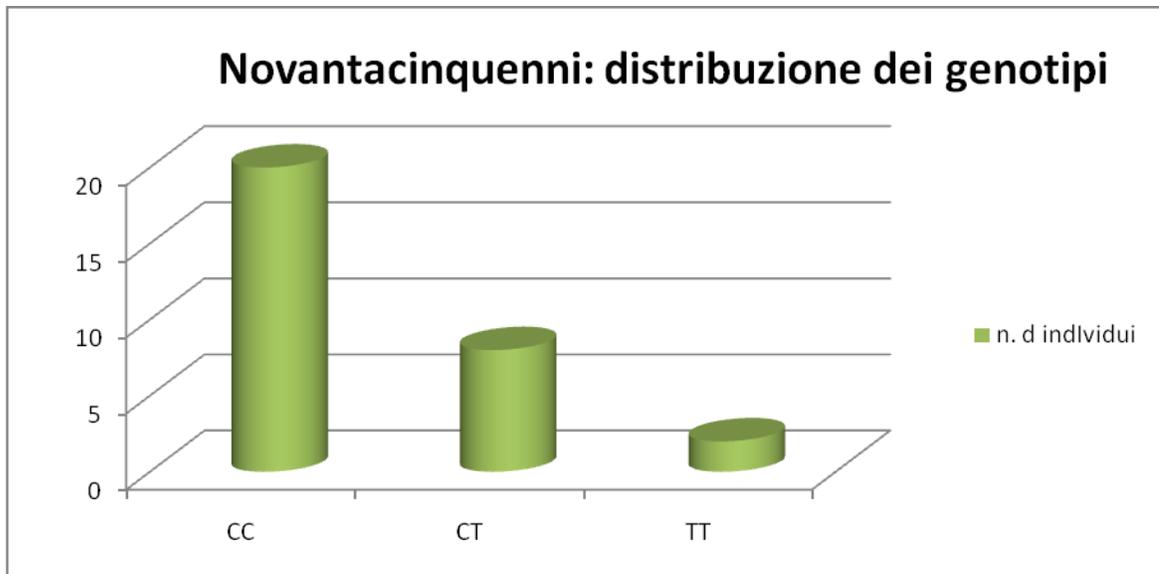


NOVANTACINQUENNI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,8
T	0,2

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	20
CT	8
TT	2

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,833333**

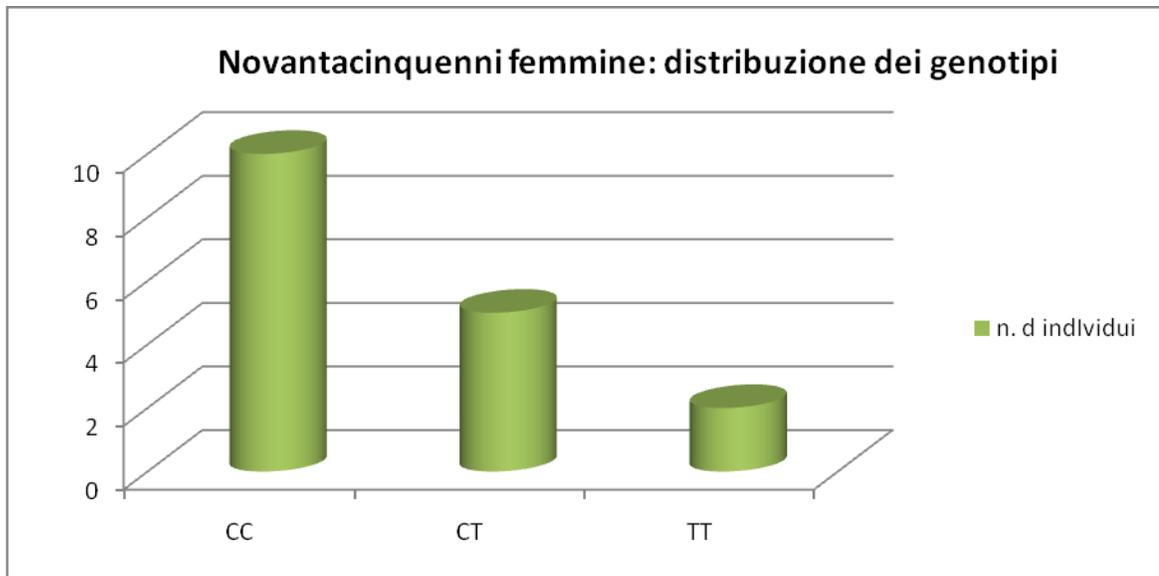


NOVANTACINQUENNI FEMMINE

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,735294
T	0,264706

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	10
CT	5
TT	2

Chi quadro (gdl = 1) = 1,015802

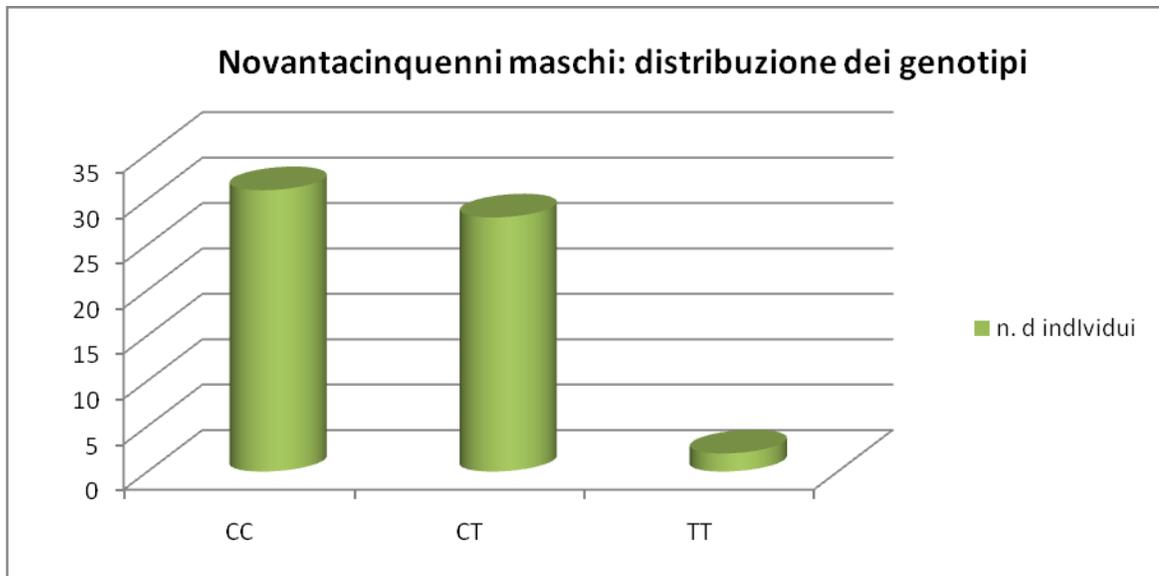


NOVANTACINQUENNI MASCHI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,737705
T	0,262295

