



Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

23° corso di formazione avanzata

Aging

14-15-16 maggio 2025 – CORSO ONLINE

A cura di CarloAlberto Redi

23° corso di formazione avanzata

Aging



Progetto “Progressi in Biologia e Medicina”

23° Corso di formazione avanzata

Aging

14-15-16 maggio 2025 – CORSO ONLINE

A cura di CarloAlberto Redi

© Copyright 2025  Edizioni Internazionali - Pavia

Edizioni Internazionali srl
Divisione EDIMES - Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120
E-mail: edint.edimes@tin.it

Tutti i diritti sono riservati.
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)
senza il permesso scritto dell'editore.

Indice

Prefazione	pag.	VI
<i>CarloAlberto Redi</i>		
1. De omnibus rebus et de quibusdam aliis	»	1
<i>CarloAlberto Redi</i>		
2. Ageing, clonal haematopoiesis and blood cancer prevention	»	4
<i>George Vassiliou</i>		
3. Sinaptogenesi e conservazione delle funzioni cognitive	»	5
<i>Michela Matteoli</i>		
4. Prevenzione e mercato della medicina	»	8
<i>Silvio Garattini</i>		
5. Anemia of Older Persons	»	10
<i>Luca Malcovati</i>		
6. Human haematopoietic stem cell ageing at single cell resolution	»	13
<i>Elisa Laurenti</i>		
7. Oociti e invecchiamento: il ruolo dei fattori cellulari e ambientali e l'impatto sulla fertilità femminile	»	16
<i>Manuela Monti</i>		
8. Inflammaging tra eterogeneità e personalizzazione	»	21
<i>Claudio Franceschi</i>		
9. Dinamiche Ambientali e Epigenetica nell'Inflammaging: verso una Nuova Comprensione del Benessere e della Salute	»	24
<i>Valentina Bollati</i>		
10. L'approccio nutrizionale alla longevità: evidenze e miti	»	28
<i>Riccardo Caccialanza</i>		
11. Unraveling the aging process. L'Influenza della nutrizione e dello stile di vita sulla longevità e salute degli anziani	»	29
<i>Hellas Cena, Sara Santero</i>		

12. Prevention of dementia: modifiable and non modifiable risk factors	pag.	33
<i>Alfredo Costa</i>		
13. C'è una dieta che allunga la vita?	»	36
<i>Giuseppe Remuzzi</i>		
14. Rejuvenating aged stem cells: therapeutic strategies to extend health and lifespan	»	40
<i>Maria Carolina Florian</i>		
15. Il problema della longevità e invecchiamento in buona salute: avanzamento delle conoscenze delle basi molecolari, sviluppi tecnologici e prospettive di applicazioni in campo medico	»	49
<i>Valerio Orlando</i>		
16. Nuclear Homeostasis During Aging: Dysregulation of Reversible Phosphorylation	»	52
<i>Konstantinos Lefkimiatis</i>		
17. The Thermodynamic Hypothesis of Protein Aggregation	»	55
<i>Michele Vendruscolo</i>		

Prefazione

Ormai da alcuni decenni la struttura demografica delle popolazioni occidentali vede aumentare consistentemente la fascia di individui che progrediscono nell'età anagrafica con un buon (o mal) invecchiamento venendo così a costituire un sempre più numericamente elevato segmento della popolazione globale detto degli "anziani". Il termine anagrafico varia ovviamente in base alla popolazione considerata e così l'ONU suggerisce i 60 anni (considerando gli attuali otto miliardi di individui e dunque anche le aree più svantaggiate in termini di prospettiva di vita alla nascita), il WHO suggerisce i 65 anni mentre la SIGG (Società Italiana di Gerontologia e Geriatria) propone di innalzare a 75 anni l'età anagrafica in cui si diventa anziani.

Il CRDU della Fondazione Ghislieri, per propria vocazione istituzionale attento alle nuove prospettive in Biologia e Medicina, dedica il 23° corso di formazione avanzata ("aging") ad una dettagliata analisi delle ricerche in Biologia dell'invecchiamento ed alle sue relative applicazioni in Medicina.

Nel corso delle giornate di studio i partecipanti saranno introdotti ai concetti biologici (molecolari, cellulari e sovracellulari) di base della geromedicina ed accompagnati ad una piena comprensione degli avanzamenti scientifici del fenomeno invecchiamento. Il corso intende infatti porre in termini di riflessione critica le opportunità offerte dalla fine comprensione biologica del fenomeno senescenza per l'utilizzo delle stesse ai fini di interventi terapeutici volti a mitigare il declino di tutte le attività fisiologiche connesse al fenomeno. In questa prospettiva l'invecchiamento è considerato come un processo di sovraespressione di gerogeni (quei geni la cui espressione favorisce l'invecchiamento biologico) che può essere marcatamente ridotta da gerosoppressori (in perfetta analogia con l'azione degli oncogeni soppressori sugli oncogeni). Gerogeni e gerosoppressori sono infatti spesso associati alle patologie relazionate all'avanzata età anagrafica divenendo in tal modo bersaglio elettivo per la prevenzione e il trattamento delle malattie stesse. L'eterogeneità dell'espressione di gerogeni/gerosoppressori (e dunque di tutti gli aspetti sanitari legati all'invecchiamento) è vista alla luce dell'interazione degli stessi con i fattori di rischio ambientali, comportamentali, psicologici, stili di vita, etc., fatto questo che permette la scoperta di nuovi biomarcatori della loro espressione e la progettazione di nuovi farmaci per la personalizzazione delle terapie (geromedicina di precisione).

Lo scopo ultimo dello sforzo di biologi e medici è quello di assicurare una vita degna di essere vissuta anche a chi è giunto ad età anagrafiche avanzate, sino

a pochi decenni orsono impensabili, permettendo loro di contribuire ancora con nuovi ruoli (“assistente di vita indipendente”, ad esempio) ad un armonioso e sereno convivere sociale: da “peso” (economico, familiare, etc) per la società a risorsa ! Saranno presentati dunque anche i dati utili per poter gestire al meglio i mutamenti che una sempre maggiore e progressiva presenza di “anziani” provoca nelle società civili: al termine delle giornate infatti i prof. Venki Ramakrishnan, Giuseppe Remuzzi e Michele Vendruscolo svolgeranno riflessioni per una concezione della biologia della longevità utile anche oltre il campo strettamente medico.

CarloAlberto Redi



De omnibus rebus et de quibusdam aliis

CarloAlberto Redi

Accademico dei Lincei, Presidente Comitato Etica Fondazione Umberto Veronesi,
Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie Lazzaro Spallanzani,
Università degli Studi di Pavia

Questa espressione latina mi è parsa la più adatta per riferirmi alla alta varietà di temi e argomenti che saranno presentati nel corso di queste giornate nel corso delle quali ci occuperemo “di tutte le cose e di alcune altre” che riguardano il fenomeno aging. Ciò è dovuto al fatto che per discutere di aging è in effetti necessario affrontare una panoplia di argomenti che sottendono competenze e professionalità molte diverse tra loro il che si riflette nell’altissima varietà di saperi chiamati ad esprimersi su quella che si configura come una delle più potenti e pervasive tematiche della medicina del nuovo millennio. Il termine stesso (*aging*, *invecchiamento*) contiene già la moltitudine degli aspetti teorico-concettuali e applicativi del fenomeno biologico che si riverbera su tutti i campi del sapere umano, dalla sociologia ai saperi umanistici, dalla biologia alla medicina. Di queste ultime due aree ci occuperemo; ovviamente non tratteremo un’altrettanta ampia varietà di temi legati ad aspetti di grande richiamo pubblicitario nella società dell’infosfera, quelli che un tempo facevano riferimento agli elisir di lunga vita e altri imbrogli: mitico al riguardo il fluido portentoso, a base di estratti di testicolo di cane, sviluppato da Charles-Édouard Brown-Séquard (1817-1894); in clinica si usa ancora il suo nome per riferirsi a una precisa sindrome neurologica) al quale crederanno facendone uso persino Émile Zola e Louis Pasteur (1)! Svelare quanto di cialtronesco venga proposto sul tema *aging* è importante perché nella società dell’immagine e dell’infosfera questi aspetti sono sempre più presenti e pericolosi per la salute: trattano infatti in termini subdoli e squisitamente commerciali aspetti assai rilevanti quali l’epigenetica dello sviluppo embrionale (la salute in vecchiaia inizia nel grembo materno) e gli aspetti nutrizionali (dei quali sentiremo novità). Basterà pensare all’insistenza nell’assunzione di sostanze quali la metformina (prescritta per decenni per il trattamento del diabete) o la ritalina (prescritta per trattare i disordini dovuti ai deficit di attenzione) o ai viaggi (per i più facoltosi) sino a Próspera, un delizioso luogo in Honduras (fondato e finanziato dal signor PayPal, Peter Thiel) dove è possibile sottoporsi a trattamenti di inserzione genica per produrre poi in quantità una proteina, la follistatina, capace di promuovere crescita muscolare e determinare l’allungamento dei telomeri (il cui accorciamento, come è ben noto a tutti noi, è associato alla senescenza). Il vero problema di queste fughe in avanti è che l’aging non è classificato come malattia! e dunque è difficilissimo poter sviluppare protocolli medici per il suo trat-

tamento. Di recente però negli USA è stato approvato un trial di fase 1 per l'utilizzo della metformina come farmaco anti-aging (!) ed è questo un segnale indicativo di un potente cambiamento concettuale.

Poco tempo addietro infatti l'invecchiamento, *aging*, era considerato un fenomeno biologico irreversibile legato al normale processo di sviluppo: oggi non è più così. In particolare questo interesse nasce da un potente movimento culturale propagato dalla potenza della rete che vede il corpo umano come una qualunque macchina cartesiana (un hardware, ne più ne meno) che può essere *hackerata* (violata) in funzione di una sua ottimizzazione, di una sua miglìoria (come per gli edifici). Questo movimento ha ben noti epigoni (nel senso letterale del termine), basti pensare a Peter Thiel e Elon Musk, i quali suggeriscono il ricorso ad impianti cerebrali e l'uso di droghe per migliorare le capacità mentali e corporali assicurandosi, sperabilmente, nel contempo una buona estensione temporale della vita. Nei fatti queste dichiarazioni pubblicitarie hanno però certamente sostenuto l'opportunità da parte dei tanti biologi, medici, chimici (nessuna scienza immune) di conoscere il dettaglio biologico, i meccanismi e i marcatori, del processo/fenomeno *aging* al fine di concretizzare in medicina delle realtà diagnostiche, prognostiche e per tentare di rispondere, progettando sempre nuove ricerche, a bisogni terapeutici ad oggi inevasi.

Nella miriade di ricerche che si stanno svolgendo sul tema aging mi paiono di grande potenzialità per future scoperte, e dunque invenzioni e applicazioni, tutte quelle di cui sentiremo trattare in questi giorni, tutte quelle che tentano di individuare i processi molecolari che nel corso del tempo si deregolano scatenando poi quei fenomeni che riconosciamo con il termine ombrello aging.

Un primo necessario prerequisito è far chiarezza sulla dinamica dell'aging delle varie popolazioni cellulari che compongono il corpo dei Mammiferi. E così da apprezzare il lavoro svolto da Zhang e collaboratori (2) i quali grazie a tecniche di *single cell analysis*, hanno dettagliato, nel topo, il trascrittoma di oltre 20 milioni di cellule di ben 623 differenti tessuti nel corso degli stadi di sviluppo per entrambi i sessi: hanno così potuto rivelare l'esistenza di oltre 3.000 differenti stati cellulari. Questi sono poi stati associati a precise dinamiche cellulari di sviluppo nel corso del tempo per ciascun organo in termini sesso-specifici: ne è emersa un'espansione di specifiche popolazioni cellulari tempo-correlate e controllate dal sistema immunitario e dunque la rilevanza delle ricerche sul ruolo svolto dai linfociti nei processi di invecchiamento cellulare. Questi recentissimi dati sostengono fortemente l'idea che sia la senescenza cellulare il *primum movens* in una varietà di processi (dallo sviluppo embrionale alla tumorigenesi) ed in particolare nell'aging. La senescenza cellulare è oggi riconosciuta come uno specifico stato indotto sia da fattori esogeni sia endogeni e caratterizzato in particolare dal blocco del ciclo cellulare, l'espressione delle proteine inibitrici la chinasi ciclino-dipendente (e.g. p16Ink4a e p21CIP1), l'attività della b-galattosidasi (SA-b-Gal) e di particolare rilievo un fenotipo secretorio che include una serie di chemochine, interleuchine, fattori di crescita e proteasi. Sarà la dissezione dei diversi ruoli giocati da queste sostanze a fornire utili indicazioni per lo sviluppo di interventi mirati a bloccare selettivamente le differenti senescenze cellulari: la senescenza cellulare è difatti il motore (la prima causa aristotelica!) nel determinare il ruolo meccanicistico delle diverse popolazioni cellulari nel fenomeno

aging e nelle diverse condizioni patologiche. Ad esempio è proprio la p16Ink4a il marcatore attualmente più utilizzato negli studi sulla senescenza poiché gioca un ruolo determinante nell'inibire la ciclina CDK4/6 bloccando la progressione del ciclo cellulare tra la fase G1 e la S (sono già in commercio modelli animali murini geneticamente ingegnerizzati della p16Ink4a).

Naturalmente molte altre ricerche sono di rilievo e di grande interesse, da quelle più classiche sull'accorciamento dei telomeri, un classico della biologia della senescenza, al ruolo svolto dai neutrofili. Per questi ultimi vi è un particolare focus nello studio delle sostanze a funzione pro-infiammatoria da loro secrete nel corso del tempo quali le citochine (TNF- α , IL-10, IL-8, IL-6, IL-17), le defensine ed i mediatori lipidici come le resolvine: di estremo rilievo le ultime scoperte che vanno ad aggiungersi a queste già note, quelle chiamate Large Aging-Neutrophil-Derived Vesicles (LAND-Vs), che costituiscono una nuova classe di vescicole extracellulari specifiche dei neutrofili "aged" (il cui studio pare estremamente promettente; (3). Come lo è l'impiego di micro RNA per ristabilire le fisiologiche attività delle cicline nel controllo della progressione del ciclo cellulare: miR-302b si è dimostrato capace di questa attività (2).

"Di tutte le cose e di alcune altre" sentiremo e discuteremo (4, 5).

Bibliografia

1. Bencivelli S, Tre colpi di genio e una pessima idea. Ascesa e caduta di uno scienziato squinternato, Bollati Boringhieri, Torino. 2025.
2. Zhang Z, et al. A panoramic view of cell population dynamics in mammalian aging, *Science*. 2025; 387: 262.
3. Bi Y, et al. *Cell Metab*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2024.11.013> (2025).
4. MIT Technology Review, The longevity issue, September/October 2019.
5. MIT Technology Review, The mortality issue, November/December 2022.
6. Hsu AY, et al. Neutrophil-derived vesicles control complement activation to facilitate inflammation resolution. *Cell*. 2025; 188: 1623-1641.
7. Olshansky S. J., From Life Span to Health Span: Declaring "Victory" in the Pursuit of Human Longevity, *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2024; doi: 10.1101/cshperspect.a041480.
8. Zhao et al., Identifying specific functional roles for senescence across cell types, *Cell*. 2024; 187: 7314-7334.

Ageing, clonal haematopoiesis and blood cancer prevention

George Vassiliou

Professor of Haematological Medicine & Honorary Consultant Haematologist, University of Cambridge & Cambridge University Hospitals, United Kingdom

Each day humans produce more than 200 billion mature blood cells from 50,000-200,00 hematopoietic stem cells (HSCs).

Like all somatic cells these long-lived HSCs inexorably acquire somatic mutations over time.

Most mutations have no conspicuous consequences, but a small minority impart their host HSC with a fitness advantage and drive it to expand clonally.

This phenomenon, known as clonal haematopoiesis (CH), becomes ubiquitous with advancing age and is associated with an increased risk of blood cancers, as well as several non-haematological diseases.

Over the last few years, we have been working to decipher the causes and consequences of CH, with a particular focus on

- understanding the basis of clonal expansion,
- quantifying the risk of progression to blood cancer and
- developing therapeutic approaches to prevent such progression.

In my talk, I will describe our progress with the hope of convincing you that we can make blood cancer prevention a clinical reality in our lifetime.

Bibliografia

For a detailed review of the field and relevant bibliography see: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39352393/>

Sinaptogenesi e conservazione delle funzioni cognitive

Michela Matteoli

Professor of Pharmacology, Humanitas University and Director of Neuroscience Program,
Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milano

La sinapsi è il punto di comunicazione tra due neuroni o tra un neurone e una cellula effettrice (come una cellula muscolare o ghiandolare). La sinapsi consente il trasferimento di segnali elettrici o chimici tra le cellule nervose, permettendo la trasmissione delle informazioni all'interno del sistema nervoso. Le sinapsi sono essenziali per il funzionamento del sistema nervoso, in quanto permettono la trasmissione delle informazioni, sia per funzioni semplici (come i riflessi) che per processi cognitivi complessi (come l'apprendimento e la memoria).

Durante l'infanzia, il numero di sinapsi nel cervello raggiunge il suo picco intorno ai due-tre anni. Questo spiega perché il cervello dei bambini è spesso paragonato a una spugna: in questa fase di intensa sinaptogenesi, è in grado di assorbire una quantità straordinaria di informazioni. Tuttavia, con il tempo, il sistema nervoso necessita di un processo di regolazione per ottimizzare le connessioni neuronali. Quindi, a partire dall'infanzia e proseguendo fino alla tarda adolescenza, ha luogo un fenomeno noto come pruning sinaptico (o potatura sinaptica). Questo processo selettivo elimina le sinapsi meno utilizzate, mentre quelle più attive vengono rafforzate. Si tratta di un meccanismo essenziale per la formazione e la stabilizzazione dei circuiti neurali, analogo alla potatura di un cespuglio: rimuovendo le connessioni in eccesso, il sistema nervoso assume una struttura più efficiente e specializzata. Durante questo periodo, che si estende fino ai 22-23 anni, il cervello continua a perfezionare la propria rete sinaptica, consolidando le connessioni più funzionali.

Anche in età adulta, il numero e la forza delle sinapsi non rimangono immutabili, ma subiscono continui adattamenti e modificazioni nel corso dell'intera vita. Si parla di plasticità sinaptica, cioè della capacità delle sinapsi di rafforzarsi o indebolirsi in risposta all'attività neuronale. Questo fenomeno è fondamentale per l'adattamento e l'apprendimento del cervello. In pratica, la plasticità sinaptica permette al sistema nervoso di modificare la forza delle connessioni tra i neuroni in funzione delle esperienze, delle attività cognitive e degli stimoli esterni. Ogni nuova esperienza, dall'apprendimento di un concetto all'elaborazione di una strategia o risoluzione di un problema, stimola la formazione di nuove sinapsi o il potenziamento di quelle esistenti. Le spine dendritiche, strutture altamente dinamiche situate sui dendriti

neuronal, aumentano di dimensione, accogliendo un numero maggiore di recettori e migliorando così l'efficacia delle connessioni neurali. L'impatto dell'esperienza sull'architettura cerebrale è osservabile anche attraverso tecniche di neuroimaging. Un caso emblematico è quello dei tassisti londinesi, il cui ippocampo - una regione cerebrale coinvolta nella memoria spaziale e nell'orientamento - presenta dimensioni superiori alla media. Questa caratteristica è il risultato della loro costante necessità di elaborare percorsi complessi all'interno della città e dimostra la straordinaria plasticità del cervello umano.