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	31
CT	28
TT	2

Chi quadro (gdl = 1) = 2,112878

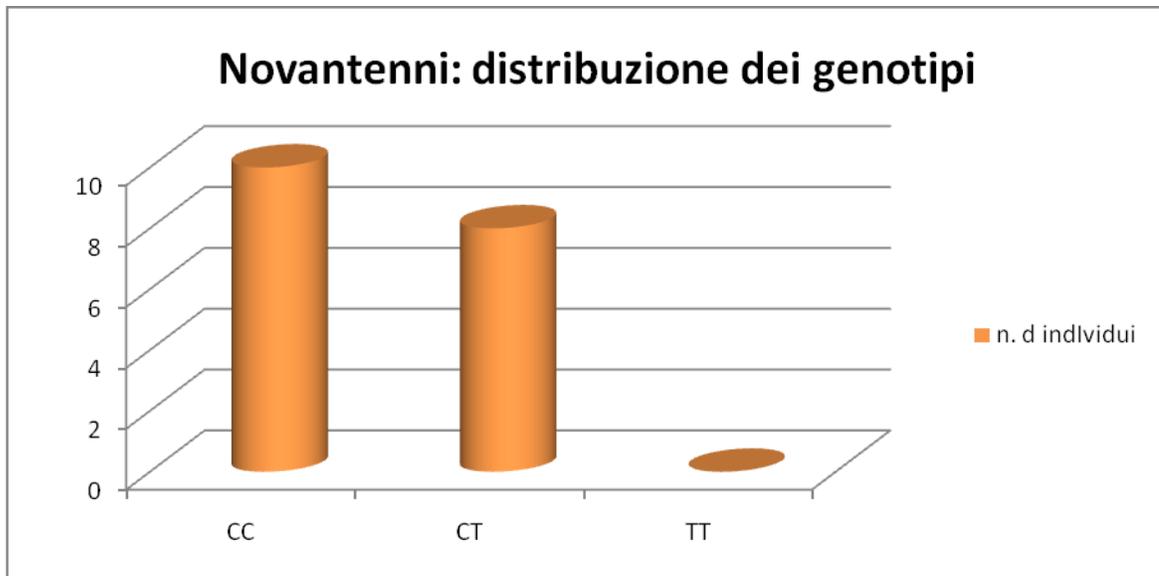


NOVANTENNI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,777778
T	0,222222

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	10
CT	8
TT	0

Chi quadro (gdl = 1) = 1,469388

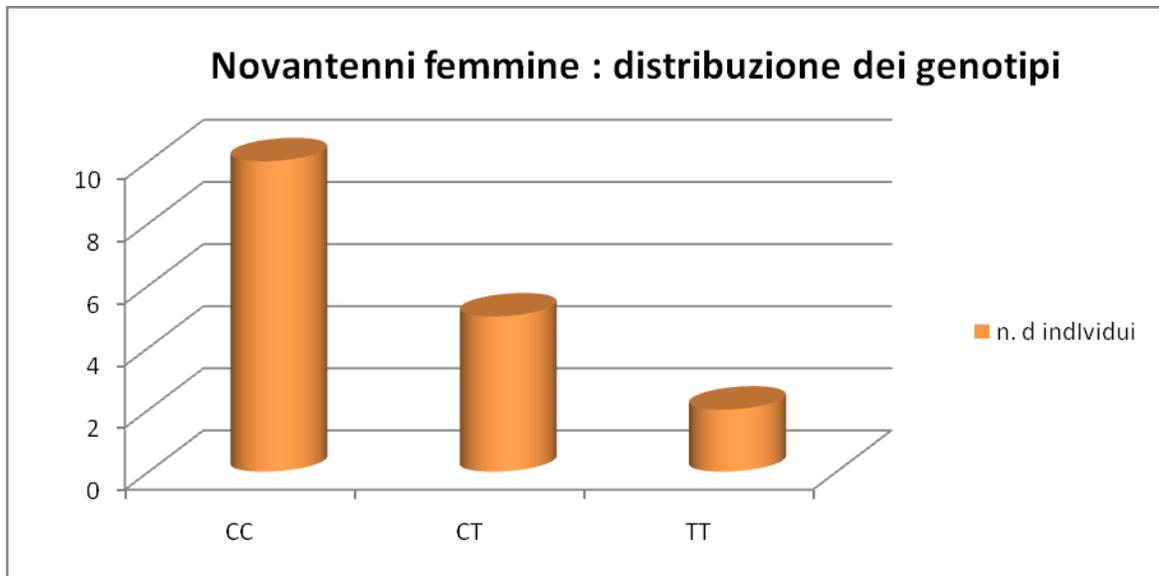


NOVANTENNI FEMMINE

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,735294
T	0,264706

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	10
CT	5
TT	2

Chi quadro ($gdl = 1$) = **1,015802**

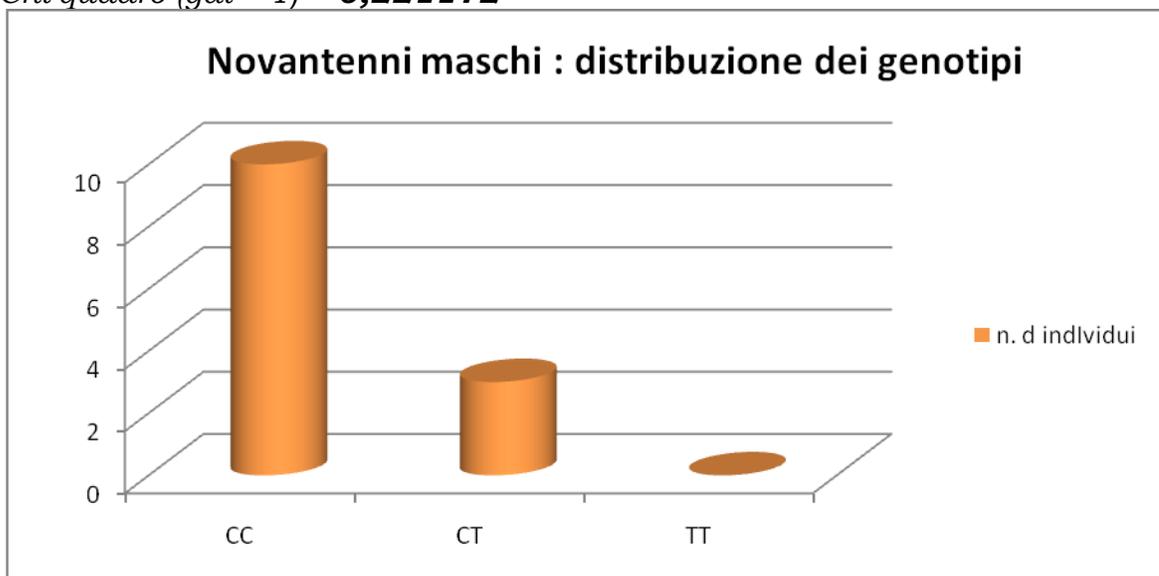


NOVANTENNI MASCHI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
C	0,884615
T	0,115385

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
CC	10
CT	3
TT	0

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,221172**

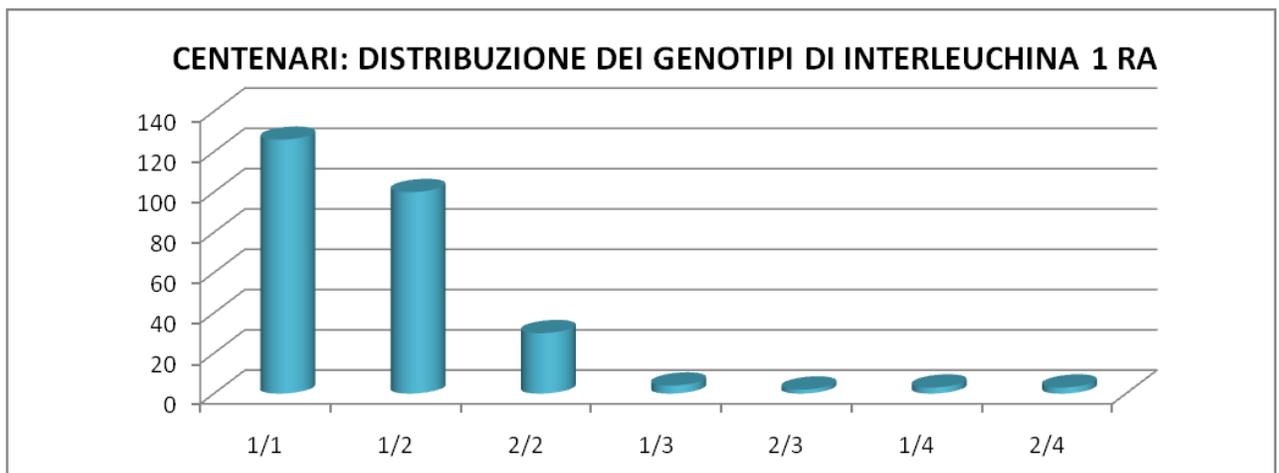


I test sugli ottantenni e i sessantenni sono tuttora in corso

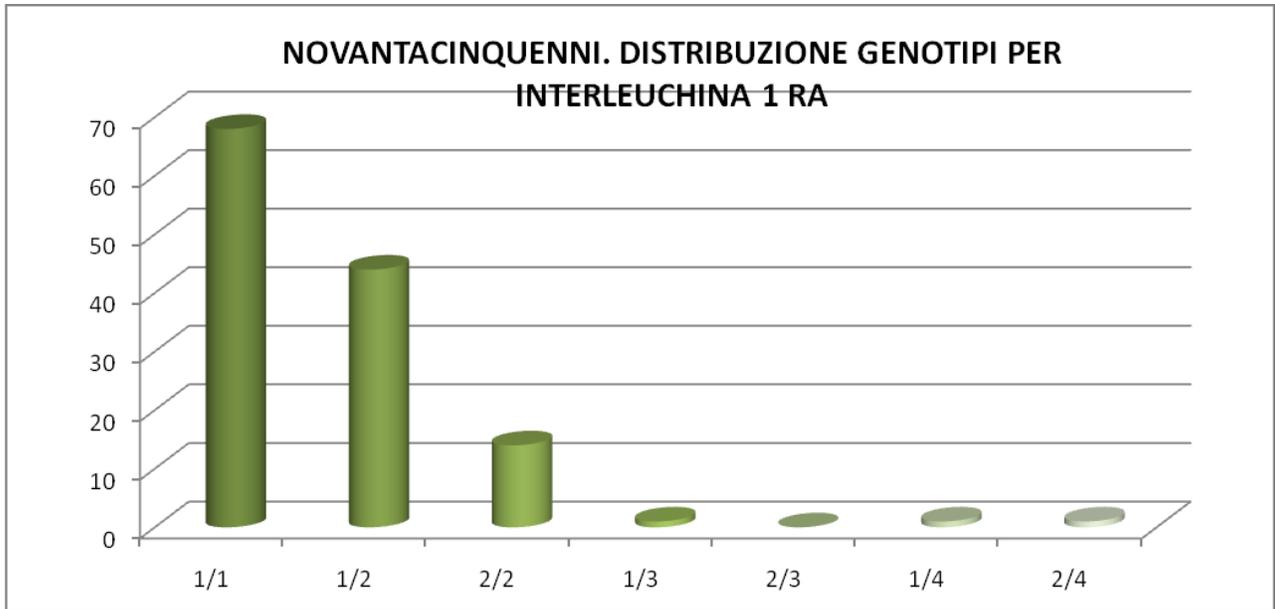
INTERLEUCHINA 1 RA

Le determinazioni del vntr dell'interleuchina 1 RA sono state svolte su un totale di 849 campioni validi.

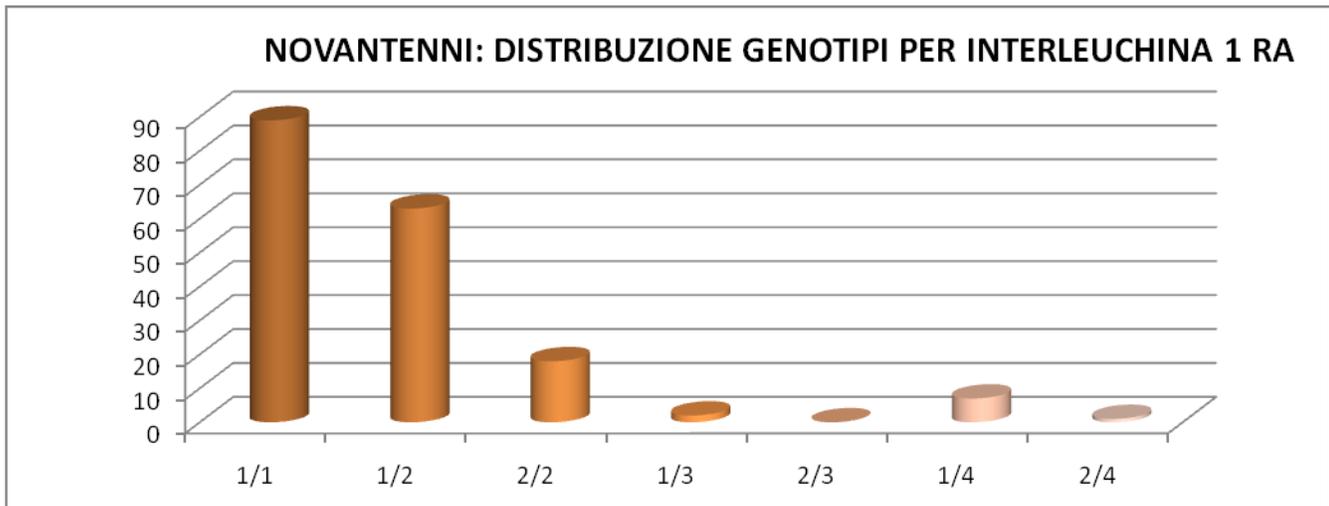
DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI NEI CENTENARI



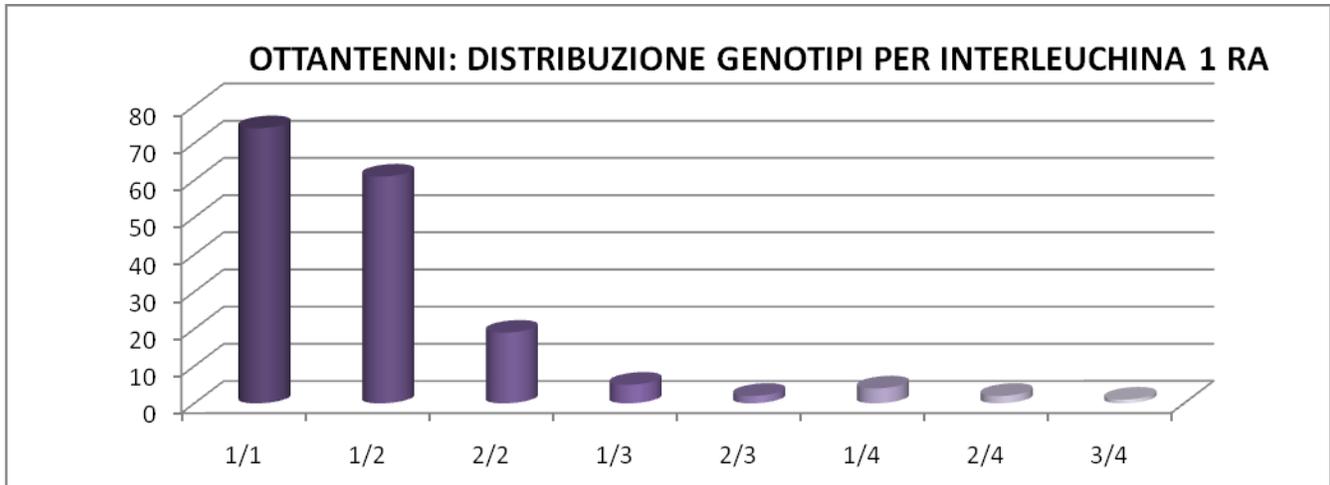
DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI NEI NOVANTACINQUENNI