Numerose evidenze scientifiche indicano che allenare costantemente il cervello, e iniziare a farlo precocemente, contribuisce a creare una solida barriera contro il declino cognitivo legato all'invecchiamento. Già a partire dai trent'anni, i neuroni iniziano a morire a un ritmo costante, un processo fisiologico inevitabile ma non necessariamente debilitante. Grazie alla straordinaria plasticità del cervello, possiamo creare nuove connessioni, contrastando l'atrofia neuronale che deriva dall'inattività cognitiva. Ogni nuova esperienza e acquisizione di conoscenza produce cambiamenti strutturali nel cervello, contribuendo ad arricchire la riserva cognitiva, un prezioso patrimonio di risorse neurali accumulato nel tempo. Studi scientifici dimostrano che un livello di istruzione elevato è correlato a una maggiore riserva cognitiva. Le persone mentalmente attive possiedono una maggiore riserva cognitiva e sono meno esposte al rischio di sviluppare demenze senili.

La chiave di un efficace training cognitivo risiede nella varietà delle attività svolte. Così come un programma di allenamento fisico bilanciato combina esercizi aerobici e di forza, un regime di stimolazione cerebrale ottimale dovrebbe coinvolgere diverse aree del cervello, attraverso attività quali la lettura, il gioco strategico, la partecipazione a eventi culturali e l'ascolto di musica. Mantenere attiva la mente non solo preserva le capacità cognitive, ma contribuisce anche a migliorare la qualità della vita a qualsiasi età. Sono molti gli esempi che possiamo fare. Studi che hanno coinvolto migliaia di anziani hanno rivelato che i soggetti impegnati in attività di enigmistica ottenevano punteggi significativamente migliori nei test di attenzione, ragionamento e memoria. Un'attività che, sebbene impegnativa, risulta particolarmente benefica, è lo studio di una lingua straniera. Secondo vari studi, l'apprendimento di una lingua richiede una vasta attivazione di entrambi gli emisferi cerebrali e ci sono dati a supporto del fatto che le persone bilingui tendono a possedere una maggiore flessibilità e agilità mentale rispetto a coloro che parlano una sola lingua. Inoltre, sembra che il bilinguismo offra una protezione aggiuntiva contro il rischio di sviluppare demenza, contribuendo a preservare la funzione cognitiva nel tempo. Un'attenzione particolare merita la musica, che ha un impatto diretto su specifici circuiti neurali. Osservando, tramite la risonanza magnetica funzionale (fMRI), l'attività cerebrale di soggetti mentre ascoltano una selezione di suoni è possibile analizzare le aree della corteccia uditiva, evidenziando il coinvolgimento di circuiti neurali specifici. Alcuni dati mostrano che l'ascolto della musica possa migliorare significativamente sia la funzione di memoria soggettiva che le prestazioni cognitive oggettive negli adulti con declino cognitivo lieve. Professioni che richiedono pianificazione, risoluzione di problemi e interazione sociale contribuiscono a mantenere attive le connessioni neurali.

In conclusione, stimoli cognitivi, esperienze e abitudini che favoriscono la plasticità sinaptica possono contribuire alla costruzione di una riserva cognitiva che potrebbe compensare danni legati all'invecchiamento o a patologie neurodegenerative. Sebbene siano necessari ulteriori studi per definire parametri oggettivi atti a misurare con precisione l'estensione della riserva cognitiva, è ormai ampiamente riconosciuto che investire in attività cognitive, sociali e fisiche lungo l'intero arco della vita rappresenta un elemento chiave per preservare la funzionalità cerebrale e promuovere una migliore qualità della vita nella terza età.

Bibliografia essenziale

1. Bubbico G, Chiacchiaretta P, Perrucci MG. Effects of Second Language Learning on the Plastic Aging Brain: Functional Connectivity, Cognitive Decline, and Reorganization Updated, *Front. Neurosci.* 2019; 13.
2. Devanand DP, Goldberg TE, Murali P. Computerized Games versus Crosswords Training in Mild Cognitive Impairment, *New England Journal of Medicine Evidence* 2022; 1 (12).
3. Faust Travis E, Gunner G, Dorothy P. Schafer. Mechanisms governing activity-dependent synaptic pruning in the developing mammalian CNS, *Nature Reviews Neuroscience.* 2021; 22: 657-673.
4. Innes Kim E, Terry Kit Selfe, Dharma Singh Khalsa, Sahiti Kandati, Meditation and Music Improve Memory and Cognitive Function in Adults with Subjective Cognitive Decline: A Pilot Randomized Controlled Trial, *Journal of Alzheimer's Disease.* 56: 3.
5. Izhak Shachar Ben, Diedrich L., Antal A., Lavidor M., Beyond social engagement: cognitive training leads to greater cognitive improvement in older adults, *Aging, Neuropsychology, and Cognition.* 2024; 31: 3.
6. Magee Jeffrey C, Grienberger C. Synaptic Plasticity Forms and Functions, *Annual Review of Neuroscience,* 2020; 43: 95-117,
7. Ryan TJ, Seth GN Grant. The origin and evolution of synapses, *Nature Reviews Neuroscience.* 2009; 10: 701712.
8. Song Suhang, Yaakov Stern, Yian Gu. Modifiable lifestyle factors and cognitive reserve: A systematic review of current evidence, *Ageing Research Reviews.* 2022; 74: 101551.

Testi divulgativi in Italiano

1. Matteoli M. *Il Talento del Cervello.* Sonzogno Editore. 2022.
2. Matteoli Michela. *La fioritura dei neuroni.* Sonzogno Editore. 2024.



Prevenzione e mercato della medicina

Silvio Garattini

Presidente, fondatore Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri – IRCCS

La durata di vita della popolazione italiana è fra le più alte del mondo con una media di 83,3 anni (81,3 per i maschi e 85,1 per le femmine). Tuttavia se analizziamo invece la durata di vita che dovrebbe essere di maggiore interesse e cioè la durata di vita sana scendiamo al quindicesimo posto nella graduatoria internazionale. Una perdita media di 15-20 anni che tende ad annullare anche la differenza fra maschi e femmine. È quindi importante chiederci come mai abbiamo questa differenza. La risposta può essere paradossale perché riguarda la constatazione che la medicina in questi ultimi 50 anni, si è occupata solo delle cure. Si sono ottenuti certamente dei risultati perché abbiamo più farmaci, migliori trattamenti medici chirurgici, possibilità di trapiantare organi e così via. Tuttavia questa attenzione alle cure ha creato un grande mercato della medicina che in Italia assomma fra spesa pubblica e privata a circa 200 miliardi. Il mercato della medicina come qualsiasi mercato per sua natura tende ad aumentare avendo a suo vantaggio il monopolio della informazione. Medici e pubblico ricevono informazioni solo da chi vende. La pubblicità invade tutte le fonti di informazione spesso in modo falso, mentre manca completamente ogni forma consistente di informazione indipendente. Il mercato aumenta i suoi volumi in varie direzioni. Per esempio attraverso la legislazione europea che per l'approvazione di un nuovo farmaco richiede tre caratteristiche: qualità, efficacia e sicurezza, ma non richiede confronti con i farmaci già esistenti con la stessa indicazione. Si ha così una pletora di farmaci per ogni indicazione senza la possibilità di sapere cosa è meglio o peggio. Diversa sarebbe la situazione se la legislazione dicesse: qualità, efficacia, sicurezza e valore terapeutico aggiunto. L'industria non vuole questo cambiamento perché bloccherebbe l'immissione in commercio della maggior parte dei farmaci. Il monopolio dell'informazione fa credere che i farmaci con il nome di fantasia siano meglio dei generici e così gli italiani spendono 1 miliardo di euro all'anno per pagare la differenza. L'informazione del mercato fa credere che i cosiddetti integratori alimentari siano utili, certamente ma a chi li vende. Ci fa credere che i livelli di normalità debbano essere più bassi di quelli considerati per molto tempo "normali". Se si diminuisce il livello di normalità per il colesterolo, per la pressione arteriosa e per la glicemia si prescrivono e si vendono molti più farmaci. Infine i farmaci vengono studiati in animali maschi e in maschi adulti ma poi vengono somministrati prevalentemente alle donne gli anziani e ai bambini senza adeguati protocolli per cogliere le differenze. Per diminuire il mercato della medicina è necessaria una grande rivoluzione culturale che ponga come fine

primario della medicina la “prevenzione”. Molte delle malattie non piovono dal cielo ma dipendono dai nostri comportamenti. Abbiamo per esempio 4 milioni di diabetici in Italia con una serie di complicazioni visive, cardiovascolari e renali, ma il diabete di tipo 2 è una malattia evitabile. Il 40 per cento dei tumori è evitabile, ma purtroppo ogni anno muoiono 180 mila persone di tumore. Una rivoluzione culturale richiede che siano propagandati a tutti i livelli quelle che vengono definite le buone abitudini di vita, non fumare, non bere alcol perché carcinogeno, non usare droghe, non divenire dipendente dal gioco d’azzardo, invece avere una buona attività motoria, mantenere un peso corporeo normale e intensificare i rapporti con l’ambiente avendo continue relazioni sociali e avere una durata di sonno di almeno 7 ore al giorno. Inoltre sono importanti come forma di prevenzione primaria le vaccinazioni e gli screening per malattie croniche o per tumori. Per realizzare tutto ciò è necessario che si realizzi in Italia una Scuola Superiore di Sanità per la formazione dei dirigenti e d’altro lato a livello delle scuole di tutti i livelli 1 ora di lezione sulla salute alla settimana per ogni classe realizzata da persone preparate per questo scopo. Poiché per avere buone abitudini di vita non è mai troppo tardi, è importante ogni forma di intervento che riguardi anche le persone adulte. Spostare la finalità della medicina dalle cure alla prevenzione significa diminuire in modo significativo le attività inutili o evitabili del Servizio Sanitario Nazionale. La prevenzione è quindi anche un atto di solidarietà nei confronti di chi ha malattie che non sono evitabili.

Bibliografia

1. Garattini S. Prevenzione è rivoluzione. Il Mulino Editore, Bologna 2023.
2. Garattini S. Vivere bene. San paolo Edizioni, Cinisello Balsamo (MI), 2024.
3. Garattini S. Farmaci. Luci e Ombre. Il Mulino Editore, 2025.
4. Garattini S, Banzi R. Una medicina che penalizza le donne. Le prove di una scomoda verità e alcune proposte di soluzione. San paolo Edizioni, Cinisello Balsamo (MI), 2022.
5. Garattini S. Staszewsky L. Il Diabete Di Tipo 2. Una Malattia Evitabile. LSWR ed, 2022
6. Aiom-Airtum. I numeri del cancro in Italia 2022. Intermedia Editore, Brescia, 2022.
7. Huang T, Yang B, Zheng J, et al. Cardiovascular disease mortality and cancer incidence in vegetarians: A meta-analysis and systematic review. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2012; 60: 233-240.
8. O’Hearn M, Lara-Castor L, Cudhea F, et al. Incident type 2 diabetes attributable to suboptimal diet in 184 countries. *Nature Medicine*. 2023; 29: 982-995.
9. OSMED. L’uso dei farmaci in Italia. Rapporto OsMed 2021. Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), Cava de’ Tirreni (SA), 2022.

Anemia of Older Persons

Luca Malcovati

Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Pavia; S.C. di Ematologia Molecolare e Medicina di Precisione, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Peripheral blood (PB) cytopenia is a highly prevalent condition in the general population, with a significant increase upon aging, consistent with the general decline in blood counts that occurs with advancing age. Overall, the prevalence of this condition increases sharply after the age of 50, although different dynamics have been reported for anemia, neutropenia, and thrombocytopenia. In fact, advancing age has been associated with higher prevalences of anemia and thrombocytopenia, while a slight increase in neutrophil counts has been reported, consistent with a myeloid bias associated with aging (1, 2). Anemia represents a significant clinical challenge, particularly in elderly individuals, as it has been associated with adverse outcomes, including increased hospitalization, higher incidence of hematological malignancies, and inferior overall survival (3, 4).

There is a wide range of potential etiologies in the differential diagnosis of anemias. The term “unexplained anemia” is used to describe a condition characterized by anemia that cannot be attributed to identifiable causes using conventional tests or to any concomitant diseases. Unexplained anemia warrants clinical attention and additional investigations, including bone marrow (BM) examination, to identify individuals with, or at high risk of developing, a hematologic neoplasm (5, 6).

In diagnosing anemia, it is first necessary to exclude more common types. Once common causes have been excluded and the provisional definition of unexplained anemia has been met, it is recommended that the patient be referred to a Hematology Department for further investigation in order to reach a definitive diagnosis. While a BM examination should be considered in all patients with unexplained anemia, the timing of this investigation is influenced by several factors, particularly in frail elderly individuals. BM aspiration to evaluate morphologic abnormalities of hematopoietic precursors, trephine biopsy to assess cellularity and fibrosis, flow cytometry immunophenotyping and genetic investigations to identify clonal genetic abnormalities are required to diagnose or rule out myelodysplastic syndromes/neoplasms (MDS) or other hematologic disorders (7). The term “idiopathic cytopenia of undetermined significance” (ICUS) has been introduced to describe a condition that does not meet the diagnostic criteria of MDS or other hematologic malignancy. Somatic mutation analysis is currently required for an appropriate diagnosis and classification of myeloid neoplasms (MN) (8). Mutation(s) in myeloid genes are found in a high proportion of ICUS patients, enabling the definition of clonal cyto-

penia of undetermined significance (CCUS), as well as the identification of other clonal cytopenias. Among patients with cytopenia of undetermined significance, those with evidence of clonal hematopoiesis (CH) are at a markedly higher risk of developing a MN compared with those without somatic mutations (9-12). These observations have led to the recognition of clonal precursor states in the context of recent classification frameworks (13, 14).

In patients with unexplained cytopenia, somatic mutation analysis of blood samples can be employed to identify those with CH who are eligible for further invasive BM investigation (15). Once validated and made widely available, the implementation of somatic mutation analysis of peripheral blood samples may have significant implications for medical practice. In fact, MNs, particularly MDS, are often underdiagnosed within the elderly population. Avoiding or minimizing invasive procedures is expected to enhance compliance with diagnostic tests, and, more broadly, to increase the diagnostic accuracy of MNs.

The coexistence of anemia and CH may encompass a broad spectrum of conditions with disparate clinical implications. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) may be an incidental finding in the diagnostic workup of an anemia, which may ultimately be attributed to a different underlying cause. Conditions can be faced in which the cytopenia and the clone are associated as a consequence of an underlying common cause, as exemplified by the anemia of inflammation (16).

Other conditions are grouped in the newly introduced category of clonal cytopenias, including CH in the context of aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), and the VEXAS syndrome.

Bibliografia

1. Guralnik JM, Eisenstaedt RS, Ferrucci L, et al. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood*. 2004; 104 (8): 2263-2268. 10.1182/blood-2004-05-1812.
2. van Zeventer IA, de Graaf AO, van der Klauw MM, et al. Peripheral blood cytopenias in the aging general population and risk of incident hematological disease and mortality. *Blood Adv*. 2021; 5 (17): 3266-3278. 10.1182/bloodadvances.2021004355.
3. Patel KV, Harris TB, Faulhaber M, et al. Racial variation in the relationship of anemia with mortality and mobility disability among older adults. *Blood*. 2007; 109 (11): 4663-4670.
4. Riva E, Tettamanti M, Mosconi P, et al. Association of mild anemia with hospitalization and mortality in the elderly: the Health and Anemia population-based study. *Haematologica*. 2009; 94 (1): 22-28. 10.3324/haematol.13449.
5. Hasserjian RP, Germing U, Malcovati L. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2023; 142 (26): 2247-2257. 10.1182/blood.2023020078.
6. Malcovati L, Cazzola M. How I Manage Patients with Unexplained Cytopenia. *Blood*. 2024. 10.1182/blood.2024025771.
7. Malcovati L, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, et al. Diagnosis and treatment of

- primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European Leukemia Net. *Blood*. 2013; 122 (17): 2943-2964.
8. Duncavage EJ, Bagg A, Hasserjian RP, et al. Genomic Profiling for Clinical Decision Making in Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia. *Blood*. 2022;140(21):2228-47. 10.1182/blood.2022015853.
 9. Galli A, Todisco G, Catamo E, et al. Relationship between clone metrics and clinical outcome in clonal cytopenia. *Blood*. 2021; 138 (11): 965-976. 10.1182/blood.2021011323.
 10. Gu M, Kovilakam SC, Dunn WG, et al. Multiparameter prediction of myeloid neoplasia risk. *Nat Genet*. 2023; 55 (9): 1523-1530. 10.1038/s41588-023-01472-1.
 11. Weeks LD, Niroula A, Neuberg D, et al. Prediction of risk for myeloid malignancy in clonal hematopoiesis. *NEJM Evid*. 2023; 2 (5). 10.1056/evidoa2200310.
 12. Xie Z, Komrokji RS, Al-Ali N, et al. Risk Prediction for Clonal Cytopenia: Multicenter Real-World Evidence. *Blood*. 2024. 10.1182/blood.2024024756.
 13. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022; 140 (11): 1200-1228. 10.1182/blood.2022015850.
 14. Khoury JD, Solary E, Abal O, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022; 36 (7): 1703-1719. 10.1038/s41375-022-01613-1.
 15. Malcovati L, Galli A, Travaglino E, et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. *Blood*. 2017; 129 (25): 3371-3378. 10.1182/blood-2017-01-763425.
 16. van Zeventer IA, de Graaf AO, Wouters H, et al. Mutational spectrum and dynamics of clonal hematopoiesis in anemia of older individuals. *Blood*. 2020; 135 (14): 1161-1170. 10.1182/blood.2019004362.

Human haematopoietic stem cell ageing at single cell resolution

Elisa Laurenti

Department of Haematology, Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge

Ageing is a complex biological phenomenon affecting all aspects of human physiology, and accompanied by a number of interconnected hallmarks including, among others, genomic instability, deregulated sensing of nutrients, chronic inflammation and stem cell decline (1). All our tissues are maintained by adult tissue-specific stem cells, the regenerative capacity of which becomes impaired with age. Haematopoietic stem cells (HSCs) produce all blood cell types (red blood cells, platelets and all immune cells) that collectively control oxygen transport, how we recover from infection and injury and the integrity of most other tissues. As we age, we all become less capable to fight infections and more susceptible to auto-immune diseases, anaemia and blood malignancies, all linked to a decline in blood and immune cell function. Understanding how blood and the immune system age is therefore of particular importance.

All haematopoietic cell types age and contribute to age-related disease risk. However, HSCs are the only haematopoietic cells with long-term regenerative capacity and they also constitute the cell of origin of most myeloid malignancies. Due to these unique abilities, the vast majority of studies have focused on understanding how the function of HSCs declines with age, using the mouse as an experimental model (2). In mice, HSC expand with age relatively to other progenitors, become more biased towards the production of platelets and myeloid cells, and lose regenerative capacity (as tested in transplantation assays) (3). It is also known that the bone marrow microenvironment in which HSC resides changes with age, shifting to a pro-inflammatory state, in line with the “inflammageing phenomenon” occurring across all tissues (4).

In humans, a lot less is known, largely due to the challenges of studying haematopoiesis during healthy ageing. Approximately 10 years ago, several independent groups discovered the phenomenon of clonal haematopoiesis (CH), identifying clonal expansions of HSCs carrying mutations in genes associated with leukaemia (5-8). When the variant allele frequency (VAF) for these mutations is higher than 2%, this is called Clonal Haematopoiesis of Indeterminate Potential (CHIP). CHIP prevalence is strongly associated with age (9). CHIP is associated with increased risk of haematological malignancies, but also of many non-haematological conditions, including, but not limited to, cardiovascular disease (10), acute kidney injury (11) and chronic liver disease (12).

This talk will discuss two main aspects of how the human haematopoietic system ages, based on the work from my team. First, I will discuss how the clonal diversity within the human haematopoietic stem cell pool changes over the human lifespan (13). In a study published two years ago, we performed whole genome sequencing of colonies derived from single HSCs isolated from 10 healthy individuals, aged 0 to 81. We found that HSCs accumulate mutations linearly over life (approximately 17 SNVs/HSC/year). With a phylogenetic approach, we demonstrated that there is an inevitable and drastic loss of diversity in humans past the age of 70 years old. In addition, we found that there are hundreds (and not dozens) of mutations, which alter HSC function and confer them a selective advantage (hereby defined driver mutations). Most of these mutations are not associated to cancer. We also showed that these driver mutations are usually acquired during childhood or early adulthood, and it takes decades for these clones to reach a detectable size. Since this study, these findings have been validated by others with alternative technologies (14-17). During the talk, I will also speculate about the physiological relevance of this drastic shift from polyclonality to oligoclonality with age in humans.

Second, many studies have helped understanding why the most recurrent mutations observed in CHIP (largely those in the genes DNMT3A, TET2 and ASXL1) confer a selective advantage to HSCs over the lifespan, and how they affect HSC self-renewal. Here I will discuss why it is also important to study their effects on HSC differentiation and whether the effector functions of the immune cells produced by HSCs carrying these mutations are altered. Here I will present unpublished work studying how *DNMT3A* R882 mutations impact myeloid differentiation of human HSCs. Mutations in the *DNMT3A* gene, encoding a DNA-methyltransferase responsible for *de novo* 5-methylation of cytosines at CpG sites, are the most common in CHIP. While many missense and truncating mutations have been detected, mutations at the R882 position are strongly associated with acute myeloid leukaemia (18). Here we combined single-cell HSC cultures and various single-cell -omic technologies to characterise the full trajectory of myeloid differentiation from HSCs to mature effector cells in individuals carrying *DNMT3A* R882 mutations (19). Our findings collectively identified an imbalanced myeloid differentiation process of *DNMT3A* R882 HSCs, quantitatively skewed towards increased neutrophil production, and with several features that may favour the development of myeloid malignancies.

Bibliografia

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023; 186: 243-278.
2. Fotopoulou F, Rodríguez-Correa E, Dussiau C, Milsom MD. Reconsidering the usual suspects in age-related hematologic disorders: is stem cell dysfunction a root cause of aging? *Exp. Hematol*. 2025; 143: 104698.
3. Colom Díaz PA, Mistry JJ, Trowbridge JJ. Hematopoietic stem cell aging and leukemia transformation. *Blood*. 2023; 142: 533-542.



4. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018; 14: 576-590.
5. Xie M, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat. Med.* 2014; 20: 1472-1478.
6. Jaiswal S, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371: 2488-2498.
7. Genovese G, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371: 2477-2487.
8. McKerrell T, et al. Leukemia-Associated Somatic Mutations Drive Distinct Patterns of Age-Related Clonal Hemopoiesis. *Cell Rep.* 2015; 10: 1239-1245.
9. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science.* 2019; 366. ean4673.
10. Tall AR, Fuster JJ. Clonal hematopoiesis in cardiovascular disease and therapeutic implications. *Nat. Cardiovasc. Res.* 2022; 1: 116-124.
11. Vlasschaert C, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential is associated with acute kidney injury. *Nat. Med.* 2024; 30: 810-817.
12. Wong WJ, et al. Clonal haematopoiesis and risk of chronic liver disease. *Nature.* 2023; 616: 747-754.
13. Mitchell E, et al. Clonal dynamics of haematopoiesis across the human lifespan. *Nature.* 2022; 606: 343-350.
14. Williams N, et al. Life histories of myeloproliferative neoplasms inferred from phylogenies. *Nature.* 2022; 602: 162-168.
15. Osorio G., et al. Somatic Mutations Reveal Lineage Relationships and Age-Related Mutagenesis in Human Hematopoiesis. *Cell Rep.* 2018; 25: 2308-2316. e4.
16. Fabre MA, et al. The longitudinal dynamics and natural history of clonal haematopoiesis. *Nature.* 2022; 606: 335-342.
17. Weng C, et al. Deciphering cell states and genealogies of human haematopoiesis. *Nature.* 2024; 627: 389-39.
18. Ley TJ, et al. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 2424-2433.
19. Vedi A, et al. DNMT3A R882 Mutation in Human Haematopoietic Stem Cells Alters Differentiation Towards Neutrophils and Monocytes. *Blood.* 2021; 138: 2162.

Oociti e invecchiamento: il ruolo dei fattori cellulari e ambientali e l'impatto sulla fertilità femminile

Manuela Monti

Istituto di Istologia e Embriologia, Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Sperimentale e Forense, Università degli Studi di Pavia

La maturazione degli oociti a partire dalle cellule germinali primordiali è un processo strettamente regolato. Già a 28 settimane di gestazione, l'ovaio fetale presenta segni di atresia follicolare, un fenomeno che, come ben noto, continua durante tutta la vita adulta. Dei circa uno-due milioni di oociti presenti nell'ovaio di un neonato, solo 300-400 possono andare incontro ad ovulazione (1) arrestandosi allo stadio di metafase II (MII). Con l'avanzare dell'età, non solo diminuisce il numero di oociti, ma anche la loro qualità, fattore che può compromettere la capacità di sviluppo dell'embrione e aumentare il rischio di aborto spontaneo o malformazioni genetiche. Sebbene i meccanismi alla base della maturazione e dell'invecchiamento degli oociti non siano ancora completamente compresi, è evidente che modificazioni del microambiente ovarico, lo stress causato da inquinanti ambientali e una dieta inadeguata giochino un ruolo cruciale in questo processo.

I principali fattori cellulari che influenzano l'invecchiamento degli oociti sono: **Stress ossidativo**: questo stress è causato dall'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che danneggiano lipidi, proteine e DNA all'interno delle cellule. Gli oociti sono particolarmente sensibili a questo tipo di danno, poiché la loro capacità di neutralizzare i ROS diminuisce con l'età. L'accumulo di danni ossidativi compromette varie funzioni cellulari, tra cui la divisione meiotica e l'interazione con le cellule circostanti, riducendo così la qualità degli oociti. In particolare, i mitocondri, responsabili della produzione di energia, sono sensibili allo stress ossidativo, con conseguente perdita di funzionalità (2).

Numerosi studi hanno evidenziato che i telomeri sono siti elettivi di attacco da parte dei ROS, che ne inducono il progressivo accorciamento e causano instabilità cromosomica (3). Uno studio del 2019 ha mostrato che elevati livelli di ROS negli oociti determinano un accorciamento dei telomeri e una ridotta competenza alla meiosi (4). In condizioni normali, i livelli di ROS sono più bassi e i telomeri risultano più lunghi negli oociti di femmine giovani (6-8 settimane di età) rispetto a quelli di femmine di topo in età riproduttiva (42-48 settimane di età; (5). Figura 1).

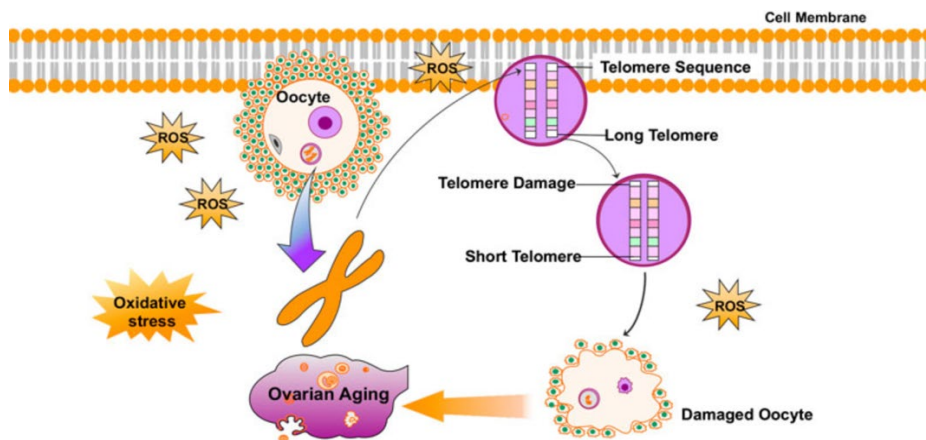


Figura 1 - invecchiamento ovarico indotto da stress ossidativo (6).

Una delle principali fonti di pro-ossidanti esogeni, associata a un aumento dello stress ossidativo negli ovai, è il fumo di sigaretta. Questo causa frammentazione citoplasmatica nelle cellule uovo, problemi durante il processo di fecondazione, elevati livelli di apoptosi nei blastomeri di morule e blastocisti e accorciamento dei telomeri negli embrioni (7, 8).

Danni al DNA e riparazione: gli oociti, come tutte le cellule, accumulano danni al DNA, ma la loro capacità di riparazione è limitata rispetto ad altri tipi di cellule. Con l'avanzare dell'età, i danni al DNA degli oociti aumentano, associandosi a un maggior numero di anomalie cromosomiche, come la trisomia 21 (sindrome di Down). La ridotta efficacia dei meccanismi di riparazione del DNA rappresenta quindi un fattore cruciale nel declino della qualità ovocitaria (9).

Disfunzione mitocondriale: i mitocondri, essenziali per la produzione di energia, svolgono un ruolo centrale per la funzionalità degli oociti e la loro integrità è fondamentale per sostenere una corretta maturazione e la eventuale successiva fecondazione. Con l'invecchiamento, la funzione mitocondriale negli oociti diminuisce, portando a una produzione insufficiente di energia, che compromette la capacità degli oociti di completare la meiosi e di sostenere il processo di fecondazione. L'effetto dello stress ossidativo sul danno indotto dai ROS prodotti dai mitocondri sul DNA mitocondriale può compromettere l'integrità della catena respiratoria e, di conseguenza, alimentare il processo di invecchiamento (10).

Autofagia: l'autofagia è un processo cellulare che permette la degradazione e il riciclo di componenti danneggiati o inutilizzati. Con l'invecchiamento, l'efficienza della autofagia diminuisce, provocando l'accumulo di materiali danneggiati negli oociti. L'autofagia alterata è stata associata all'aumento della mortalità cellulare e alla riduzione della capacità di mantenere l'integrità genomica (11).

Oltre ai fattori cellulari, l'ambiente esterno gioca un ruolo determinante nel processo di invecchiamento degli oociti (Figura 2). Questi fattori possono accelerare o rallentare la perdita di qualità e quantità degli oociti e includono:

Esposizione a sostanze tossiche e inquinanti atmosferici: l'esposizione a sostanze chimiche tossiche e a inquinanti atmosferici è uno dei principali fattori in grado di accelerare il processo di senescenza degli oociti. Composti come pesticidi, metalli pesanti (ad esempio, piombo e mercurio) e agenti industriali (come ftalati e i PoliCloroBifenili, PBC) sono stati associati a danni cellulari e alterazioni nei meccanismi di maturazione degli oociti (12). Questi agenti inquinanti possono alterare la funzione mitocondriale, incrementare lo stress ossidativo e i livelli di infiammazione, accelerando il declino della qualità degli oociti. I pesticidi, in particolar modo, interferiscono con l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio, un sistema ormonale cruciale per la regolazione della funzione ovarica. L'esposizione a queste sostanze può alterare la produzione di ormoni sessuali come estrogeni, progesterone e androgeni agendo, ad esempio, come disruptori endocrini (interferendo con la sintesi o la funzione degli estrogeni), ormoni fondamentali per la maturazione degli oociti e la regolazione del ciclo mestruale. Questa alterazione ormonale può influire sul processo di follicologenesi (lo sviluppo dei follicoli ovarici) e sulla maturazione degli oociti, riducendo la qualità degli stessi e aumentando il

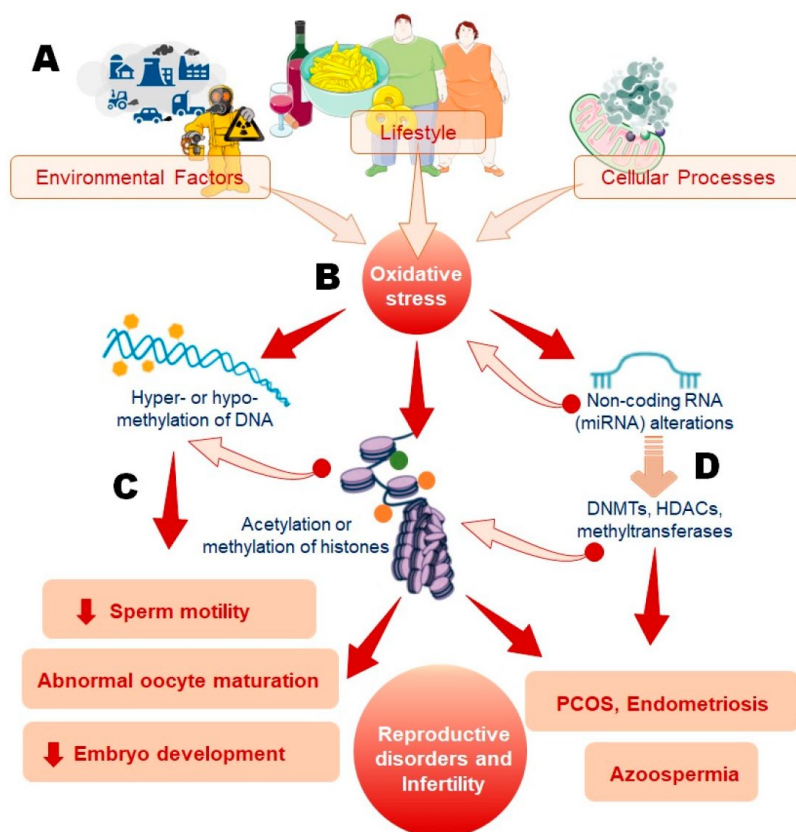


Figura 2 - Impatto dei fattori ambientali e stili di vita su gametogenesi maschile e femminile (15).

rischio di infertilità. Alcuni pesticidi possono anche influenzare la produzione di ormoni che regolano la liberazione dell'ovulo durante l'ovulazione, causando disfunzioni ovulatorie.

Alimentazione e stile di vita: una dieta ad alto contenuto di grassi saturi e zuccheri raffinati è stata associata a un incremento dello stress ossidativo e all'alterazione dei meccanismi metabolici, che contribuiscono all'invecchiamento precoce degli oociti. I radicali liberi, derivanti da un'alimentazione squilibrata, danneggiano il DNA, le membrane cellulari e altre strutture cellulari, accelerando il declino della loro qualità e funzionalità. Inoltre, l'eccesso di zuccheri provoca un'inflammatione cronica a basso grado, che interferisce con il microambiente ovarico (13).

Stress e fattori psicologici: Lo stress cronico e i fattori psicologici possono influire negativamente sulla fertilità, alterando l'equilibrio ormonale e contribuendo alla disfunzione ovarica. La gestione inadeguata dello stress può alterare il ciclo mestruale e ridurre la qualità dei gameti (14).

L'invecchiamento degli oociti è un processo complesso, influenzato da fattori cellulari e ambientali, che può compromettere la fertilità femminile con l'avanzare dell'età. Comprendere questi meccanismi è cruciale per sviluppare strategie preventive e terapeutiche volte a preservare la fertilità, offrendo alle donne più opportunità di diventare madri anche in età avanzata. A livello individuale, adottare uno stile di vita sano, seguire abitudini protettive contro lo stress ossidativo e ridurre l'esposizione a sostanze tossiche possono contribuire significativamente a mantenere la salute riproduttiva nel tempo.

Bibliografia

1. Oktem O, Oktay K. The Ovary. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1127: 1-9. <https://doi.org/10.1196/annals.1434.009>.
2. Wang L, Tang J., Wang L, Tan F, Song H, Zhou J, Li F. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *J Cell Physiol*. 2021; 236 (12): 7966-7983. doi: 10.1002/jcp.30468.
3. Erusalinsky JD. Oxidative stress, telomeres and cellular senescence: what non-drug interventions might break the link? *Free Radic Biol Med*. 2020; 150: 87-95. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.008.
4. Sasaki H, et al. Impact of oxidative stress on age-associated decline in oocyte developmental competence. *Front Endocrinol* 2019; 10: 811. doi: 10.3389/fendo.2019.00811.
5. Yamada-Fukunaga T, et al. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 2013; 11, 108. doi: 10.1186/1477-7827-11-108.
6. Yang L, et al. The Role of Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Ovarian Aging. *Front Pharmacol*. 2021; 11: 617843. doi: 10.3389/fphar.2020.617843.
7. Huang J, Okuka M, McLean M, Keefe DL, and Liu L. Effects of cigarette smoke on fertilization and embryo development *in vivo*. *Fertil Steril*. 2009; 92, (4): 1456-1465. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1781.
8. Dechanet C, et al. Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum Reprod Update*. 2011; 17 (1): 76-95. doi: 10.1093/humupd/dmq033.