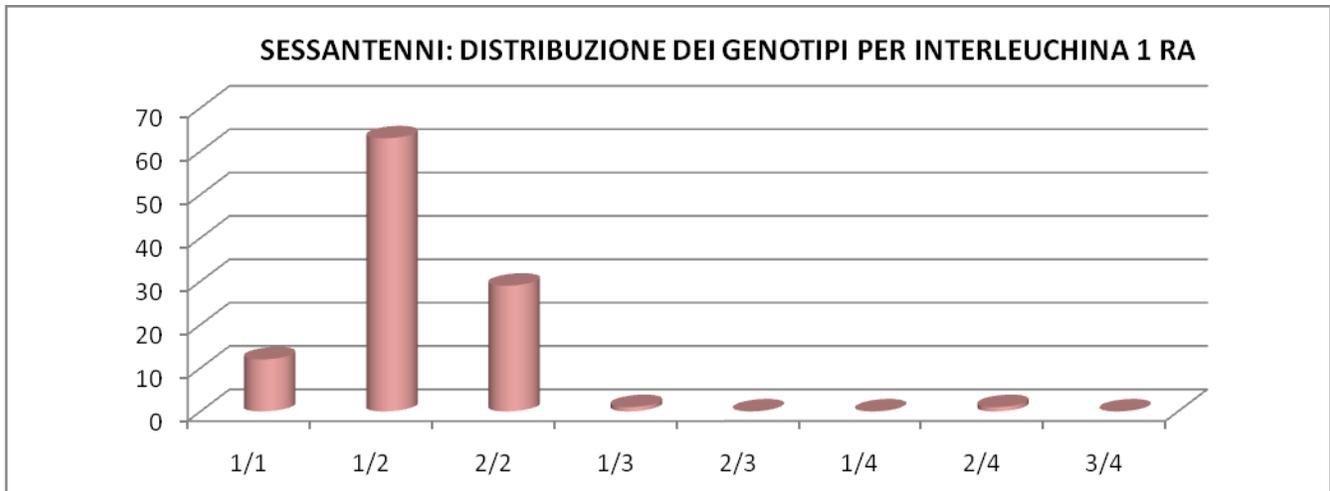
DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI NEI NOVANTENNI



DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI NEGLI OTTANTENNI



DISTRIBUZIONE DEI GENOTIPI NEI SESSANTENNI



INTERLEUCHINA-6 (-174 G → C)

I test sono stati eseguiti su una popolazione di 108 centenari e 125 sessantenni.

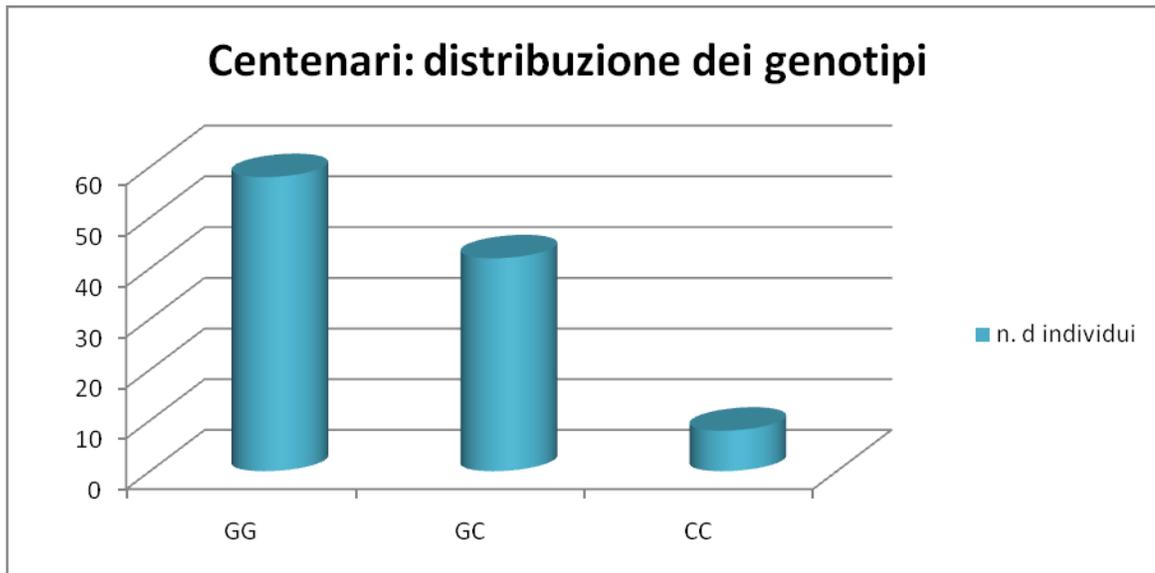
I test sulle altre classi di età sono tuttora in corso.

CENTENARI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
G	0,731481
C	0,268519

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
GG	58
GC	42
CC	8

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,010885**

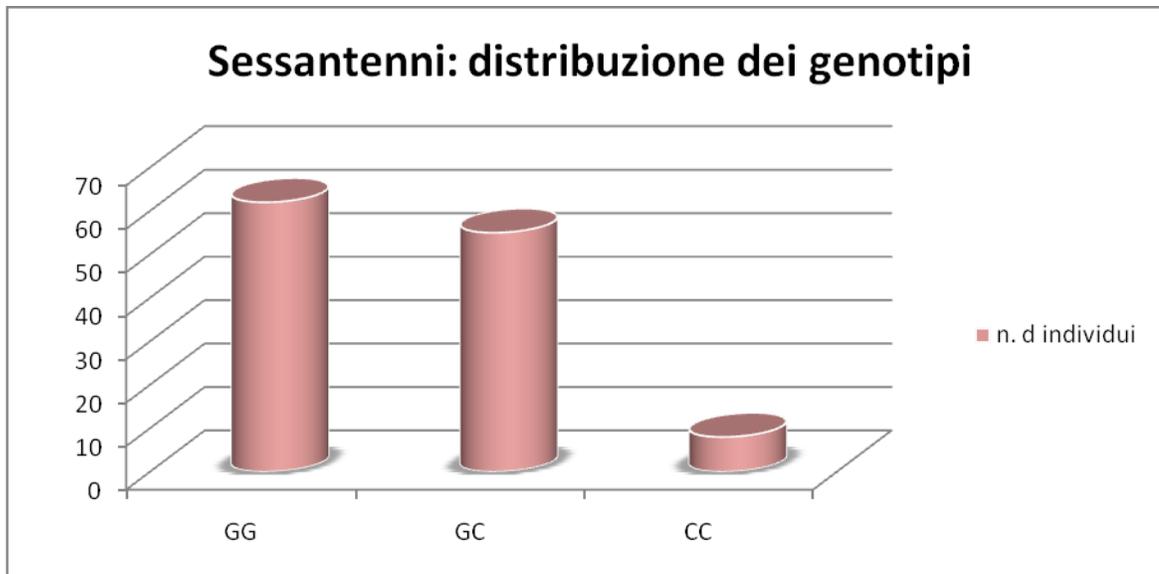


SESSANTENNI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
G	0,716
C	0,284

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
GG	62
GC	55
CC	18

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,838665**



INTERLEUCHINA-6 (-597 G → A)

I test sono stati eseguiti su una popolazione di 108 centenari e 125 sessantenni.