9. Park SU, Walsh L, Berkowitz KM. Mechanisms of ovarian aging. *Reproduction*. 2021; 162 (2): R19-R33. doi: 10.1530/REP-21-0022.
10. Smits MAJ, et al. Human ovarian aging is characterized by oxidative damage and mitochondrial dysfunction. *Hum Reprod* 2023; 2, 38 (11): 2208-2220. doi: 10.1093/humrep/dead177.
11. Ahmed TA, et al. Oocyte Aging. The Role of Cellular and Environmental Factors and Impact on Female Fertility. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1247: 109-123. doi: 10.1007/5584_2019_456.
12. Jo Y-J, et al. Particulate Matter Exposure During Oocyte Maturation. Cell Cycle Arrest, ROS Generation, and Early Apoptosis in Mice. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 602097. doi: 10.3389/fcell.2020.602097.
13. Akgün N, Cimsit Kemahlı MN, Pradas JB. The effect of dietary habits on oocyte/sperm quality. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2023; 7, 24 (2): 125-137. doi: 10.4274/jtgga.galenos.2023.2022-7-15.
14. Wang L, Tang J, Wang L, Tan F, Song H, Zhou J, Li F. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *J Cell Physiol*. 2021; 236 (12): 7966-7983. doi: 10.1002/jcp.30468.
15. Dutta S, et al. Crosstalk Between Oxidative Stress and Epigenetics: Unveiling New Biomarkers in Human Infertility. *Cells*. 2024; 13: 1846. <https://doi.org/10.3390/cells13221846>.

Inflammaging tra eterogeneità e personalizzazione

Claudio Franceschi

Editor-in-Chief of Ageing Research Reviews, Università di Bologna

L'invecchiamento è un processo estremamente complesso, in particolare nel *H. sapiens*, correlato all'insorgenza di tutta una serie di patologie a livello dei vari organi ed apparati del corpo. Nel mio intervento illustrerò brevemente i seguenti punti:

- L'invecchiamento è un fenomeno storicamente e geograficamente determinato, nel senso che la fondamentale interazione tra genetica e ambiente sulla quale si basa è anch'essa altrettanto storicamente e geograficamente determinata.
- Come esempio citerò lo studio fatto in collaborazione con un demografo sardo, il prof. Salinari dell'università di Sassari, nel quale abbiamo dimostrato che in Sardegna in modo emblematico, ma anche nel resto dell'Italia, l'aspettativa di vita delle donne si è negli ultimi 150-200 anni progressivamente allungata, superando nettamente quella degli uomini (1).
- In effetti attualmente in Italia al 1° gennaio 2024 oltre l'80% dei 22.552 centenari (100+) residenti e quasi il 90% dei 677 semi-supercentenari (105+) è di genere femminile. I supercentenari (110+) ancora in vita al 1° gennaio 2024 sono 21, di cui soltanto uno di sesso maschile, e sono più che raddoppiati rispetto al 2009, quando se ne contavano 10. Nell'arco temporale 2009-2024, ben 8.521 individui hanno superato i 105 anni di età, di cui oltre 7.500 donne. In effetti i più recenti dati demografici dimostrano che in tutte le nazioni del pianeta, nessuna esclusa, l'aspettativa di vita delle donne è superiore a quella degli uomini.
- In uno studio pubblicato nel 2019 su *Nature Medicine* di cui sono co-autore abbiamo dimostrato che il proteoma plasmatico non solo cambia profondamente con l'età ma è anche largamente diverso tra maschi e femmine (2).
- L'invecchiamento si accompagna con un profondo rimodellamento di pressoché tutti gli organi e sistemi. Come immunologo ho dimostrato che l'invecchiamento del sistema immunitario è dicotomico, nel senso che quello più evolutivamente recente (clonotipico), che vede come cellule fondamentali i linfociti, si deteriora di più e più precocemente, mentre quello evolutivamente più ancestrale, basato su cellule quali i macrofagi, si deteriora di meno e va addirittura incontro ad un fenomeno di attivazione che in un lavoro del 2000 ho chiamato INFLAMMAGING. In questo lavoro ho suggerito/ipotizzato che una infiammazione CRONICA, STERILE, DI BASSO GRADO, rappresenti un momento fonda-

mentale del processo di invecchiamento correlato all'insorgenza delle patologie tipiche età correlate (3).

- La teoria generale dell'inflammaging si basa su due pilastri concettuali fondamentali:
 - a) con l'avanzare dell'età, e forse iniziando fin dal periodo di vita intrauterino, per continuare in età pediatrica e adulta, si ha una progressiva accelerazione dell'inflammaging, dimostrato dall'aumento di molecole infiammatorie nel sangue ed in altri organi e tessuti del corpo.
 - b) tutte le malattie età associate hanno una componente patogenetica infiammatoria (4-8).
- Dall'anno 2000 ad oggi sono stati pubblicati circa 1800 lavori scientifici che hanno studiato inflammaging (9). Conseguentemente il numero di molecole e fattori infiammatori descritti, così come il numero di meccanismi coinvolti, sono aumentati suggerendo il concetto fondamentale che inflammaging è molto più complesso di quello che avevamo pensato inizialmente e che il numero di fattori e meccanismi interessati sia ancora largamente sconosciuto e da scoprire.
- Questa straordinaria complessità ci ha comunque spinto a cercare di quantificare inflammaging quanto più possibile. A questo proposito abbiamo messo a punto due OROLOGI INFIAMMATORI per descrivere inflammaging quanto più accuratamente possibile. Il primo, pubblicato nel 2021 (10) in *Nature Aging*, partendo da una cinquantina di molecole infiammatorie ne ha individuate le 15 più informative che hanno costituito un orologio infiammatorio dell'invecchiamento (iAge) che correlava significativamente con la multimorbilità, l'immunosenescenza, la fragilità e l'invecchiamento cardiovascolare, e che si dimostrava essere straordinariamente meno elevato nei centenari. Il secondo, pubblicato nel 2023 in *Frontiers in Immunology* (11), partendo da una cinquantina di molecole infiammatorie ha individuato un orologio infiammatorio costituito dalle 10 molecole più informative ed ha permesso:
 - a) di stabilire in ciascun soggetto la sua età infiammatoria rispetto alla sua età cronologica;
 - b) di evidenziare la peculiare/personale combinazione di molecole infiammatorie di ciascuna persona stratificandole per importanza, utilizzando tecniche avanzate di intelligenza artificiale "explainable".
- Presenterò infine i dati di un lavoro pubblicato su *Current Biology* nel 2022 (12) nel quale abbiamo misurato un totale di più di 400 marcatori (parametri multiomici di biochimica clinica e metabolomica, immunologici, del microbiota intestinale, immagini facciali, e fitness fisica) in ciascuno dei 4066 soggetti giovani adulti (20-45 anni di età) arruolati. Lo studio ha dimostrato per la prima volta che nel sistema-corpo di ciascuna persona ci sono "orologi multipli" specifici nei diversi organi ed apparati. Quindi abbiamo dimostrato che gli organi ed i sistemi invecchiano con velocità diverse nella stessa persona e che ogni organo e sistema ha una propria età biologica ed una peculiare velocità di invecchiamento. Inoltre, abbiamo dimostrato che in ogni persona giovane-adulta c'è sempre un organo/apparato più vecchio degli altri che, 10-20 anni più tardi, ha un'alta probabilità di andare incontro ad una patologia. Questi dati sono stati recentemente confer-

mati da altri studi di grandi dimensioni e aprono straordinari orizzonti di medicina preventiva per le malattie dell'invecchiamento. Sulla base di questi risultati, calcolando il rischio poligenico utilizzando dati della Chinese Longitudinal Healthy Longevity Survey abbiamo dimostrato che questo approccio può prevedere la possibilità di diventare centenari. Nel 2024 abbiamo riassunto questi concetti e considerazioni in una review pubblicata in *Aging Research Reviews* (13).

Bibliografia

1. Salinari et al., fertility decline and the emergence of excess female survival in post-reproductive ages in Italy. *GENUS*. 2022; 78, 19.
2. Lehallier, B. et al. Undulating changes in human plasma proteome profiles across the lifespan. *Nat Med*. 2019; 25, 1843-1850.
3. Franceschi, C. et al. Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 908, 244-254.
4. Franceschi c and Campisi J. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-related diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med*. 2000; 69 (S1): S4-S9.
5. Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C. & Santoro, A. Inflammaging: a new immune– metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2018; 14, 576-590.
6. Fulop, T. et al. Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Front Immunol*. 2018; 8.
7. Furman, D. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med*. 2019; 25, 1822-1832.
8. Fulop, T. et al. Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021; 64, 109-122.
9. Jiang, B. Global research trends in inflammaging from 2005 to 2024: a bibliometric analysis. *Front. Aging*. 2025; 6:1554186.
10. Sayed, N. et al. An inflammatory aging clock (iAge) based on deep learning tracks multimorbidity, immunosenescence, frailty and cardiovascular aging. *Nat Aging*. 2021; 1, 598-615.
11. Kalyakulina, A. et al. Small immunological clocks identified by deep learning and gradient boosting. *Front Immunol*. 2023; 14.
12. Nie, C. et al. Distinct biological ages of organs and systems identified from a multi-omics study. *Cell Rep*. 2022; 38, 110459.
13. Prattichizzo, F. Organ-specific biological clocks: Ageotyping for personalized anti-aging medicine. *Ageing Res Rev*. 2024; Mar 4; 96: 102253.

Dinamiche Ambientali e Epigenetica nell'Inflammaging: verso una Nuova Comprensione del Benessere e della Salute

Valentina Bollati

Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, INES (INstitute of Epigenetics for Smiles),
Università degli Studi di Milano

L'invecchiamento è un processo complesso, multifattoriale e dinamico, associato a profonde modificazioni a livello cellulare, molecolare e sistemico. Si tratta di un processo fisiologico e naturale, inscritto nella biologia dell'essere umano, ma non uniformemente determinato: il modo in cui invecchiamo e la velocità con cui ciò avviene sono fortemente influenzati da fattori ambientali e comportamentali. L'esposizione a inquinanti, lo stile di vita, la nutrizione, il livello di attività fisica e le dinamiche psicosociali possono modulare profondamente le traiettorie dell'invecchiamento, determinando una maggiore vulnerabilità o, al contrario, promuovendo un invecchiamento sano e funzionale.

Una delle caratteristiche emergenti dell'invecchiamento è lo stato infiammatorio cronico di basso grado, definito con il termine *inflammaging*, che rappresenta un elemento chiave nella patogenesi di numerose malattie croniche legate all'età, tra cui patologie cardiovascolari, neurodegenerative e metaboliche.

Negli ultimi decenni, la biologia dell'invecchiamento ha riconosciuto l'importanza dei meccanismi epigenetici come mediatori dell'interazione tra geni e ambiente. L'epigenetica, definita come l'insieme delle modificazioni ereditabili dell'espressione genica che non alterano la sequenza del DNA, rappresenta oggi uno dei principali paradigmi interpretativi nella comprensione dell'adattamento biologico all'ambiente, sia in termini di danno che di resilienza. In questo contesto, l'esposoma – inteso come l'insieme cumulativo delle esposizioni ambientali e comportamentali che un individuo sperimenta nel corso della vita – gioca un ruolo cruciale nel modellare il profilo epigenetico individuale, influenzando i processi infiammatori, immunitari e metabolici alla base dell'*inflammaging*. In particolare, fattori ambientali e di esposizione, ma anche esperienze estetiche e relazionali positive, possono lasciare un'impronta epigenetica significativa, modificando l'adattamento fisiologico.

Le principali modificazioni epigenetiche coinvolte nella regolazione dell'infiammazione comprendono la metilazione del DNA, le modificazioni post-traduzionali degli istoni e l'azione dei microRNA (miRNA). Tra questi, la metilazione del DNA

– in particolare nei promotori genici e nelle isole CpG – rappresenta uno dei meccanismi meglio caratterizzati. Studi sperimentali e osservazionali hanno mostrato che l'esposizione a stress ossidativo, agenti infiammatori o inquinanti ambientali può indurre ipermetilazione di geni anti-infiammatori e ipometilazione di geni pro-infiammatori, contribuendo alla deregolazione dell'omeostasi immunitaria.

L'epigenoma, soggetto a modificazioni con l'età, riflette l'esposizione cumulativa dell'individuo a fattori ambientali, comportamentali e relazionali. Di conseguenza, l'infiammaging può essere considerato anche come espressione epigenetica dell'interazione tra il patrimonio genetico e l'ambiente vissuto.

Numerose evidenze indicano che inquinanti ambientali (e.g. particolato atmosferico, metalli pesanti, interferenti endocrini, ecc.) inducono modificazioni epigenetiche, in particolare nella metilazione del DNA, influenzando l'espressione genica di pathway infiammatori e di stress ossidativo.

Parallelamente, le abitudini quotidiane – tra cui alimentazione, attività fisica, qualità del sonno e gestione dello stress – rappresentano strumenti efficaci per modulare in senso favorevole l'epigenoma. L'attività fisica regolare, anche di moderata intensità, è un noto modulatore epigenetico: essa regola la metilazione di geni coinvolti nel metabolismo, nella plasticità neuronale e nella risposta infiammatoria. Analogamente, strategie di riduzione dello stress – come tecniche di mindfulness, contatto con la natura e pratiche relazionali positive – sono state associate a una diminuzione dell'attivazione del sistema HPA (asse ipotalamo-ipofisi-surrene) e a modificazioni favorevoli della metilazione genica.

Negli ultimi anni, un filone emergente di ricerca ha iniziato a esplorare il potenziale ruolo epigenetico delle esperienze positive, in particolare quelle legate alla bellezza, all'arte e alla risonanza emotiva. Queste esperienze, pur non modificando direttamente il genoma, possono influenzare il sistema neuroendocrino, l'assetto infiammatorio e, di conseguenza, la regolazione epigenetica. L'interazione tra emozioni positive e biologia si fonda sull'attivazione del sistema limbico, la regolazione del tono vagale e il rilascio di neuromodulatori quali dopamina, ossitocina e serotonina, molecole capaci di influenzare la metilazione del DNA e l'acetilazione degli istoni. Esperienze estetiche – come la fruizione di musica, arte visiva o contatto con la natura – sono in grado di attivare percorsi neurali legati alla ricompensa, alla regolazione affettiva e all'empatia, con effetti benefici documentati su parametri fisiologici quali la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca e i livelli di cortisolo. Questi risultati aprono a una nuova prospettiva: l'estetica come stimolo biologicamente attivo, capace di esercitare un'influenza benefica e misurabile sull'epigenoma, e dunque potenzialmente in grado di contrastare gli effetti negativi dell'infiammaging.

Il riconoscimento dell'infiammaging come processo biologico modulabile attraverso l'ambiente e i comportamenti individuali ha profonde implicazioni per la salute pubblica. In particolare, l'epigenetica ambientale fornisce una cornice teorica e sperimentale che permette di superare l'approccio riduzionista e determinista, valorizzando invece il concetto di salute come esito dinamico di relazioni tra esposizioni, contesto e scelte di vita. Intervenire sui determinanti ambientali modificabili – come l'inquinamento atmosferico, la qualità dell'ambiente abitativo, l'accesso a spazi verdi, la nutrizione e le disuguaglianze socioeconomiche – diventa una strate-

gia prioritaria non solo per ridurre il carico di malattia, ma anche per rallentare l'accelerazione epigenetica dell'invecchiamento. Allo stesso tempo, promuovere esperienze positive e significative – tramite arte, cultura, relazioni sociali e benessere emotivo – può rappresentare un investimento preventivo sulla resilienza biologica e psicosociale.

Bibliografia

1. Alegría-Torres, Alejandro J, Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and Lifestyle. *Epigenomics* 3, 2011; 3: 267-277. <https://doi.org/10.2217/epi.11.22>.
2. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and Environmental Chemicals. *Current Opinion in Pediatrics*. 2009; 21, 2: 243-2451. <https://doi.org/10.1097/mop.0b013e32832925cc>.
3. Bell CG, Lowe R, Adams PD, Baccarelli A, Beck S, Bell JT, Christensen BC, et al. DNA Methylation Aging Clocks: Challenges and Recommendations. *Genome Biology*. 2019; 20: 249. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1824-y>.
4. Bollati V, Baccarelli A. Environmental Epigenetics. *Heredity*. 2010; 105, 1: 105-112. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.2>.
5. Burris Heather H, Baccarelli A, Wright RO, Wright RJ. Epigenetics: Linking Social and Environmental Exposures to Preterm Birth. *Pediatric Research*. 2016; 79, 1-2: 136-40. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.191>.
6. Fadadu Raj P, Bozack AK, Cardenas A. Chemical and Climatic Environmental Exposures and Epigenetic Aging: A Systematic Review. *Environmental Research*. 2025; 274: 121347. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121347>.
7. Ferrari L, Carugno M, Bollati V. Particulate Matter Exposure Shapes DNA Methylation through the Lifespan. *Clinical Epigenetics*. 2019; 11, 1: 129. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0726-x>.
8. Gallazzi M, Pizzolante M, Biganzoli EM, Bollati V. Wonder Symphony: Epigenetics and the Enchantment of the Arts. *Environmental Epigenetics*. 2024; 10, 1: dvae001. <https://doi.org/10.1093/eep/dvae001>.
9. Kalia Vrinda, Belsky D.W., Baccarelli A., Miller G.W. An Exposomic Framework to Uncover Environmental Drivers of Aging. *Exposome*. 2022; 2, 1: osac002. <https://doi.org/10.1093/exposome/osac002>.
10. Peters A, Nawrot TS, Baccarelli A. Hallmarks of Environmental Insults. *Cell*, 2021; 184, 6: 1455-1468. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.043>.
11. Sae-Lee Chanachai, Corsi S, Barrow TM, Kuhnle GC., Bollati V, Mathers JC, Hyang-Min Byun. Dietary Intervention Modifies DNA Methylation Age Assessed by the Epigenetic Clock. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2018; 62, 23: e1800092. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800092>.
12. Vrijens K, Bollati V, Nawrot T.S. MicroRNAs as Potential Signatures of Environmental Exposure or Effect: A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives*. 2015; 123, 5: 399-411. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408459>.
13. Zheng Xi, Xueli Liu, Yuqian Guo, Yi Lv, Chensheng Lin, Dan Wang, Shaobing Wang, Yiping Liu, Xuefeng Hu. Physical Exercise and Epigenetic Modifications in Skeletal Muscle, Brain, and Heart». *Epigenetics & Chromatin*. 2025; 18, 1:

12. <https://doi.org/10.1186/s13072-025-00576-8>.
14. Zhu Zhong-Zheng, Hou L, Bollati V, Tarantini L, Marinelli B, Cantone L, Yang AS, et al. Predictors of Global Methylation Levels in Blood DNA of Healthy Subjects: A Combined Analysis. *International Journal of Epidemiology*. 2012; 41, 1: 126-139. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq154>.
15. Zhu, Zhong-Zheng, Sparrow D, Hou L, Tarantini L, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, et al. Repetitive Element Hypomethylation in Blood Leukocyte DNA and Cancer Incidence, Prevalence, and Mortality in Elderly Individuals: The Normative Aging Study. *Cancer Causes & Control: CCC*. 2011; 22, fasc. 3: 437-447. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9715-2>.

L'approccio nutrizionale alla longevità: evidenze e miti

Riccardo Caccialanza

Direttore S.C. Dietetica e Nutrizione Clinica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Negli ultimi anni sta emergendo il ruolo fondamentale della nutrizione come fattore chiave non solo per la prevenzione primaria delle principali patologie, dalle cardiovascolari a quelle oncologiche, ma anche per ottimizzare i processi di invecchiamento.

Numerosi studi confermano infatti che dal “come si mangia” dipende il “come si invecchia”.

In particolare, la restrizione calorica ha dimostrato effetti benefici sulla longevità, ma sono molteplici i potenziali effetti collaterali, quali ad esempio la perdita di funzionalità muscolare, per cui non può essere proposta come una soluzione semplicistica valida per tutti in assenza di supervisione clinica. L'alimentazione cosiddetta “sana” può allungare la vita di chi è già di peso normale, ma ancora di più delle persone sovrappeso o obese. E se si vuole affrontare seriamente e a livello di sistema l'ottimizzazione dell'invecchiamento della popolazione, non si può non partire proprio dal problema diffusissimo dell'obesità infantile, che in questi ultimi anni sta raggiungendo picchi di prevalenza mai registrati.

Il tema della nutrizione e longevità è poi molto complesso ed abbraccia la genetica come la condotta dell'industria alimentare e del mondo degli integratori, la sfera psicologica individuale come le politiche educazionali e preventive.

Sono ancora molteplici i limiti pratici che non consentono l'applicazione delle evidenze scientifiche ormai note e le stesse, se interpretate e sfruttate a scopi commerciali, possono promuovere messaggi fuorvianti e pericolosi per la salute degli individui.

Unraveling the aging process. L'Influenza della nutrizione e dello stile di vita sulla longevità e salute degli anziani

Hellas Cena^{1,2}, Sara Santero¹

¹Laboratorio di Dietetica e Nutrizione Clinica, Dipartimento di Sanità Pubblica,
Medicina Sperimentale e Forense, Università degli Studi di Pavia;

²Unità di Nutrizione Clinica, ICS Maugeri IRCCS Pavia

Obiettivi dell'intervento

In un contesto in cui l'Italia si avvicina a una popolazione composta per il 35% da anziani entro il 2050, l'intervento intende esplorare le sfide e le opportunità legate all'invecchiamento della popolazione.

Nel dettaglio, l'intervento mira a chiarire quali sono le modifiche fisiologiche che caratterizzano il processo di invecchiamento, evidenziando i markers di invecchiamento e longevità attualmente riconosciuti dalla letteratura scientifica. Verrà definito il concetto di *healthy aging* e verranno approfonditi i concetti di capacità funzionale e capacità intrinseca, promossi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) come strumenti per valutare l'invecchiamento in salute della popolazione globale. In ottica di promozione dell'*healthy longevity*, verrà esplorato il concetto delle *Blue zones*, aree del pianeta in cui la concentrazione di centenari risulta essere più elevata, presentando il caso studio della Costa Rica. Data l'importanza di seguire uno stile di vita salutare per invecchiare in buona salute, saranno mostrate le raccomandazioni per una corretta alimentazione e per il mantenimento di uno stile di vita attivo, nell'ottica anche di contrastare lo stato di infiammazione di basso grado che caratterizza il processo di invecchiamento (*inflammaging*). A seguire, saranno presentati i fabbisogni nutrizionali di adulti e anziani in buona salute secondo le raccomandazioni mondiali, europee e italiane, sottolineando l'importanza di valutare lo stato nutrizionale come indicatore di salute. Infine, verranno indagate le sfide future legate all'invecchiamento e alla promozione dell'*healthy longevity* a livello globale.

Bibliografia

1. United Nations; New Measures of Population Aging. Available online at: https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/unpd_egm_201902_s1_sergeischerbov.pdf
2. WHO. Regional Office for Europe. (2023). Promoting physical activity and

- healthy diets for healthy ageing in the WHO European Region. Available online at: <https://iris.who.int/handle/10665/373061>
3. United Nations. World population aging prospect 2024. Available online at: <https://population.un.org/wpp/>
 4. WHO. Indicator Metadata Registry List. Available online at: <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry>
 5. Mayo Clinic. Aging: What to expect. Available online at: <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/healthy-aging/in-depth/aging/art-20046070>
 6. Cruz-Jentoft AJ, Sayer AA. Sarcopenia [published correction appears in *Lancet*. 2019 Jun 29; 393 (10191): 2590]. *Lancet*. 2019; 393(10191): 2636-2646.
 7. Dent E, Wright ORL, Woo J, Hoogendijk EO. Malnutrition in older adults. *Lancet*. 2023; 401 (10380): 951-966.
 8. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023; 186 (2): 243-278. doi: 10.1016/j.cell.2022.11.001. Epub 2023 Jan 3. PMID: 36599349.
 9. WHO (2015). World report on ageing and health. Available online at: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/186463/9789240694811_eng.pdf?sequence=1
 10. WHO. Regional Office for Europe. (2023). Promoting physical activity and healthy diets for healthy ageing in the WHO European Region. Available online at: <https://iris.who.int/handle/10665/373061>
 11. WHO (2017). Integrated care for older people: guidelines on community-level interventions to manage declines in intrinsic capacity. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 12. WHO (2024). Integrated care for older people (ICOPE): guidance for person-centred assessment and pathways in primary care, second edition. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
 13. Bautmans I, Knoop V, Amuthavalli Thiyagarajan J, et al. WHO working definition of vitality capacity for healthy longevity monitoring. *Lancet Healthy Longev*. 2022; 3 (11): e789-e796. doi: 10.1016/S2666-7568(22)00200-8.
 14. López-Ortiz S, Lista S, Peñín-Grandes S, Pinto-Fraga J, Valenzuela PL, Nisticò R, Emanuele, E, Lucia A, Santos-Lozano A. Defining and assessing intrinsic capacity in older people: A systematic review and a proposed scoring system. *Ageing research reviews*. 2022; 79: 101640. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101640>.
 15. Gonzalez-Bautista E, de Souto Barreto P, Tavassoli N, Ranarijhon C, Pons JS, Rolland Y, Andrieu S, Delrieu J. Reliability of Self-Screening for Intrinsic Capacity Impairments Using the ICOPE Monitor App. *The Journal of frailty & aging*. 2023; 12 (4): 291-297. <https://doi.org/10.14283/jfa.2023.34>
 16. WHO. Integrated Care for Older People Approach (ICOPE). Available online at: <https://www.who.int/teams/maternal-newborn-child-adolescent-health-and-ageing/ageing-and-health/integrated-care-for-older-people-icope>
 17. Sánchez-Sánchez JL, Lu WH, Gallardo-Gómez D, et al. Association of intrinsic capacity with functional decline and mortality in older adults: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Lancet Healthy Longev*. 2024; 5 (7): e480-e492. doi: 10.1016/S2666-7568(24)00092-8.
 18. Tan F, Wei X, Zhang J, et al. The assessment and detection rate of intrinsic capac-

- ity deficits among older adults: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr.* 2024; 24 (1): 485. Published 2024 Jun 3. doi: 10.1186/s12877-024-05088-w.
19. Liao X, Shen J, Li M. Effects of multi-domain intervention on intrinsic capacity in older adults: A systematic review of randomized controlled trials (RCTs). *Exp Gerontol.* 2023; 174: 112112. doi: 10.1016/j.exger.2023.112112.
 20. Gómez Salas G, Arriola Aguirre R, Vindas Meza L, et al. Diversidad dietética, estado antropométrico y perfil bioquímico de centenarios de la Península de Nicoya, Costa Rica, y su descendencia [Dietary diversity, anthropometric status and biochemical profile of centenarians of the Nicoya Peninsula, Costa Rica, and their offspring]. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2024; 59 (6): 101513. doi: 10.1016/j.regg.2024.101513.
 21. Fondazione della Dieta Mediterranea. Piramide della Dieta Mediterranea. Available online at: <https://www.fondazione dietamediterranea.it/dieta/la-piramide-alimentare/>
 22. Harvard healthy plate. Available online at: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/wp-content/uploads/sites/30/2012/09/HEPJan2015.jpg>
 23. Bull FC, et al. *Br J Sports Med.* 2020; 54: 1451-1462.
 24. Izquierdo M, et al. *J Nutr Health Aging.* 2021; 25: 824-853.
 25. Cruz-Jentoft AJ, et al. *Age Ageing.* 2019; 48: 16-31.
 26. WHO. Regional Office for Europe. (2023). Promoting physical activity and healthy diets for healthy ageing in the WHO European Region. Available online at: <https://iris.who.int/handle/10665/373061>
 27. Bull FC, Al-Ansari SS, Biddle S, et al. World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Br J Sports Med.* 2020; 54 (24): 1451-1462.
 28. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis [published correction appears in *Age Ageing.* 2019 Jul 1; 48 (4): 601]. *Age Ageing.* 2019; 48 (1): 16-31.
 29. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 908: 244-254.
 30. Calder PC, Bosco N, Bourdet-Sicard R, et al. Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Res Rev.* 2017; 40: 95-119.
 31. Martucci M, Ostan R, Biondi F, et al. Mediterranean diet and inflammaging within the hormesis paradigm. *Nutr Rev.* 2017; 75 (6): 442-455.
 32. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 14 (10): 576-590. doi: 10.1038/s41574-018-0059-4.
 33. Dent E, Morley JE, Cruz-Jentoft AJ, et al. Physical Frailty: ICFSR International Clinical Practice Guidelines for Identification and Management. *J Nutr Health Aging.* 2019; 23 (9): 771-787. doi: 10.1007/s12603-019-1273-z.
 34. Di Giosia P, Stamerra CA, Giorgini P, Jamialahamdi T, Butler AE, Sahebkar A. The role of nutrition in inflammaging. *Ageing Res Rev.* 2022; 77: 101596.
 35. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014; 69 (Suppl. 1): S4-S9.

36. Dugan B, Conway J, Duggal NA. Inflammaging as a target for healthy ageing. *Age Ageing*. 2023; 52 (2): afac328.
37. Zheng G, Qiu P, Xia R, et al. Effect of Aerobic Exercise on Inflammatory Markers in Healthy Middle-Aged and Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Aging Neurosci*. 2019; 11: 98.
38. Khalafi M, Akbari A, Symonds ME, Pourvaghar MJ, Rosenkranz SK, Tabari E. Influence of different modes of exercise training on inflammatory markers in older adults with and without chronic diseases: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2023; 169: 156303.
39. Kim SD, Yeun YR. Effects of Resistance Training on C-Reactive Protein and Inflammatory Cytokines in Elderly Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19 (6): 3434.
40. EFSA. Dietary Reference Values for nutrients. Summary Report (2017; amended in 2019). doi: 10.2903/sp.efsa.2017.e15121
41. WHO. Fact sheet healthy diets. Available online at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
42. CREA. Linee guida per una sana alimentazione (2018). Available online at: <https://www.crea.gov.it/web/alimenti-e-nutrizione/-/linee-guida-per-una-sana-alimentazione-2018>
43. LARN. Livelli di assunzione di riferimento di nutrient ed energia per la popolazione italiana (IV revisione, 2024).
44. Volkert D, Beck AM, Cederholm T, et al. ESPEN practical guideline: Clinical nutrition and hydration in geriatrics. *Clin Nutr*. 2022; 41 (4): 958-989.
45. EFSA. DRV finder online tool. Available at: <https://multimedia.efsa.europa.eu/drvs/index.htm>
46. Fernández-Lázaro D, Seco-Calvo J. Nutrition, Nutritional Status and Functionality. *Nutrients*. 2023;15(8):1944.
47. Swan WI, Vivanti A, Hakel-Smith NA, et al. Nutrition Care Process and Model Update: Toward Realizing People-Centered Care and Outcomes Management. *J Acad Nutr Diet*. 2017; 117 (12): 2003-2014.
48. Raymond JL, Morrow K. Krause and Mahan's Food and the Nutrition Care Process, 16th Edition. Elsevier Health Sciences. 2022. ISBN: 0323811965, 9780323811965
49. Woods T, Palmarini N, Corner L, et al. Quantum Healthy Longevity for healthy people, planet, and growth. *Lancet Healthy Longev*. 2022; 3 (12): e811-e813. doi: 10.1016/S2666-7568(22)00267-7.
50. Beard JR, Bloom DE. Towards a comprehensive public health response to population ageing. *Lancet*. 2015;385(9968):658-661. doi:10.1016/S0140-6736(14)61461-6
51. Scott AJ. The longevity society. *Lancet Healthy Longev*. 2021; 2 (12): e820-e827. doi: 10.1016/S2666-7568(21)00247-6.
52. The Lancet Healthy Longevity. No healthy longevity without a healthy planet. *Lancet Healthy Longev*. 2021; 2 (1): e1. doi: 10.1016/S2666-7568(20)30072-6.
53. Watts N, Amann M, Arnell N, et al. The 2020 report of The Lancet Countdown on health and climate change: responding to converging crises [published correction appears in *Lancet*. 2021; 397 (10269): 98. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32681-7]. *Lancet*. 2021; 397 (10269): 129-170. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32290-X.

Prevention of dementia: modifiable and non modifiable risk factors

Alfredo Costa

Dipartimento di Scienze del Sistema Nervoso e del Comportamento, Università degli Studi di Pavia;
Direttore U.O.C. Neurologia del Comportamento, Istituto Neurologico Nazionale IRCCS Mondino, Pavia

Although the age-specific incidence of dementia is decreasing in high-income countries, the number of affected people in the world continues to rise, as people live longer. The advent of disease-modifying drugs for dementia (i.e. monoclonal antibodies) is a long-awaited breakthrough, but so far clinical results appear to be modest. There is a significant progress in the field of biomarkers, but these are sometimes insufficient to justify diagnosis, being rather useful to classify the neuropathology in people with dementia (i.e. Alzheimer's disease). Likewise, drug and psychosocial treatments are progressing, and there are more people living with dementia than ever before, but they are presently limited in effectiveness.

This is why prevention is still the best way to go, and we still feel the need to identify and implement prevention approaches. Robust evidence shows how cognitive and physical reserve develop across the life course, and it is accepted that tackling the 14 modifiable risk factors for dementia defined by the *Lancet Commission* in years 2020-2025 (less education, hearing loss, hypertension, smoking, obesity, depression, physical inactivity, diabetes, excessive alcohol consumption, traumatic brain injury, air pollution, social isolation, vision loss and high LDL cholesterol) reduces the risk of developing dementia. Interventions therefore imply that all children should be educated, and education should have long duration; that individuals should be cognitively, physically, and socially active in midlife and late life; that hearing and visual loss should be treated with appropriate aids; that hypertension, diabetes and obesity should be recognised and adequately treated, and smoking should be stopped; that depression should be timely and properly managed; that strategies should be implemented to reduce pollution and improve air quality; and that protection from head injuries (head protection equipments, sports training) should be an individual and public health priority.

New evidence suggests that reducing the risk of dementia increases the number of healthy years of life in people who develop dementia. The potential for prevention appears to be high: overall, nearly 50% of dementias could theoretically be prevented by eliminating these 14 risk factors. It is therefore currently debated how policy interventions might improve dementia prevention. Recent reports indicate that there is more potential for reduction in risk in low- income and middle-income

countries (that show a higher burden of modifiable risk dementia is more likely to develop at an earlier age) than in higher-income countries. In addition, prevention approaches should aim to decrease risk factor levels early (ie, the earlier, the better) and keep them low throughout life (ie, the longer, the better). It is never too early or too late to reduce dementia risk. Socio-economical studies suggest that these interventions are often cost saving and, for the first time, it is clear that risk can be modified even in people with increased genetic risk of dementia. It is important to be ambitious about prevention. Prevention involves both policy changes at governmental levels and individually tailored interventions. Population-based policy should prioritise equity and ensure that groups at high risk are included. Interventions should often be multicomponent, and the benefits may be observed irrespective of the APOE genetic status and in individuals with either high or low genetic dementia risk. Interventions should involve caregivers, and should be extended to the management of behavioral and psychological symptoms of dementia, which are often a major burden for families.

As stated by the Lancet Commission, it is even more important, now, that care for people with dementia and their families is improved.

References

1. Livingston G, Huntley J, Kathy KY, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2024 report of the Lancet standing Commission. *Lancet*. 2024. doi: 10.1016/S0140-6736(24)01296-0. Epub 2024 Jul 31.
2. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet*. 2020; 396: 413-446.
3. WHO. Global health observatory: dementia standards/guidelines/protocols. 2023. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/global-dementia-observatory-gdo/diagnosis-treatmentand-care/dementia-standards-guidelines-protocols> (accessed April 4, 2023).
4. GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health*. 2022; 7: e105-125.
5. Feigin VL, Vos T, Nichols E, et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *Lancet Neurol*. 2020; 19: 255-265.
6. Maestre G, Carrillo M, Kalaria R, et al. The Nairobi Declaration - reducing the burden of dementia in low - and middle-income countries (LMICs): declaration of the 2022 Symposium on Dementia and Brain Aging in LMICs. *Alzheimers Dement* 2023; published online March 11. <https://doi.org/10.1002/alz.13025>.
7. Mukadam N, Anderson R, Knapp M, et al. Effective interventions for potentially modifiable risk factors for late-onset dementia: a costs and cost-effectiveness modelling study. *Lancet Healthy Longev*. 2020; 1: e13-20.
8. Guterman EL, Kiekhofer RE, Wood AJ, et al. Care ecosystem collaborative model and health care costs in medicare beneficiaries with dementia: a secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*. 2023; 183: 1222-1228.
9. Knapp M, Lorenz-Dant K, Walbaum M, et al. Scaling-up an evidence-based

- intervention for family carers of people with dementia: current and future costs and outcomes. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2024; 39: e6059.
10. National Institute for Health and Care Excellence. Dementia: assessment, management and support for people living with dementia and their carers. June 20, 2018. <https://www.nice.org.uk/guidance/ng97> (accessed June 22, 2024).
 11. James T, Mukadam N, Sommerlad A, et al. Protection against discrimination in national dementia guideline recommendations: a systematic review. *PLoS Med*. 2022; 19: e1003860.

C'è una dieta che allunga la vita?