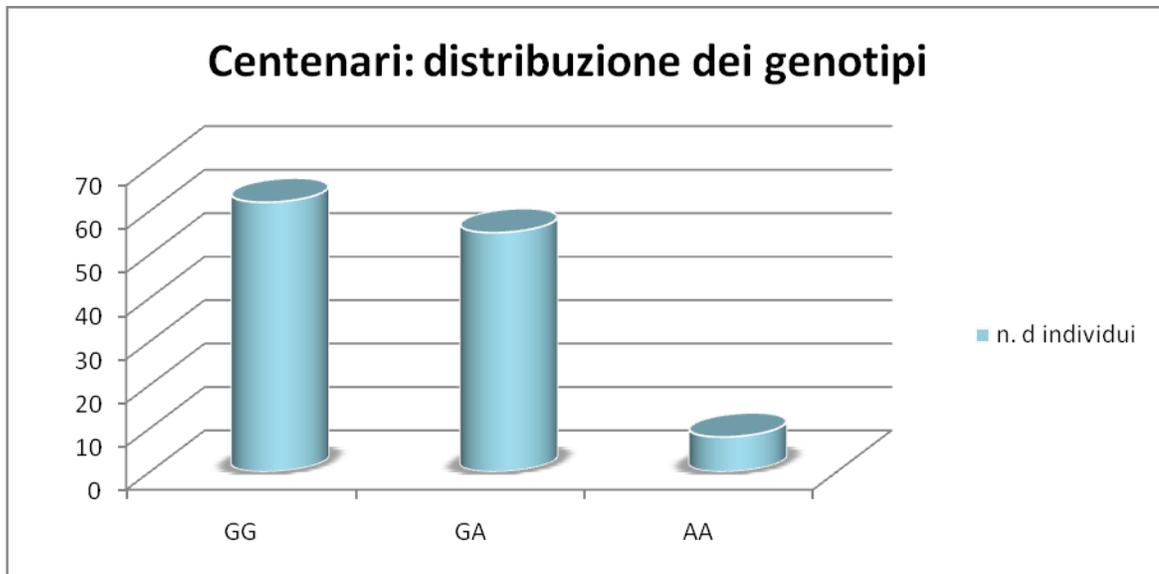
I test sulle altre classi di età sono tuttora in corso.

CENTENARI

Allele	Frequenza genica
G	0,731481
A	0,268519

genotipo	n. di individui osservati
GG	58
GA	42
AA	8

*Chi quadro (gdl = 1) = **0,010885***



SESSANTENNI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
G	0,716
A	0,284

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
GG	62
GA	55
AA	18

Chi quadro ($gdl = 1$) = **0,838665**

INTERLEUKINA-6 (-572 G → C)

I test sono stati eseguiti su una popolazione di 108 centenari e 125 sessantenni.

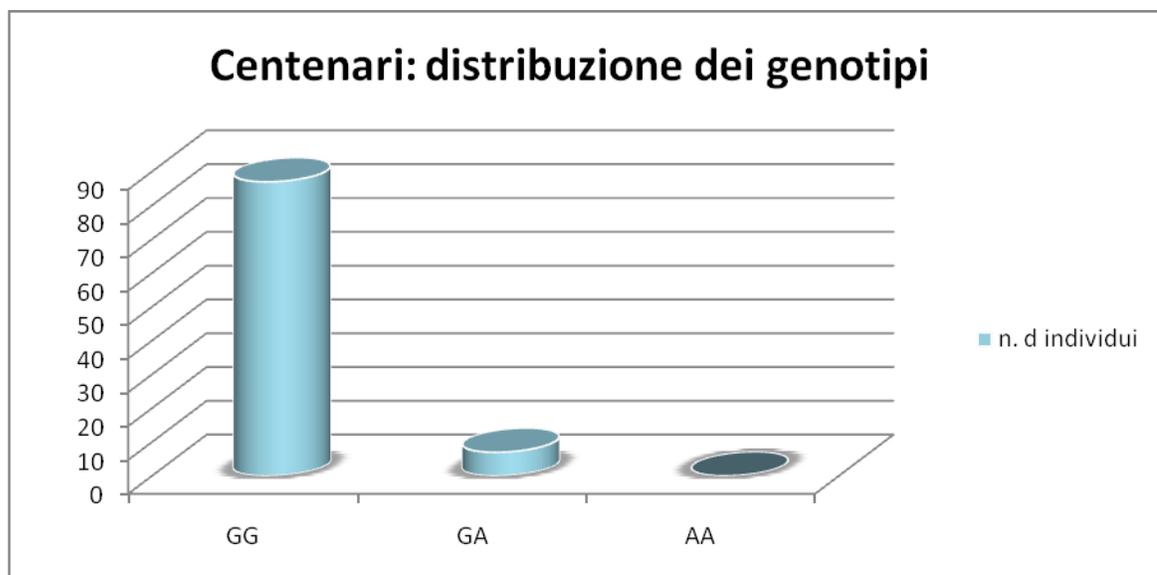
I test sulle altre classi di età sono tuttora in corso.

CENTENARI

<i>Allele</i>	<i>Frequenza genica</i>
G	0,962766
C	0,037234

<i>genotipo</i>	<i>n. di individui osservati</i>
GG	87
GC	7
CC	0

Chi quadro (gdl = 1) = 0,192485

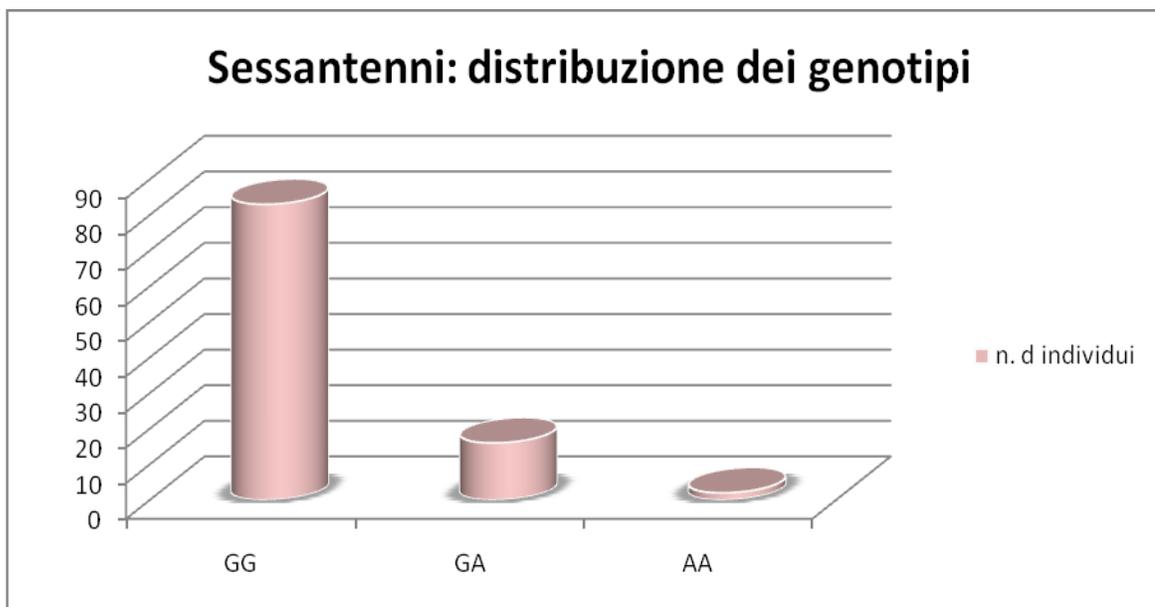


SESSANTENNI

Allele	Frequenza genica
G	0,90099
C	0,09901

genotipo	n. di individui osservati
GG	83
GC	16
CC	2

Chi quadro ($gdl = 1$) = **1,268934**



8. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'invecchiamento è un processo fisiologico naturale che modifica le abilità fisiche e cognitive di ogni individuo.