Giuseppe Remuzzi

Direttore Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS;
Vice Presidente di Italian Institute for Planetary Health

Qualche settimana fa, su queste pagine, ci siamo chiesti se ridurre il numero di calorie (cioè mangiare un po' meno di quanto si faccia normalmente) allunghi davvero la vita, e perché, e se succede a tutti. E cosa si debba fare in pratica. Eravamo partiti da uno studio pubblicato su *Nature* che prendeva in considerazione un numero impressionante di topi sottoposti a diete diverse – digiuno un giorno alla settimana, digiuno per due giorni consecutivi, restrizione calorica del 20 o del 40 per cento rispetto alla dieta normale – tutti confrontati con un gruppo che mangiava quello che voleva. Ma la cosa più importante di questo studio era che i topi avevano caratteristiche genetiche diverse, così da ricordare almeno in parte quelle dell'uomo. Come ci si poteva aspettare, ridurre un po', attorno al 20 per cento, la quantità di calorie che i topi ingerivano durante la settimana allungava davvero la vita. Che poi le calorie le si riducano col digiuno intermittente, col concentrare l'assunzione di cibo in otto ore e digiunare per il resto del tempo, o con quello che agli animali è più congeniale, sembra essere irrilevante. Era invece cruciale che durante la restrizione calorica gli animali non perdessero peso, o almeno non troppo, perché chi perdeva troppo peso moriva prima degli altri. E poi, non tutti siamo "attrezzati" per prendere vantaggio dalla restrizione calorica allo stesso modo. Insomma, il segreto non è nel tipo di dieta o in come la fai e per quanto, ma è nel tuo DNA. Tanto che la restrizione calorica è certamente importante, ma ciò che conta di più nel determinare l'allungamento della vita risultava essere la predisposizione genetica. Ma qui arriva l'obiezione più facile, quella che certamente sarà venuta alla mente a molti di voi: siamo certi di poter applicare all'uomo i risultati di studi condotti nei topi? No, non ne siamo certi affatto (salvo che questa ricerca è stata condotta su un numero enorme di animali e, a mio parere, se una cosa del genere si fosse potuta fare nell'uomo, i risultati non sarebbero cambiati di molto).

Manco a dirlo, due giorni dopo l'uscita dell'articolo su La Lettura, *Nature* pubblica un altro studio di ricercatori spagnoli, questa volta nell'uomo, che affronta un tema molto vicino a quello dei topi. Quei ricercatori sanno bene che la restrizione calorica è il modo per combattere il sovrappeso che si associa a tante malattie - diabete, malattie cardiovascolari e tumori - e questo perché riduce la deposizione di grasso viscerale e migliora il metabolismo, ma si sono anche resi conto che, in pratica, non tutti riescono a farlo. È a questo punto che arriva l'idea di una dieta che anziché essere basata sulla restrizione calorica riduca invece la "finestra temporale"

in cui è consentito alimentarsi – in generale a 10 ore o anche di meno – con l’impegno però a mantenere il digiuno per il resto del tempo, 14 ore o anche di più (va detto che nelle ore di digiuno è consentito, anzi, è importante bere acqua, tè, caffè, brodo vegetale senza zuccheri aggiunti, evitare cibi solidi, bevande zuccherate e bevande alcoliche). Queste indicazioni arrivano da lavori pubblicati da un paio di anni, sempre da *Nature* e dal *New England Journal of Medicine* che dimostrano come dotarsi di una “finestra temporale” in cui concentrare l’assunzione del cibo non solo fa bene, ma si associa a una riduzione di peso per quanto non eccessiva (ed è proprio questo che, almeno nei topi, si è dimostrato importante) e migliora invariabilmente metabolismo e funzionalità cardio-respiratoria, in particolare negli obesi; gli effetti negativi in quegli studi erano davvero minimi.

Ci sono però due aspetti che gli studi precedenti non avevano mai affrontato. Qual è l’effetto dell’assumere cibo per un certo numero di ore, digiunando per il resto del tempo, sulla deposizione di grasso viscerale, quel grasso che è il maggiore fattore di rischio per malattie e mortalità legate all’eccesso di peso? E ancora, qual è la “finestra temporale” ideale tra le varie che sono state proposte entro cui limitare l’assunzione di cibo? Quest’ultima domanda è rilevante perché studi degli ultimi anni dimostravano in modo abbastanza consistente che per avere il massimo effetto di prevenzione delle malattie (di cuore in particolare) l’assunzione del cibo andrebbe concentrata nelle prime ore del giorno.

Queste conclusioni però derivavano tutte da studi su relativamente poche persone e non confrontavano mai fra loro diverse “finestre temporali” in cui assumere cibo. Tra l’altro, in teoria, se si fosse in grado di adattare la “finestra temporale” alle preferenze di ciascuno, i risultati potrebbero essere anche migliori perché sarebbe più facile adattarsi a una di quelle restrizioni se uno potesse concentrare le otto ore di assunzione di cibo quando preferisce, in rapporto alle sue abitudini. Ecco, il lavoro di *Nature* pubblicato il 7 gennaio, a cui facciamo riferimento in questo articolo, affronta proprio questi due problemi. Si è partiti da più di 2 mila persone per arrivare a quattro gruppi sostanzialmente identici di 50 persone ciascuno con sovrappeso o francamente obesi. Di questi, il primo gruppo concentrava l’assunzione di cibo in otto ore ma nella prima parte del giorno, un altro gruppo in otto ore ma più avanti nella giornata, altri sempre in otto ore scegliendo loro però, a seconda delle abitudini di ciascuno, quando alimentarsi; il quarto gruppo si alimentava quando voleva, tenuto conto però delle indicazioni fornite dai ricercatori nell’ambito di una corretta dieta mediterranea.

La prima cosa che si è voluto stabilire con questo studio – con la risonanza magnetica – è se ci fossero differenze nella distribuzione del grasso viscerale fra i tre gruppi che seguivano diverse “finestre temporali”. Risultato? Non c’era nessuna differenza. Il grasso viscerale si riduceva in tutti e quattro i gruppi, senza nessun rapporto con lo schema di “finestra temporale” e nemmeno con le abitudini a seguire una buona dieta mediterranea. I ricercatori si sono poi concentrati sulla distribuzione del grasso sottocutaneo e del grasso che si trova tra i muscoli dell’addome: anche qui sostanzialmente nessuna differenza tra i gruppi, salvo una riduzione più marcata del grasso sottocutaneo in chi concentrava l’assunzione di cibo nella prima metà della giornata. In quel gruppo anche i livelli di glucosio nel sangue durante la

notte erano più bassi che negli altri gruppi. Alimentarsi secondo le tre “finestre temporali” considerate in questo studio ha ridotto l’apporto energetico di 300-500 chilocalorie al giorno, con una perdita di peso del 4-6 per cento. Questo era indipendente dal tipo di “finestra temporale”, ma chi seguiva queste indicazioni aveva un’ulteriore perdita di circa tre chili di peso rispetto a coloro che si alimentavano secondo la dieta mediterranea, distribuendo l’assunzione del cibo a piacere durante la giornata.

È interessante vedere che le “finestre temporali” consentivano di calare di peso senza che ci fosse bisogno di dare indicazioni precise sulla quantità di calorie da assumere. I regimi alimentari delle tre finestre erano ben tollerati tutti, senza differenze negli indici cardio-metabolici (compresi i livelli di zucchero nel sangue, livelli di insulina, il colesterolo totale e il colesterolo “cattivo” e la capacità delle cellule dell’organismo di utilizzare adeguatamente il glucosio in risposta all’insulina). Non si sono registrati effetti indesiderati, attività fisica e ore di sonno non cambiavano con le quattro diete.

Qualcuno potrebbe chiedersi se c’erano differenze fra uomini e donne; i ricercatori hanno guardato anche questo, senza trovare alcuna differenza. La forza di questo studio è che per la prima volta gli effetti delle tre “finestre temporali” e dei vari regimi dietetici sono stati valutati in un arco di tempo abbastanza lungo, 12 settimane, cosa che negli studi precedenti non era mai stata fatta.

Ma non finisce qui, si dovranno fare ancora molti studi che comparino numeri di soggetti molto più grandi, che verifichino l’aderenza sia alle ore di assunzione di cibo rispetto al digiuno nei tre gruppi delle “finestre temporali” che l’aderenza alla dieta mediterranea che veniva suggerita. Ma questo studio, dopo quello che era stato visto nei topi, aggiunge un’altra tessera al puzzle: assumere cibo solo in certe ore del giorno e digiunare per il resto del tempo è certamente una buona idea, particolarmente per chi è in sovrappeso o francamente obeso. Per quando farlo durante il giorno valgono sostanzialmente le preferenze individuali, anche se idealmente si dovrebbero concentrare le otto ore in cui ci si si alimenta nella prima parte della giornata piuttosto che più tardi. Anche se nella distribuzione del grasso viscerale (il parametro più importante per la funzione di cuore, polmoni, fegato e reni e per il benessere dell’intero organismo), non cambia granché con le diverse “finestre temporali”, e quello che si ottiene è sovrapponibile ai risultati della dieta mediterranea, dove il cibo si assume secondo le preferenze individuali durante l’arco della giornata.

Giuseppe Remuzzi

La Lettura - 16 febbraio 2025

Bibliografia essenziale

1. Dote-Montero M, Clavero-Jimeno A, Merchán-Ramírez E, et al. Effects of early, late and self-selected time-restricted eating on visceral adipose tissue and cardiometabolic health in participants with overweight or obesity: a randomized controlled trial. *Nat Med.* 2025; 31: 524-533. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03375-y>



2. Mallapaty S. What's the secret to living to 100? Centenarian stem cells could offer clues. *Nature*. 2024 Nov 29. doi: 10.1038/d41586-024-03886-1. Epub ahead of print. PMID: 39614116.
3. Dolgin E. Eating less can lead to a longer life: massive study in mice shows why. *Nature*. 2024 Oct 9. doi: 10.1038/d41586-024-03277-6. Epub ahead of print. PMID: 39384926.
4. Ledford H. Why eating less slows ageing: this molecule is key. *Nature*. 2024 Dec 18. doi: 10.1038/d41586-024-04220-5. Epub ahead of print. PMID: 39695293.

Rejuvenating aged stem cells: therapeutic strategies to extend health and lifespan

Maria Carolina Florian

ICREA Research Professor, Group Leader Stem Cell Aging LAB, Program of Regenerative Medicine, Bellvitge Biomedical Institute (IDIBELL), Barcelona, Spain

Physiological aging is associated with a general impairment in stem cell function (2). Recent evidence shows that this process does not occur at the same speed in every organ, and this is strongly associated with increased mortality and age-related diseases (3). Interestingly, many of the current therapeutical approaches to limit or delay aging target the effects arising from decreased aged stem cell function. For this reason, targeting directly aged somatic stem cells might represent a more effective strategy to improve tissue homeostasis over time, and in some circumstances, may also improve health and lifespan in the elderly (1).

The strategies proposed to rejuvenate tissue resident aged stem cells to date mainly involve physical exercise, diet manipulation and fasting, or target senescence, autophagy, epigenetic reprogramming, circulating blood factors or stem cell polarity (Figure 1). Here, we briefly review some of the most recent strategies identified to improve function of aged tissue-resident somatic stem cells in mammals, and discuss their possible translational applications.

Exercise and diet interventions

The beneficial effect of exercise on health has been known for a long time (4). Many studies on this topic have focused on the changes induced by exercise on the skeletal muscle, as this is the most directly affected tissue (5-8). However, the rejuvenating effects on skeletal muscle stem cells seem to disappear once exercising is stopped (8).

The brain is another organ that is affected by exercise (9). However, although some studies reported an increase in the number of neural stem cells (NSC) (10,5), a rejuvenating effect in their transcriptome (11) and a recovery of the intercellular interactions with the NSC niche (5) after voluntary running for several weeks, the mechanistic link between these changes and the increase in neurogenesis has yet to be clearly proved.

Some other aged stem cells also benefit from exercise, such as tendon stem cells

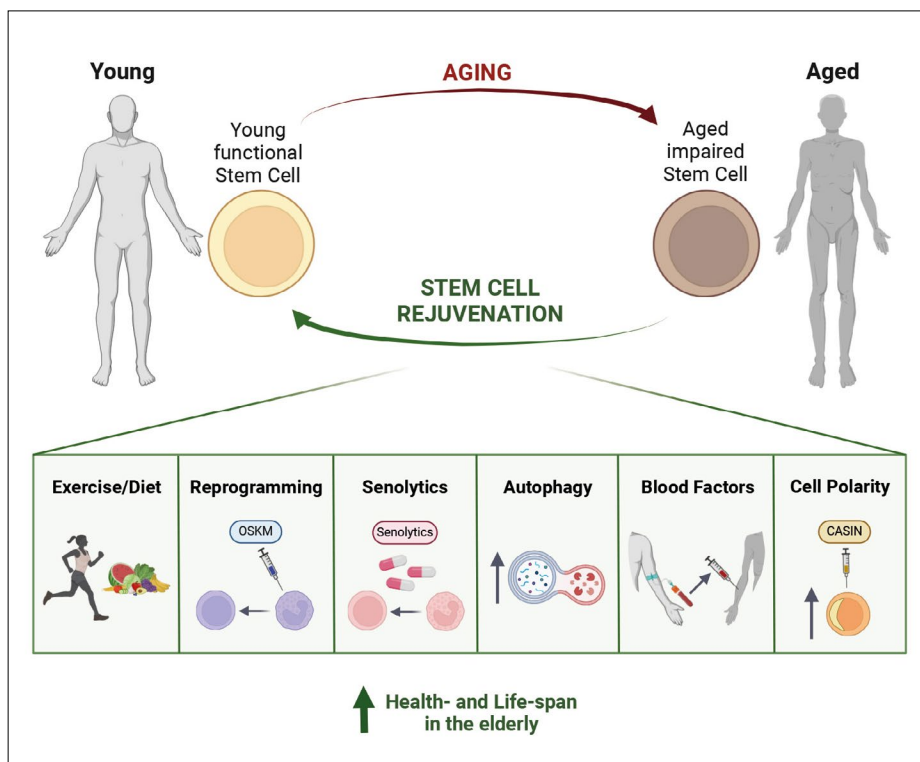


Figure 1 - Rejuvenating aged stem cells: therapeutic strategies to extend health and lifespan. Aging is associated with an impairment in stem cell function and several strategies for stem cell rejuvenation have been proposed: exercise, dietary restriction, reprogramming, senolytics, increasing autophagy, youthful blood factors exchange, and restoring cell polarity. Here, we review these strategies and their effects on rejuvenating stem cells in different tissues and underline when stem cell rejuvenation was able to improve health- and lifespan.

(12). Overall, exercise ameliorates the regenerative capacity of some tissues and is a clear strategy to improve health in the elderly. Nevertheless, it remains unclear if exercise alone is able to increase lifespan (13).

Calorie restriction (CR) and fasting are two other strategies that have been largely studied for their rejuvenating capacities. Intestinal stem cells (ISC) increase in number and replicate more after CR (14) and fasting-mimicking diet (FMD) (15, 16).

Other types of somatic stem cells, like mesenchymal stem cells (MSC) or hair follicle stem cells (HFSC), showed rejuvenating effects after FMD and CR, respectively.

Altogether, although some stem cell rejuvenating effects have been described, the lack of consistent results across the different fasting and CR strategies in the different organs, together with the variability described in some studies as for sex, strain and age of onset of the diet (17, 18), make it difficult at present to define a clear diet to achieve holistic stem cell rejuvenation and lifespan extension.

Partial reprogramming

An exciting strategy that has been proposed for cell rejuvenation is reprogramming cells to a more undifferentiated state by inducing expression of the Yamanaka factors Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc (OSKM). Although *in vivo* reprogramming by the OSKM factors has resulted in the induction of teratomas (19,20), partial reprogramming without achieving complete cellular dedifferentiation does not appear to be associated with tumorigenesis (21-23). A cyclic induction of OSKM was able to increase the numbers of MuSCs and HFSCs in adult mice with progeria and to improve regeneration of the skeletal muscle (21, 23, 24). Other cells and tissues showed rejuvenating effects after OSKM induction, such as the brain, showing improved memory (25); the retinal ganglion cells, showing increased axon regeneration and a reversion of vision loss in mice with glaucoma (23); and some cell types of the pancreas, liver, spleen and blood, with signs of rejuvenation at the transcriptome, epigenome and metabolome level (26). Lifespan extension after *in vivo* partial reprogramming in mammals has only been described in progeria mice (21). Hence, further studies will be needed to better understand the effect of reprogramming on stem cells and lifespan, and to define an optimal treatment strategy to achieve rejuvenation without the risk of cancer induction.

Senescence

Cellular senescence is characterized by a stable cell-cycle arrest of dysfunctional cells which also present with a senescence-associated secretory phenotype (SASP) (27). The accumulation of senescent cells upon aging has been shown to limit lifespan and health span in mice (28). Clearance of senescent cells with senolytics was shown to exert promising results on HSCs and MuSCs (29, 30) in mice and also on human MSCs *in vitro* (31).

Recently, the rescue of the senescence-driven alteration in mitochondrial dynamics and ROS production (32, 33) and in NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 6 (Ndufs6) has been proposed as a solution to rejuvenate aged MSCs (32, 34-37). Moreover, it has been reported that NAD⁺ metabolism controls SASP production (38). The supplementation of NAD⁺ and of its precursor rejuvenates MuSCs, melanocyte stem cells and NSCs, and enhances lifespan in mice (39).

Autophagy

Autophagy is a highly conserved pathway that degrades defective cellular organelles and aggregates of misfolded protein through lysosomes. Compromised autophagy is a hallmark of aging (40). *In vitro*, interventions targeting autophagy have shown to improve the function and to directly rejuvenate different somatic stem cells (41-43). However, it still remains unclear whether direct modulation of autophagy, systemically or in specific organs, has a causal role in lifespan extension in mammals, as in mammals the effect of autophagy on lifespan extension is mostly evaluated in association with or dependence to caloric restriction (44).

Circulating blood factors

Another rejuvenation strategy that systemically targets the organism is parabiosis, which consists of the exchange of blood circulation between heterochronic animals, as systemic factors present in young blood or plasma have been shown to have a protective effect against age-related diseases in various tissues (45, 46), while blood or plasma from old mice induces senescence and ages young tissues (47, 48). Administration of young-derived blood products in humans is currently under evaluation as a possible anti-aging strategy (49).

Cell polarity and Cdc42 activity

Cell polarization, defined as the uneven distribution of RNAs, proteins, organelles, and cytoplasm, occurs in many forms and the most widely known is the apical-basal polarity of epithelial cells.

The capacity of establishing cell polarity, associated with the activity or the expression of specific polarity proteins, appears to be linked to aging of asymmetricaly dividing cells and organisms (50). Over the years it has been shown how polarity regulation is essential for homeostasis, especially in the epithelial tissue (51, 52).

In the context of somatic stem cell rejuvenation, targeting cell polarity represents a potential strategy to improve tissue and organ regeneration. For example, the small RhoGTPase Cdc42 is involved in the establishment of cell polarity in many cell types and its activity level increases over time, driving loss of polarity and aging in stem cells (53-56). Cdc42 activity can be efficiently targeted by using a specific small molecule inhibitor named CASIN (Cdc42 activity-specific inhibitor) (57). CASIN treatment has been shown to rejuvenate different somatic stem cell types (54, 58-60). In detail, systemic treatment of aged mice with CASIN rejuvenates HFSCs by restoring canonical Wnt signaling (58) and ISCs by improving regeneration of aged crypts upon stress (59). Recently, we reported that systemic inhibition of the activity of Cdc42 targets aged MuSCs and HSCs *in vivo*, and further, we proved that transplantation of CASIN-rejuvenated aged HSCs is sufficient to extend the lifespan and health span of aged recipient mice (56).

Conclusions and perspectives

Collectively, these results provide the proof-of-concept that somatic stem cell rejuvenation is a possible strategy to improve the regenerative capacity of several tissues upon aging and that in some instances, stem cell rejuvenation globally improves the whole organism health span and lifespan. Mice are extensively used as model systems to recapitulate human physiology and most of the data that we have described above are based on murine studies. A few of these interventions have now also been translated into the human system; for example, senolytic treatments (61), blood transfer (49), and autophagy-targeting drugs have been used in patients (44). Interestingly, it has been recently published that, in line with the alterations occurring in murine HSCs over time, Cdc42 activity also increases in association with

loss of cell polarity in human HSCs (hHSCs) upon aging (62,63). Importantly, *ex vivo* CASIN treatment of aged hHSCs restores polarity and the engraftment profile to the levels of young hHSCs in xenotransplantation experiments (63).

In conclusion, several lines of evidence suggest that human somatic stem cell rejuvenation might represent in the next future a promising potential therapeutical strategy to comprehensively improve quality of life in the elderly, paving the way for a new era of stem cell anti-aging therapies.

Competing interests

M. Carolina Florian discloses financial interest in Mogling Bio.

Acknowledgments

This work is supported by a European Research Council (ERC) grant 101002453 to MCF.

References

1. Matteini F, Montserrat-Vazquez S, Florian MC. Rejuvenating aged stem cells: therapeutic strategies to extend health and lifespan. *FEBS Lett* [Internet]. 2024 [cited 2025 Jan 30]; 598 (22): 2776-2787. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1873-3468.14865>.
2. Brunet A, Goodell MA, Rando TA. Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2023; 24 (1): 45-62.
3. Oh HSH, Rutledge J, Nachun D, Pálovics R, Abiose O, Moran-Losada P, et al. Organ aging signatures in the plasma proteome track health and disease. *Nature*. 2023; 624 (7990): 164-161.
4. Goh J, Wong E, Soh J, Maier AB, Kennedy BK. Targeting the molecular & cellular pillars of human aging with exercise. *FEBS J*. 2023; 290 (3): 649-668.
5. Liu L, Kim S, Buckley MT, Reyes JM, Kang J, Tian L, et al. Exercise reprograms the inflammatory landscape of multiple stem cell compartments during mammalian aging. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (5): 689-705.e4.
6. Shefer G, Rauner G, Stuelsatz P, Benayahu D, Yablonka-Reuveni Z. Moderate-intensity treadmill running promotes expansion of the satellite cell pool in young and old mice. *FEBS J*. 2013; 280 (17): 4063-4073.
7. Verdijk LB, Snijders T, Drost M, Delhaas T, Kadi F, van Loon LJC. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *AGE*. 2014; 36 (2): 545-557.
8. Brett JO, Arjona M, Ikeda M, Quarta M, de Morrée A, Egner IM, et al. Exercise rejuvenates quiescent skeletal muscle stem cells in old mice through restoration of Cyclin D1. *Nat Metab*. 2020; 2 (4): 307-317.
9. Horowitz AM, Fan X, Bieri G, Smith LK, Sanchez-Diaz CI, Schroer AB, et al. Blood factors transfer beneficial effects of exercise on neurogenesis and cognition to the aged brain. *Science*. 2020; 369 (6500): 167-173.
10. Miguel ZD, Khoury N, Betley MJ, Lehallier B, Willoughby D, Olsson N, et al.

- Exercise plasma boosts memory and dampens brain inflammation via clusterin. *Nature*. 2021; 600 (7889): 494-499.
11. Buckley MT, Sun ED, George BM, Liu L, Schaum N, Xu L, et al. Cell-type-specific aging clocks to quantify aging and rejuvenation in neurogenic regions of the brain. *Nat Aging*. 2023; 3 (1): 121-137.
 12. Zhang J, Wang JHC. Moderate Exercise Mitigates the Detrimental Effects of Aging on Tendon Stem Cells. *PLOS ONE*. 2015; 10 (6): e0130454.
 13. Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC, Rodriguez-Mañas L, Garcia-Garcia FJ, Diaz A, Noguera I, et al. Life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but improves health span in mice. *Longev Heal*. 2013; 2 (1): 14.14.
 14. Igarashi M, Guarente L. mTORC1 and SIRT1 Cooperate to Foster Expansion of Gut Adult Stem Cells during Calorie Restriction. *Cell*. 2016; 166 (2): 436-450.
 15. Mihaylova MM, Cheng CW, Cao AQ, Tripathi S, Mana MD, Bauer-Rowe KE, et al. Fasting Activates Fatty Acid Oxidation to Enhance Intestinal Stem Cell Function during Homeostasis and Aging. *Cell Stem Cell*. 2018; 22 (5): 769-778.e4.
 16. Rangan P, Choi I, Wei M, Navarrete G, Guen E, Brandhorst S, et al. Fasting-Mimicking Diet Modulates Microbiota and Promotes Intestinal Regeneration to Reduce Inflammatory Bowel Disease Pathology. *Cell Rep*. 2019; 26 (10): 2704-2719.e6.
 17. Hahn O, Drews LF, Nguyen A, Tatsuta T, Gkioni L, Hendrich O, et al. A nutritional memory effect counteracts the benefits of dietary restriction in old mice. *Nat Metab*. 2019; 1 (11): 1059-1073.
 18. Boldrin L, Ross JA, Whitmore C, Doreste B, Beaver C, Eddaoudi A, et al. The effect of calorie restriction on mouse skeletal muscle is sex, strain and time-dependent. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 5160.
 19. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, et al. Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell*. 2014; 156 (4): 663-677.
 20. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Cañamero M, Rayon T, Ors I, et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*. 2013; 502 (7471): 340-345.
 21. Ocampo A, Reddy P, Martinez-Redondo P, Platero-Luengo A, Hatanaka F, Hishida T, et al. In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell*. 2016; 167 (7): 1719-1733.e12.
 22. Lu Y, Brommer B, Tian X, Krishnan A, Meer M, Wang C, et al. Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature*. 2020; 588 (7836): 124-129.
 23. Sarkar TJ, Quarta M, Mukherjee S, Colville A, Paine P, Doan L, et al. Transient non- integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 1545.
 24. Wang C, Rabadan Ros R, Martinez-Redondo P, Ma Z, Shi L, Xue Y, et al. In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nat Commun*. 2021; 12 (1): 3094.
 25. Rodríguez-Matellán A, Alcazar N, Hernández F, Serrano M, Ávila J. In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Rep*. 2020; 15 (5): 1056-1066.

26. Chondronasiou D, Gill D, Mosteiro L, Urduingio RG, Berenguer-Llargo A, Aguilera M, et al. Multi-omic rejuvenation of naturally aged tissues by a single cycle of transient reprogramming. *Aging Cell*. 2022; 21 (3): e13578.
27. Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLOS Biol*. 2020; 18 (1): e3000599.
28. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016; 530 (7589): 184-189.
29. Moiseeva V, Cisneros A, Sica V, Deryagin O, Lai Y, Jung S, et al. Senescence atlas reveals an aged-like inflamed niche that blunts muscle regeneration. *Nature*. 2023; 613 (7942): 169-178.
30. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med*. 2016; 22 (1): 78-83.
31. Grezella C, Fernandez-Rebollo E, Franzen J, Ventura Ferreira MS, Beier F, Wagner W. Effects of senolytic drugs on human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 9 (1): 108.
32. Li X, Hong Y, He H, Jiang G, You W, Liang X, et al. FGF21 Mediates Mesenchymal Stem Cell Senescence via Regulation of Mitochondrial Dynamics. *Oxid Med Cell Longev*. 2019; 2019: 4915149.
33. Khanh VC, Yamashita T, Ohneda K, Tokunaga C, Kato H, Osaka M, et al. Rejuvenation of mesenchymal stem cells by extracellular vesicles inhibits the elevation of reactive oxygen species. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 17315.
34. Yeo GEC, Ng MH, Nordin FB, Law JX. Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Rejuvenation of the Aging Immune System. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (11): 5749.
35. Cheng M, Yuan W, Moshaverinia A, Yu B. Rejuvenation of Mesenchymal Stem Cells to Ameliorate Skeletal Aging. *Cells*. 2023; 12 (7): 998.
36. Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L, Moussa Agha D, Bouhtit F, Meuleman N, et al. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jan 19]; 9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.661532>
37. Zhang Y, Guo L, Han S, Chen L, Li C, Zhang Z, et al. Adult mesenchymal stem cell ageing interplays with depressed mitochondrial Ndufs6. *Cell Death Dis*. 202; 11 (12): 1075.
38. Nacarelli T, Lau L, Fukumoto T, Zundell J, Fatkhutdinov N, Wu S, et al. NAD+ metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome. *Nat Cell Biol*. 2019; 21 (3): 397-407.
39. Zhang H, Ryu D, Wu Y, Gariani K, Wang X, Luan P, et al. NAD+ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science*. 2016; 352 (6292): 1436-1443.
40. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging*. 2021; 1 (8): 634-650.

41. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018; 19 (9): 579-593.
42. Dong S, Wang Q, Kao YR, Diaz A, Tasset I, Kaushik S, et al. Chaperone-mediated autophagy sustains haematopoietic stem-cell function. *Nature.* 2021; 591 (7848): 117-123.
43. Carnio S, LoVerso F, Baraibar MA, Longa E, Khan MM, Maffei M, et al. Autophagy Impairment in Muscle Induces Neuromuscular Junction Degeneration and Precocious Aging. *Cell Rep.* 2014; 8 (5): 1509-1521.
44. Danics L, Abbas AA, Kis B, Pircs K. Fountain of youth-Targeting autophagy in aging. *Front Aging Neurosci.* 2023; 15: 1125739.
45. Ma S, Wang S, Ye Y, Ren J, Chen R, Li W, et al. Heterochronic parabiosis induces stem cell revitalization and systemic rejuvenation across aged tissues. *Cell Stem Cell.* 2022; 29 (6): 990-1005.e10.
46. Villeda SA, Plambeck KE, Middeldorp J, Castellano JM, Mosher KI, Luo J, et al. Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med.* 2014; 20 (6): 659-663.
47. Jeon OH, Mehdipour M, Gil TH, Kang M, Aguirre NW, Robinson ZR, et al. Systemic induction of senescence in young mice after single heterochronic blood exchange. *Nat Metab.* 2022; 4 (8): 995-1006.
48. Rebo J, Mehdipour M, Gathwala R, Causey K, Liu Y, Conboy MJ, et al. A single heterochronic blood exchange reveals rapid inhibition of multiple tissues by old blood. *Nat Commun.* 2016; 7: 13363.
49. Hosseini L, Shahabi P, Fakhari A, Zangbar HS, Seyedaghamiri F, Sadeghzadeh J, et al. Aging and age-related diseases with a focus on therapeutic potentials of young blood/plasma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2023.
50. Budovsky A, Fraifeld VE, Aronov S. Linking cell polarity, aging and rejuvenation. *Biogerontology.* 2011; 12 (2): 167-175.
51. Ali NJA, Dias Gomes M, Bauer R, Brodesser S, Niemann C, Iden S. Essential Role of Polarity Protein Par3 for Epidermal Homeostasis through Regulation of Barrier Function, Keratinocyte Differentiation, and Stem Cell Maintenance. *J Invest Dermatol.* 2016; 136 (12): 2406-2416.
52. Dias Gomes M, Letzian S, Saynisch M, Iden S. Polarity signaling ensures epidermal homeostasis by coupling cellular mechanics and genomic integrity. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 3362.
53. Kang PJ, Mullner R, Li H, Hansford D, Shen HW, Park HO. Up-regulation of the Cdc42 GTPase limits the replicative life span of budding yeast. *Mol Biol Cell.* 2022; 33 (4): br5.
54. Florian MC, Dörr K, Niebel A, Daria D, Schrezenmeier H, Rojewski M, et al. Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation. *Cell Stem Cell.* 2012; 10 (5): 520-530.
55. Florian MC, Leins H, Gobs M, Han Y, Marka G, Soller K, et al. Inhibition of Cdc42 activity extends lifespan and decreases circulating inflammatory cytokines in aged female C57BL/6 mice. *Aging Cell.* 2020; 19 (9): e13208.
56. Montserrat-Vazquez S, Ali NJ, Matteini F, Lozano J, Zhaowei T, Mejia-Ramirez

- E, et al. Transplanting rejuvenated blood stem cells extends lifespan of aged immunocompromised mice. *NPJ Regen Med.* 2022; 7 (1): 78.
57. Liu W, Du W, Shang X, Wang L, Evelyn C, Florian MC, et al. Rational identification of a Cdc42 inhibitor presents a new regimen for long-term hematopoietic stem cell mobilization. *Leukemia.* 2019; 33 (3): 749-761.
58. Tiwari A, Tursky ML, Kirkland MA, Pande G. Expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells on decellularized matrix scaffolds. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2014; 28: Unit 1C.15.
59. Nalapareddy K, Hassan A, Sampson LL, Zheng Y, Geiger H. Suppression of elevated Cdc42 activity promotes the regenerative potential of aged intestinal stem cells. *Science.* 2021; 24 (4): 102362.
60. Umbayev B, Masoud AR, Tsoy A, Alimbetov D, Olzhayev F, Shramko A, et al. Elevated levels of the small GTPase Cdc42 induces senescence in male rat mesenchymal stem cells. *Biogerontology.* 2018 Jul; 19 (3-4): 287-301.
61. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics Improve Physical Function and Increase Lifespan in Old Age. *Nat Med.* 2018; 24 (8): 1246-1256.
62. Florian MC, Klenk J, Marka G, Soller K, Kiryakos H, Peter R, et al. Expression and Activity of the Small RhoGTPase Cdc42 in Blood Cells of Older Adults Are Associated With Age and Cardiovascular Disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2017; 72 (9): 1196-1200.
63. Amoah A, Keller A, Emini R, Hoenicka M, Liebold A, Vollmer A, et al. Aging of human hematopoietic stem cells is linked to changes in Cdc42 activity. *Haematologica.* 2022; 107 (2): 393-402.

Il problema della longevità e invecchiamento in buona salute: avanzamento delle conoscenze delle basi molecolari, sviluppi tecnologici e prospettive di applicazioni in campo medico

Valerio Orlando

Director Environmental Epigenetics Research Program, King Abdullah University of Science and Technology KAUST, Thuwal, Saudi Arabia

Il tema della longevità è da sempre uno degli argomenti di maggiore interesse nella società contemporanea. Con il progresso delle scienze mediche, la qualità della vita si è notevolmente migliorata e la speranza di vita è aumentata in molti paesi del mondo. Tuttavia, accanto a questo progresso, si pone una domanda cruciale: *come possiamo vivere a lungo e, soprattutto, in buona salute?* La risposta non è semplice, e richiede un'analisi delle dinamiche biologiche, sociali e culturali che influenzano il processo di invecchiamento.

Nella lezione saranno discussi i concetti e le più recenti conoscenze dei meccanismi molecolari su cui si basano gli attuali approcci d'intervento e prospettive terapeutiche.

La Longevità e la Medicina Moderna

Negli ultimi decenni, la medicina ha fatto passi da gigante. I progressi in campo genetico, farmacologico e nelle tecniche chirurgiche hanno permesso non solo di aumentare la durata della vita, ma anche di migliorarne la qualità. Terapie innovative contro malattie croniche come il diabete, l'ipertensione e le malattie cardiovascolari, così come il trattamento delle malattie neurodegenerative, hanno contribuito a far vivere più a lungo le persone.

Tuttavia, non è sufficiente “aggiungere anni alla vita”. È necessario aggiungere “vita agli anni”, un concetto che sottolinea l'importanza di non solo prolungare la durata della vita, ma anche garantire che questi anni siano vissuti in buona salute, senza gravi disabilità fisiche o cognitive.

L'Invecchiamento: Un Processo Biologico Complesso

L'invecchiamento è un fenomeno naturale e inevitabile, ma che dipende da una combinazione di fattori genetici e ambientali. Con l'avanzare dell'età, il nostro or-

ganismo subisce una serie di cambiamenti: la pelle perde elasticità, i muscoli si indeboliscono, la memoria può risultare meno efficiente e il sistema immunitario si deteriora, rendendo gli anziani più vulnerabili a malattie infettive.

Tuttavia, ciò che accade biologicamente durante l'invecchiamento non è pre-determinato in modo assoluto. Ci sono fattori che possiamo controllare, come l'alimentazione, l'attività fisica e le abitudini di vita, che possono influenzare significativamente il modo in cui invecchiamo.

Alimentazione e Invecchiamento

Un aspetto fondamentale per l'invecchiamento in buona salute è rappresentato da una corretta alimentazione. Le diete ricche di antiossidanti, vitamine e minerali sono essenziali per rallentare i processi di invecchiamento cellulare. Alimenti come frutta, verdura, noci, pesce e legumi forniscono nutrienti fondamentali per il benessere del corpo, contribuendo a ridurre l'infiammazione, migliorare la salute cardiovascolare e rinforzare il sistema immunitario.

Inoltre, la restrizione calorica moderata è stata studiata come un possibile metodo per prolungare la vita e prevenire malattie legate all'invecchiamento, anche se non si conoscono ancora appieno i meccanismi attraverso cui essa possa avere effetti così benefici.

Attività Fisica e Salute Mentale

L'attività fisica è un altro pilastro fondamentale nella prevenzione dell'invecchiamento precoce. Non solo aiuta a mantenere un peso corporeo sano, ma è anche cruciale per mantenere la massa muscolare e la densità ossea, riducendo il rischio di osteoporosi e cadute. In particolare, l'esercizio aerobico, come camminare, correre o andare in bicicletta, è associato a una migliore salute cardiovascolare, mentre l'esercizio di resistenza, come il sollevamento pesi, è utile per mantenere la forza muscolare.

Inoltre, la salute mentale è altrettanto importante. Un'adeguata gestione dello stress, la stimolazione cognitiva attraverso lettura o attività sociali, e una rete di supporto familiare e sociale possono giocare un ruolo fondamentale nel prevenire il deterioramento cognitivo e nel migliorare la qualità della vita negli anziani.

Il Ruolo della Genetica

Sebbene molti aspetti della longevità siano legati allo stile di vita, la genetica ha un ruolo determinante. Alcune persone sembrano essere geneticamente predisposte a vivere più a lungo e in buona salute, grazie a vari meccanismi di protezione cellulare e riparazione del DNA. Tuttavia, anche se non possiamo cambiare il nostro patrimonio genetico, possiamo comunque influenzare in modo significativo il modo in cui questi geni si esprimono attraverso le nostre scelte quotidiane.

Le Sfide Sociali e Culturali

Oltre ai fattori biologici, le condizioni sociali e culturali giocano un ruolo cruciale nell'invecchiamento. In molte società, la longevità porta con sé anche sfide economiche e sociali. Il sistema pensionistico, la disponibilità di cure sanitarie e l'inclusione sociale degli anziani sono questioni che richiedono attenzione. Una popolazione che invecchia rapidamente pone sfide significative a livello sociale, economico e sanitario.