Negli ultimi anni si è assistito a un sempre maggior interesse, anche a livello scientifico, verso i cambiamenti che avvengono nella terza e nella quarta età che non devono essere considerati come esclusivamente negativi.

L'interleuchina 6 svolge un ruolo molto importante nell'ematopoiesi: è ormai evidente che la differenziazione delle cellule staminali all'interno del microambiente del midollo osseo si verifica grazie all'azione delle citochine prodotte dalle cellule dello stroma.

L'interleuchina-6 agisce in questo senso; inoltre una delle sue attività maggiori è la sinergia con IL-1 e TNF- α nella costimolazione delle cellule T; l'induzione della risposta nella fase acuta nelle cellule epatiche e nel centro ipotalamico della febbre; aumento di proliferazione, differenziazione e produzione di immunoglobuline delle cellule B. E' una delle citochine più importanti nella formazione della placca aterosclerotica legata all'età.

In particolare, intervenendo nel processo aterosclerotico inducendo la proliferazione delle cellule vascolari muscolari lisce e il reclutamento dei

linfociti l'IL-6 provoca degli effetti che possono portare ad un aumento o ad instabilità della placca.

Il gene oggetto di studio è localizzato nel cromosoma 7 (7q21).

L'analisi è stata fatta al momento in sole due fasce di età: sessantenni e centenari.

La distribuzione dei genotipi dei polimorfismi -174 G/C e -597 G/A seguono la distribuzione attesa con l'equilibrio di Hardy-Weinberg e non sono state osservate differenze significative fra i centenari ed i sessantenni.

Si può notare come la distribuzione dei due genotipi risulti la stessa. Ciò si deve alla presenza di un completo linkage disequilibrium fra l'allele C della -174 e l'allele A della -597.

Anche il terzo polimorfismo -572 G/C non ha mostrato differenze significative nei centenari e nei sessantenni.

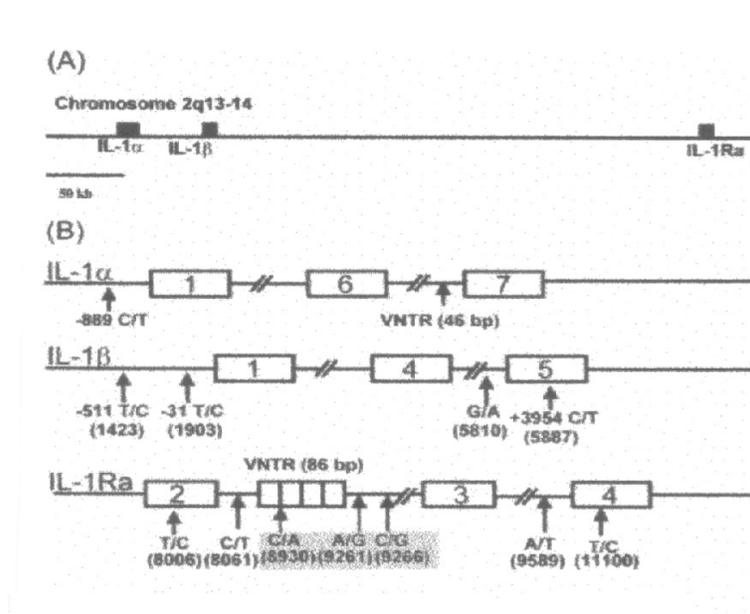
Studi condotti in precedenza avevano riportato un coinvolgimento dei polimorfismi dell'interleuchina-6 nell'invecchiamento. Infatti questa citochina proinfiammatoria può accelerare la progressione della malattia aterosclerotica e di conseguenza creare problemi a livello cardiaco.

Alcuni studi hanno dimostrato che i portatori dell'allele G al nucleotide -174 sviluppano alterazioni lipidiche, insulinoresistenza ed aumento dello spessore medio-intimale a livello dei vasi carotidei.

Tuttavia, i risultati ottenuti sono preliminari e sembrano indicare che i due polimorfismi -174 e -597 e -572 non sono associati con i processi di

invecchiamento nella popolazione sarda, poiché entrambe gli alleli sono equamente rappresentati sia nei centenari che nei sessantenni.

Il cluster del gene per l'interleuchina-1 è localizzato nel braccio lungo del cromosoma 2 (2q1) e contiene i geni per l'interleuchina-1 α , interleuchina-1 β e interleuchina-1 Ra all'interno di una regione di 430 kb (46-47-48).



In a) localizzazione dei geni del cluster dell'interleuchina-1 nel cromosoma 2; in b) la composizione in esoni ed introni.

Gli agonisti, l'interleuchina-1 α e interleuchina-1 β sono noti per avere una identica azione legandosi ad un singolo recettore di superficie cellulare (IL-1RI) che produce un segnale di trasduzione. Il terzo membro della famiglia, l'interleuchina-1Ra è un competitore antagonista altamente selettivo che si lega al recettore IL-1RI, ma il suo legame non produce effetti.

Sono stati identificati diversi marker biallelici e multipli nelle regioni circostanti il gene per l'interleuchina-1 e parecchi studi hanno dimostrato che questi polimorfismi giocano un ruolo fisiopatologico nell'influenzare la suscettibilità e la gravità di svariati disordini, includendo anche quelli correlati con l'età.

I test per interleuchina 1 beta sono stati eseguiti suddividendo i campioni per fasce di età: sessantenni, ottantenni, novantenni, novantacinquenni e centenari, al fine di verificare una eventuale distribuzione dei genotipi e degli alleli.

Inoltre per ogni classe di età è stata effettuata una analisi fra i sessi.

I risultati ottenuti non hanno mostrato un dato significativo se non per la distribuzione dei genotipi fra le donne novantenni, che non seguono l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Tale dato è ancora oggi oggetto di studi approfonditi per la sua conferma attraverso l'analisi di un campione più ampio.

I risultati ottenuti per il vntr di interleuchina 1 RA hanno mostrato ed hanno evidenziato la presenza di un quarto allele di cui, per ora si è in fase preliminare di caratterizzazione attraverso il suo sequenziamento. Infatti prima di poter procedere ad un'analisi statistica adeguata è bene definire la presenza di questo quarto allele.

I test eseguiti sul polimorfismo -899 C/T dell'interleuchina 1 alfa sono in numero esiguo e quindi possono essere considerati come preliminari. Al

momento non sono state evidenziate differenze significative dal punto di vista statistico nella popolazione esaminata.

Complessivamente i dati ottenuti vanno letti come uno studio iniziale e sono tuttora in fase completamento e di elaborazione statistica per confermare o smentire il ruolo di tutto il cluster dell'interleuchina-1 nella longevità.

BIBLIOGRAFIA

1. *The interleukin-1 cluster gene region is associated with multiple sclerosis in an Italian Caucasian population.*
Borzani I, Tola MR, Caniatti L, Collins A, De Santis G, Luiselli D, Mamolini E, Scapoli C.
Eur J Neurol. 2010 Jul;17(7):930-8. Epub 2010 Feb 23.
 2. *Association of IL1A and IL1B loci with primary open angle glaucoma.*
Mookherjee S, Banerjee D, Chakraborty S, Banerjee A, Mukhopadhyay I, Sen A, Ray K.
BMC Med Genet. 2010 Jun 19;11:99.
 3. *Interleukin 1 receptor antagonist polymorphisms are associated with the risk of developing acute coronary syndrome in Mexicans.*
Fragoso JM, Delgadillo H, Llorente L, Chuquiure E, Juárez-Cedillo T, Vallejo M, Lima G, Furuzawa-Carballeda J, Peña-Duque MA, Martínez-Ríos MA, Vargas-Alarcón G.
Immunol Lett. 2010 Oct 30;133(2):106-11. Epub 2010 Aug 13.
 4. *Genetic polymorphisms of interleukin-1-beta in association with sustained response to anti-viral treatment in chronic hepatitis B in Chinese.*
Chan HL, Tse AM, Zhang MD, Wong VW, Chim AM, Hui AY, Sung JJ.
Aliment Pharmacol Ther. 2006 Jun 15;23(12):1703-11.
 5. *Danilo Di Bona, Sonya Vasto, Cristiano Capurso, Lene Christiansen, Luca Deaina, Claudio Franceschi, Mikko Hurme, Eugenio Mocchegiani, Maeve Rea, Domenico Lio, Giuseppina Candore, Calogero Caruso. Effect of interleukin-6 polymorphisms on human longevity: A systematic review and meta analysis.* *Ageing Research Reviews* 8 (2009) 36-42.
 6. *Claudio Franceschi, Vladyslav Bezrukov, Hélienè Blanché, Lars Bolund, Kaare Christensen, Giovanna De Benedictis, Luca Deiana, Efsthathios Gonos, Antti Hervonen, Huanning Yang, Bernard Jeune, Tom B.L. Kirkwood, Peter Kristensen, Alberta Leon, Pier Giuseppe Pelicci, Leena*
- 80 Dott.ssa Maria Elena Sini *Polimorfismi genetici dell'interleuchina 1 e dell'interleuchina 6 nella popolazione sarda con particolare riferimento alle fasce di età avanzata* *Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica Università degli studi di Sassari*

Peltonen, Michel Poulain, Irene Maeve Rea, Josè Remacle, Jean Marie Robine, Stefan Shreiber, Ewa Sikora, Pieternella Eline Slagboom, Liana Spazzafumo, Maria Antonietta Stazi, Olivier Toussaint, and James W. Vaupel. *Genetics of Healthy Aging in Europe. The EU-Integrated Project GEHA (Genetics of Healthy Aging)*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1100:21-45 (2007). ©2007 New York Academy of Sciences. doi: 10.1196/annals.1395.003

7. Luca Deiana and James Vaupel. *LONGEVITY IN SARDINIA*. "The centenarian Island". *Biochimica Clinica* S.1 Gennaio-Febbraio 2006. Volume 30. ISSN 0393 – 3504.
 8. Robine J.M., Caselli G., 2005. An unprecedented increase in the number of centenarians. *Genus* LXI (1), 57-82.
 9. Poulain M., Pes G.M., Grasland C., Carru C., Ferrucci L., Baggio G., Franceschi C., Deiana L., 2004. Identification of a geographic area characterized by extreme longevity in the Sardinia island: the AKeA study. *Exp. Gerontol.* 39, 1423-1429.
 10. Caselli G., Lipsi M.R., 2005. Survival differences among the oldest old in Sardinia: who, what, where and why? Paper presented at XXV IUSSP Conference, Session 126 on "Mortality and causes of death at old ages: medical, social, economical and demographical determinants", Tours, 18-23 July.
 11. Ross O.A., Curran M.D., Meenagh A., et al. Study of age-association with cytokine gene polymorphisms in an aged Irish population. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124: 199-206.
 12. Robine J.M., Caselli G., Rasulo D., and Cournil A. (2003). "Explaining sex ratios from Northern to Southern Italy", Submitted to *Population Studies*.
 13. Caselli G., Lipsi R., 2003. *Geographical Mortality Differences and Trends for the Elderly in Sardinia, 1982-1998*. Dipartimento di Scienze Demografiche, Roma.
 14. Carru C, Pes GM, Deiana L, Baggio G, Franceschi C, Lio D, Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C. Association between the HFE mutations and longevity: a study in Sardinian population. *Mech Ageing Dev.* 2003 Apr;124(4):529-32.
- 81 Dott.ssa Maria Elena Sini *Polimorfismi genetici dell'interleuchina 1 e dell'interleuchina 6 nella popolazione sarda con particolare riferimento alle fasce di età avanzata* *Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica Università degli studi di Sassari*

15. Giovanni Mario Pes, Domenico Lio, Ciriaco Carru, Luca Deiana, Giovannella Baggio, Claudio Franceschi, Luigi Ferrucci, Fabiola Oliveri, Letizia Scola, Antonio Crivello, Giuseppina Candore, Giuseppina Colonna-Romano, Calogero Caruso Association between longevity and cytokine gene polymorphisms: a study in Sardinian centenarians. *Aging Clin. Exp. Res.*, 2003.
16. Vickers M.A., Green F.R., Terry C., et al. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc. Res.* 2002; 53: 1029-34.
17. Passarino G., Calignano C., Vallone A., Franceschi C., Jeune B., Robine J.M., Yashin A., Cavalli S., Luigi L., and De Benedictis G. (2002). "Male/female ratio in centenarians: A possible role played by population genetic structure", *Experimental Gerontology*, 37: 1283-1289.
18. Caruso G. Candore G., Colonna Romano G., Lio D. Bonafè M., Valesin S., Franceschi C. Immunogenetics of longevity. Is major histocompatibility complex polymorphism relevant to the control of human longevity? A review of literature data. *Mech. Age. Dev.* 122, 445-462, 2001.
19. Bonafe M, Olivieri F, Cavalloni L, et al. A gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2357
20. Koenig R., 2001. Sardinia's mysterious male methuselahs. *Science* 291, 2074-2076.
21. Passarino G., Underhill P.A., Cavalli-Sforza L.L., Senino, O., Pes G.M., Carru C., Ferrucci L., Bonafe M., Franceschi C., Deiana L., Baggio G., De Benedictis G., 2001. Y chromosome binary markers to study the high prevalence of males in Sardinian centenarians the genetic structure of the Sardinian population. *Hum. Hered.* 52, 136-139.
22. Barcellos L. Fl., Schito A.M., Rimmner J. B., Vittinghoff E., Shih A., et al. CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. *Immunogenetics* 51: 281-288, 2000.
23. Yudkin J.S., Kumari M., Humphries S.E., Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000; 148: 209-14.

24. Fernandez-Real J. M., Broch M., Vendrell J., Gutierrez C., Caamitjana R., et al. Interlukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 2000, 85 : 1334-1339.
 25. Brull D.J., Montgomery H. E., Sanders S., Dhamrait L., Luong A., Rumley G.D.O., Lowe S.E., Humphries. Interlukin-6 gene -174 G>C and -572 G>C promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interlukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* September 2001: 1458-1463.
 26. Deiana L., Pes G.M., Carru C. et al. β -thalassemia trait and G6PD deficiency are associated with increased longevity in Sardinia. *Clin. Chem.* 2000; 46:A210.
 27. Franceschi C., Motta L., Valensin S., Rapisarda R., Frantone A., Berardelli M., Motta M., Monti D., Bonafe M., Ferrucci L., Deiana L., Pes G.M., Carru C., Desole M.S., Barbi C., Sartoni G., Gemelli C., Lescai F., Olivieri F., Marchigiani F., Cardelli M., Cavallone L., Guerresi P., Cossarizza A., Troiano L., Pini G., Sansoni P., Passeri G., Lisa R., Spazzafumo L., Amadio L., Giunta S., Stecconi R., Morresi R., Viticchi C., Mattace R., De Benedictis G., Baggio G., 2000. Do men and women follow different trajectories to reach extreme longevity? Italian multicenter study on centenarians. *Aging (Milan)* 12,77-84.
 28. Poulain M., Pes G.M., Carru C., Baggio G., Franceschi C., Ferrucci L., Deiana L., 2000. The Validation of a Population of Exceptional Longevity in Sardinia. Paper presented at the IUSSP seminar on longevity held in Montpellier IN 2000
 29. Perls T., Shea-Drinkwater M., Bowen-Flynn J., Ridge S.B., Kang S., Joyce E., Daly M., Brewster S.J., Kunkel L., Pucca A.A., 2000. Exceptional familial clustering of extreme longevity in humans. *J. Am. Geriatr. Soc.* 48 (11), 1483-1485.
 30. Caruso G. Candore G., Colonna Romano G., Troiano G. Bonafè M., Franceschi C. Lio D. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in Italian centenarians. II European Congress of Biogerontology Saint-Petersburg, 2000.
 31. Yashin A.I., De Benedictis G., Vaupel J.W., Tan Q., Andreev K.F., Iachine I.A., Carotenuto L., et al (1999). Genes, demography and life span: the contribution of demographic data in genetic studies of aging and longevity. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 1178-1193.
 32. Wich G., Perschinka H., Xu Q. Autoimmunity and atherosclerosis. *Am. Heart J.* 138, s444-s449, 1999.
- 83 Dott.ssa Maria Elena Sini Polimorfismi genetici dell'interleuchina 1 e dell'interleuchina 6 nella popolazione sarda con particolare riferimento alle fasce di età avanzata *Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica Università degli studi di Sassari*

33. Paweluc G., Effros R. B., Caruso C., Remarque E., et al. T cell and aging. *Front. Biosci: D216 4*, 269, 1999.
34. Bidwell J., Keen L., Gallagher G., Kimberly R., et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line database. *Genes Immunity 1*, 3-19, 1999.
35. Dawkins R., Leelayuwat C., Gandieri S., Tay G., et al. Genomics of major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immun. Rev. 275-304*, 167, 1999.
36. Massimiliano Bonafè, Fabiola Olivieri, Daniela Mari, Giovannella Baggio, Rosario Mattace, Maurizio Berardelli, Paolo Sansoni, Giovanna De Benedictis, Maria De Luca, Francesca Marchegiani, Luca Cavallone, Maurizio Cardelli, Simona Giovagnetti, Luigi Ferrucci, Loredana Amadio, Rosa Maria Lisa, Maria Giovanna Tucci, Leonarda Troiano, Garbiella Pini, Paola Guerresi, Marina Morellini, Sandro Sorbi, Giovanni Passeri, Cristiana Barbi, Silvana Valensin, Daniela Monti, Luca Deiana, Giovanni Mario Pes, Ciriaco Carru, and Claudio Franceschi. P53 Codon 72 polymorphism and longevity: additional data on centenarians from continental Italy and Sardinia. *American Journal Human Genetic 1999; 65(6):1782-1785*.
37. Hall I. P., Wheatley A., Christe G., McDougall C., Hubbard R. Helms P.J. Association of CCR5 delta-32 with reduced risk of asma. *Lancet 354: 1264-1265*, 1999.
38. Deiana L., Ferrucci L., Pes G.M., Carru C., Delitala G., Ganau A., Mariotti S., Nieddu A., Pettinato S., Putzu P., Franceschi C., Baggio G.: AKEntAnnos. The Sardinia Study of extreme longevity. *Aging Clin. Exp. Res. 11: 142-149*, 1999.
39. Baggio G., Franceschi C., Mari D., Herskind A.M., Andersen-Ranberg K., Jeune B., 1998. Biology and genetics of human longevity. *Australas J. Aging 17,8-10*.
40. Hill A,V,S., 1998. The immunohenetics of human infections disease. *Ann. Rev. Immu. 16*, 593-617.
41. Yashin A., Vaupel J., Andreev K.F., Tan Q., Iachine T.A., Carotenuto L., De Benedictis G., et al (1998). Combining genetic and demographic information in population studies of aging and Longevity. *J. Epidemiol. Biostat. 3:289-*
42. 294.
- 84 Dott.ssa Maria Elena Sini Polimorfismi genetici dell'interleuchina 1 e dell'interleuchina 6 nella popolazione sarda con particolare riferimento alle fasce di età avanzata *Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica Università degli studi di Sassari*

43. *The Italian Multicentric Study on Centenarians: Epidemiologica and socio-economic aspects of Italian Centenarians. Arch. Gerontol. Geriat. 25: 149-157, 1997.*
44. *Zheng Z. X., Wang Z. S., Zhu H. M., Yang J. Y., Peng H. Y., Wang L. X., Li L., Jiang X. W., Yu Y. F.: Survey of 160 centenarians in Shangay. Aged Ageing 22: 16-19, 1997.*
45. *Zimmerman P.A., Buckler-White A., Alkhatib G., Spalding T. et al.. inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. Mol. Med. 3: 23-26, 1997*
46. *Ferguson G., Wikby A., Maxon P., Olsson J., Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population oh Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. J. Geront. Scr. A-Biol Med. 50 b378-b382. 1995.*
47. *Franceschi C., Monti D., Barbieri D., Grassilli E., Troiano L., Salvioli S., Negro P., Capri M., Guido M., Azzi R., Sansoni P., Paganelli R., Fagiolo U., Baggio G., Donazzan S., Mariotti S., D'Addato S., Gaddi A., Ortolani C., Cossarizza A.: Immunosenescence in humans: deterioration or remodelling. Int. Rev. Ummunol. 12: 57-74, 1995*
48. *Bulpitt C. J., Fletcher A. E.: Prolonging life in elderly people: a worthwhile goal of medical care. Aging Clin. Exp. Res. 7: 402-406, 1995.*
49. *Franceschi C., Monti D., Sansoni P. Cossarizza A. The immunology of exceptional individuals : the lesson of centenarian. Immunol, Today 16, 12-16, 1995.*
50. *Vaupel J.W., Jeune B., 1995. The emergence and proliferation of centenarians. In: Jeune B., Vaupel J.W. (Eds.), Exceptional Longevity: From Prehistory to the present. Springer, Verlag.*
51. *Jeune B., Vaupel J. (Eds.), 1995. Exceptional Longevity: From Prehistory to the Present. Odense Monographs on Population Aging, vol. 2. Odense University Press, Odense.*
52. *Tarlow J.K., Blakemore A.I., Lennard A. Solari R., et al. Polymorphosm in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. Hum. Gen. 91, 403-404, 1993.*
- 85 *Dott.ssa Maria Elena Sini Polimorfismi genetici dell'interleuchina 1 e dell'interleuchina 6 nella popolazione sarda con particolare riferimento alle fasce di età avanzata Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica Università degli studi di Sassari*

53. Fagiolo U., Cossarizza A., Scala E., Fanales-Belasio E., Ortolani C., Cozzi E., Monti D., Franceschi C., Paganelli R.: *Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. Eur. J. Immunol.* 23: 2375-2378, 1993.
54. Wayne J., Rhyne R. L., Garry P. J., *Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60 . J. Geront.* 45, 45-48. 1990.