In alcune culture, gli anziani sono visti come una risorsa e rispettati per la loro esperienza. In altre, invece, possono diventare vittime di isolamento e discriminazione, un fenomeno che può influire negativamente sul loro benessere psicologico e fisico.

Tali considerazioni impongono l'apertura di una riflessione globale su modelli di organizzazione economica e sociale, relativi costi e investimenti che rimettano al centro le persone e la protezione della salute come diritto fondamentale.

Bibliografia essenziale

1. Franceschi C, et al. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related disease. *Nat. Rev Endocrinology*. 2018; 14: 577.
2. Longo V, Intermediate and periodic fasting in the treatment of obesity and type2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinology*. 2024; 21: 73.
3. Moqri M, et al. Biomarkers of aging for the identification and evaluation of longevity intervention. *Cell*. 2023; 186: 3758.
4. Moqri M, et al. Validation of biomarkers of aging. *Nature Medicine*. 2024; 30: 360.
5. Vernieri C, et al. Cyclic fasting-mimicking diet in cancer treatment: preclinical and clinical evidence. *Cell Metabolism*. 2024; 36: 1644.
6. Zhang W, et al. The ageing epigenome and its rejuvenation. *Nat. Rev. Mol Cell Biol*. 2020; 21B 137.

Nuclear Homeostasis During Aging: Dysregulation of Reversible Phosphorylation

Konstantinos Lefkimiatis

Professore Ordinario di Fisiologia, Dipartimenti di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia;
Principal Investigator, Istituto Veneto di Medicina Molecolare, Padova

Aging is a complex biological process characterized by the gradual decline in physiological functions, and a predictor of severe diseases including neurodegeneration and cancer (1). Among the many consequences of Aging, skeletal muscle weakening and reduced adaptive capacity contribute to sarcopenia, a major public health issue that affects more than 50% of the elderly over 80 and is associated with increased frailty, morbidity, and mortality (2). Despite the clinical relevance of these phenomena their underlying mechanisms and precise molecular link(s) to aging remain incompletely understood. Interestingly, while age-related changes in nuclear morphology, positioning, and chromatin condensation are well documented (3, 4), the signalling pathways that initiate and regulate these nuclear phenotypes during aging are largely unknown.

Among the molecular mechanisms implicated in aging and nuclear homeostasis, reversible phosphorylation plays a pivotal role. Phosphorylation serves as a regulatory mechanism that modulates protein function, activity, localization, and interactions (5) and consequently can influence all the major cellular processes. Indeed, phosphorylation is involved in the regulation of several nuclear activities including gene expression, DNA repair and most importantly cell division (6). It is therefore non surprising that dysregulation of protein phosphorylation can impair tissue stress resistance, increase inflammation, and potentially compromise genomic integrity (1, 7).

Phosphorylation depends on the balanced activity of kinases and phosphatases (8). In fact, once a protein is phosphorylated by a kinase, the only possible subsequent action is dephosphorylation by a phosphatase. This reflects a binary regulatory mechanism in the kinase-phosphatase equilibrium that can be cyclical and highlights the irreversible and mutually exclusive nature of phosphorylation and dephosphorylation (5, 9). A hallmark of aged cells is a generalised hyperphosphorylation status the molecular determinants of which may lay on the Kinases, which could become hyperactive or more abundant, or on the phosphatases which may become less active or less stable (10, 11). As mentioned before, one of the subcellular compartments that is far from immune from these changes is the nucleus. In fact, in the nuclei of the ageing cells the balance between kinases and phosphatases is often disrupted leading to changes in nuclear morphology and function.

In a series of recent manuscripts, our group proposed the idea that phosphatases can regulate both the duration and range of a phosphorylation event (12, 13). We found that the accessibility of phosphorylated targets may vary depending on their subcellular locations. Consequently, targets that are more accessible to phosphatases will be dephosphorylated with faster kinetics, as compared to targets that are less exposed to the actions of these enzymes (12). To better understand the relation between nuclear kinases and phosphatases we developed a series of biosensors able to measure in real time in living cells the dynamic phosphorylation/dephosphorylation equilibrium (*unpublished data*). We realised that in the nucleus the phosphatase pressure is extremely high guaranteeing low phosphorylation levels (*unpublished data*). All together published and unpublished data led us to formulate the hypothesis that during aging (when nuclear phosphorylation is high) the nuclear phosphatase actions are somehow weakened allowing for more ectopic kinase activity with dire consequences. To test this hypothesis, we opted to use as model the skeletal muscle as it is a tissue with multinucleate cells that is easily manipulated and subject to drastic changes during aging. Indeed, at the molecular level, skeletal muscle aging is characterised by altered phosphorylation patterns that may impair key processes such as mitochondrial biogenesis, calcium handling, and autophagy (14, 15). Reversible phosphorylation also modulates the function of structural and contractile proteins (16). Using skeletal muscle fibers from 4m/o and 24 m/o animals we found that phosphatase pressure in the nucleus decreased drastically in aged animals confirming our initial hypothesis (*unpublished data*). These findings raised a number of relevant questions including the identity of the phosphatase(s) responsible for controlling nuclear kinases and the mechanisms underlying the weakening of their actions during aging.

Based on our observations it is tempting to propose that understanding nuclear phosphorylation dynamics and their regulatory mechanisms will provide new opportunities for therapeutic intervention. Indeed, inhibiting specific kinases or activating nuclear phosphatases may help restore the age-dependent alterations in nuclear signalling and consequently improve muscle functionality.

References

1. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013; 153: 1194-1217.
2. Roubenoff R. Sarcopenia: a major modifiable cause of frailty in the elderly. *J Nutr Health Aging*. 2000; 4: 140-142.
3. Cristea A, Qaisar R, Edlund PK, Lindblad J, Bengtsson E, Larsson L. Effects of aging and gender on the spatial organization of nuclei in single human skeletal muscle cells. *Aging Cell*. 2010; 9: 685-697.
4. van Ingen MJA, Kirby TJ. LINCing Nuclear Mechanobiology With Skeletal Muscle Mass and Function. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 1-12 doi: 10.3389/fcell.2021.690577.
5. Cohen P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation - a 25 year update. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25: 596-601.



6. Jackson SP & Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009; 461: 1071-1078.
7. Salminen A, Kaarniranta K. NF-kappaB signaling in the aging process. *J Clin Immunol*. 2009; 29: 397-405.
8. Brautigan DL. Protein Ser/Thr phosphatases - the ugly ducklings of cell signaling. *FEBS J*. 2013; 280: 324-345.
9. Hunter T. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Mol Cell*. 2007; 28: 730-738.
10. Veeranna Yang DS, Lee JH, Vinod KY, Stavrides P, Amin ND, Pant HC, Nixon RA. Declining phosphatases underlie aging-related hyperphosphorylation of neurofilaments. *Neurobiol Aging*. 2011; 32: 2016-2029.
11. Sontag E. Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell Signal*. 2001; 13: 7-16.
12. Conca F, Bayburtlu DK, Vismara M, Surdo NC, Tavoni A, Nogara L, Sarra A, Ciciliot S, et al. Phosphatases control the duration and range of cAMP/PKA microdomains. *Funct (Oxford, England)*. 2025.
13. Burdyga A, Surdo NC, Monterisi S, Di Benedetto G, Grisan F, Penna E, Pellegrini L, Zaccolo M, Bortolozzi M, Swietach P, et al. Phosphatases control PKA-dependent functional microdomains at the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci*. 2018; 115: E6497-E6506.
14. Brook MS, Wilkinson DJ, Phillips BE, Perez-Schindler J, Philp A, Smith K, Atherton PJ. Skeletal muscle homeostasis and plasticity in youth and ageing: impact of nutrition and exercise. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016; 216: 15-41.
15. Brocca L, McPhee JS, Longa E, Canepari M, Seynnes O, De Vito G, Pellegrino MA, Narici M, Bottinelli R. Structure and function of human muscle fibres and muscle proteome in physically active older men. *J Physiol*. 2017; 595: 4823-4844.
16. Klapproth E, Kämmerer S, El-Armouche A. Function and regulation of phosphatase 1 in healthy and diseased heart. *Cell Signal*. 2022; 90: 110203.

The thermodynamic hypothesis of protein aggregation

Michele Vendruscolo

Director, Chemistry of Health Laboratory, Co-Director, Centre for Misfolding Diseases,
Deputy Director, Molecular Production and Characterisation Centre Yusuf Hamied Department
of Chemistry, University of Cambridge

The phenomenon of protein misfolding and aggregation is associated with a wide range of neurodegenerative and systemic disorders, including Alzheimer's and Parkinson's diseases and type 2 diabetes. The complexity of these diseases, which are often multifactorial and related to age and lifestyle, has made it challenging to identify the causes of the accumulation of aberrant protein deposits. An insight into the origins of these deposits comes from reports of a widespread presence of protein aggregates even under normal cellular conditions. This observation can be explained by the thermodynamic hypothesis of protein aggregation. According to this hypothesis, many proteins are expressed at levels close to their supersaturation limits, so that their native states are metastable against aggregation. We discuss the evidence supporting this concept, and describe therapeutic strategies based on it.

Introduction

Protein aggregation is the hallmark of a variety of neurodegenerative and systemic disorders (Chiti and Dobson, 2017; Cohen and Kelly, 2003; Dobson, 2003; Eisenberg and Jucker, 2012; Hampel et al., 2021; Knowles et al., 2014; Merlini and Bellotti, 2003; Selkoe and Hardy, 2016). Although the clinical manifestations of these diseases include a vast range of symptoms, they share a common molecular signature, as they are closely associated with the presence of amyloid aggregates in the affected tissues and organs (Chiti and Dobson, 2017; Cohen and Kelly, 2003; Dobson, 2003; Eisenberg and Jucker, 2012; Hampel et al., 2021; Knowles et al., 2014; Merlini and Bellotti, 2003; Selkoe and Hardy, 2016).

The fundamental nature of the aggregated state and its manifestations in living organisms has led to the observation of widespread protein aggregation, whereby a large fraction of the proteome may undergo aggregation (Bourdenx et al., 2021; Chen et al., 2024; Ciryam et al., 2019; Ciryam et al., 2016; Ciryam et al., 2017; Ciryam et al., 2013; David et al., 2010; Freer et al., 2019; Freer et al., 2016; Fu et al., 2019; Györkei et al., 2022; Heller et al., 2020; Huang et al., 2019; Kelmer Sacramento et al., 2020; Leuenberger et al., 2017; Määttä et al., 2020; Olzscha et al., 2011; Reis-Rodrigues et al., 2012; Sui et al., 2020; Wallace et al., 2015; Walther

et al., 2015; Zhu et al., 2022b). It has thus been suggested that the origin of this phenomenon is that proteins are expressed at levels close to their solubility limits (Baldwin et al., 2011; Tartaglia et al., 2007; Vecchi et al., 2020), therefore being supersaturated (Ciryam et al., 2015). Furthermore, the ability to aggregate and form amyloid fibrils can be regarded as an intrinsic property of polypeptide chains, even if the aggregation rates can vary dramatically among different proteins (Chiti et al., 2003; Dobson, 2003; Fernandez-Escamilla et al., 2004; Knowles et al., 2014; Tartaglia and Vendruscolo, 2008).

To rationalise these observations, we discuss here the thermodynamic hypothesis of protein aggregation as a central paradigm for understanding the origins and consequences of protein misfolding and aggregation. This hypothesis states that the amyloid state is the most stable state of proteins under normal cellular conditions, at least for a large fraction of the proteome.

We explore the evidence supporting this hypothesis and its implications for protein misfolding diseases. Central topics include the metastability of native protein states, the role of the protein homeostasis system in maintaining the balance between the functional and aberrant states, and the factors driving aggregation beyond the solubility threshold. We then examine therapeutic strategies derived from this hypothesis, encompassing both thermodynamic approaches aimed at stabilizing native states and kinetic approaches designed to delay the aggregation process. Our discussion extends to innovative methodologies addressing the challenges of targeting intrinsically disordered proteins and the potential therapeutic benefits of disrupting protein condensation pathways.

By integrating insights from molecular biology, biophysics, and computational science, our aim is to highlight both the conceptual advances and the practical strategies that emerge from a thermodynamic understanding of protein aggregation. Our ultimate goal is to provide a foundation for developing diagnostic tools and effective therapies for protein misfolding diseases, offering routes for addressing the societal burden of these conditions.

The fundamental states of proteins

Although the traditional definition of the different states that proteins can populate has been primarily based on their structures and functions (Alberts et al., 2022), accumulating evidence suggests that these criteria do not completely capture the complex behaviour of these molecules, and that considerations based on thermodynamics and kinetics could lead to more effective definitions (Fuxreiter and Vendruscolo, 2021).

Although the native state may be only thermodynamically metastable, it is usually the most populated one under cellular conditions because of its favourable kinetic accessibility and its separation by high free-energy barriers from the amyloid state (Baldwin et al., 2011; Buell, 2022; Gazit, 2002; Knowles et al., 2014; Meisl, 2024; Tartaglia et al., 2007) (Figure 1). At the structural level, the native state is stabilized predominantly by intra-molecular interactions, with inter-molecular interactions playing important roles for the formation of functional complexes with

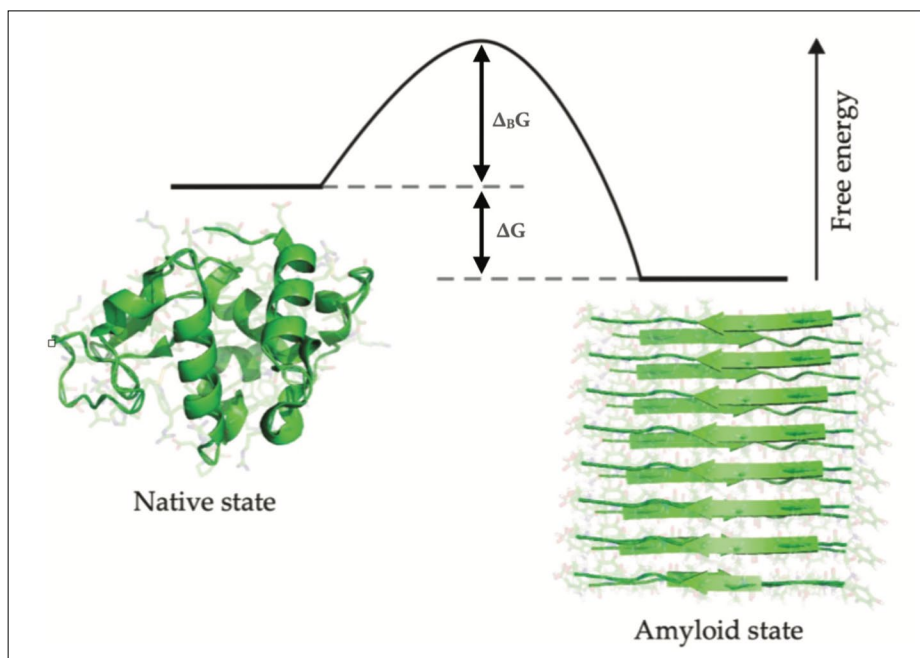


Figure 1 - The thermodynamic hypothesis of protein aggregation. At high concentrations, the amyloid state of proteins is thermodynamically more stable than the native state (Baldwin et al., 2011; Gazit, 2002; Tartaglia et al., 2007). In the cellular environment, under these conditions, the protein homeostasis system maintains a steady state by minimising the occurrence of aggregates (Tartaglia et al., 2007; Vecchi et al., 2020). However, as the native state is metastable, persistent perturbations, such as genetic mutations or age-related impairments of the protein homeostasis system, can eventually lead to aberrant misfolding and aggregation. Thermodynamic approaches to drug discovery are aimed at stabilising the native state by reversing the sign of the free energy difference (ΔG) between the native and amyloid states. Kinetic approaches instead target an increase in the free energy barrier for the conversion between the two states ($\Delta_B G$), thus prolonging the lifetime of the native state. Reprinted with permission from Knowles et al. 2014.

well-defined stoichiometries (Alberts et al., 2022). Native states facilitate these interactions and functions through a spectrum of structural organization, ranging from ordered to disordered regions (Sormanni et al., 2017).

By contrast, the amyloid state is defined by the formation of elongated fibrillar assemblies, featuring a core structure comprised of β -sheets, with strands oriented perpendicular to the fibril axis and stabilized by a network of backbone hydrogen bonds (Eisenberg and Jucker, 2012; Fitzpatrick et al., 2017; Knowles et al., 2007; Knowles et al., 2014; Scheres et al., 2023; Shi et al., 2021; Yang et al., 2022a; Yang et al., 2022b). The high thermodynamic stability of the amyloid state poses challenges for the protein homeostasis system in regulating its formation and persistence. Consequently, while this state can sometimes serve functional roles (Fowler et al., 2007; Knowles and Mezzenga, 2016; Levkovich et al., 2021), its occurrence is frequently linked to disease (Chiti and Dobson, 2017; Cohen and Kelly, 2003; Dobson, 2003; Eisenberg and Jucker, 2012; Hampel et al., 2021; Knowles et al., 2014; Merlini and Bellotti, 2003; Selkoe and Hardy, 2016).

These observations are complemented by a substantial body of evidence that has emerged over the past decade, which suggests that proteins, in addition to their native and amyloid forms, can also adopt a dense, liquid-like state known as the droplet state via a process called protein phase separation (Alberti and Hyman, 2021; Banani et al., 2017; Frottin et al., 2019; Fuxreiter and Vendruscolo, 2021; Hardenberg et al., 2020; Lyon et al., 2021; Michaels et al., 2023; Nakashima et al., 2019; Peeples and Rosen, 2021; Shin and Brangwynne, 2017; Stender et al., 2021; Vendruscolo and Fuxreiter, 2022). The droplet state is a liquid-like condensed state formed by the non-stoichiometric assembly of protein molecules. This state can have a thermodynamic stability comparable to that of the native state, as it can be reversibly generated from the native state through the process of liquid–liquid phase separation, and it may evolve into a solid-like condensed state through a maturation process (Fuxreiter and Vendruscolo, 2021; Mathieu et al., 2020; Michaels et al., 2023; Molliex et al., 2015; Murakami et al., 2015; Visser et al., 2024; Wegmann et al., 2018). The droplet state has high conformational entropy, and it is stabilized by a variety of weak intra-molecular and inter-molecular interactions, from both disordered and ordered protein regions (Fuxreiter and Vendruscolo, 2021; Michaels et al., 2023; Vendruscolo and Fuxreiter, 2023; Wang et al., 2018). The biological activities of protein droplets originate from their disordered binding modes and their ability to form dense assemblies that concentrate cellular components (Alberti and Hyman, 2021; Banani et al., 2017; Frottin et al., 2019; Fuxreiter and Vendruscolo, 2021; Hardenberg et al., 2020; Lyon et al., 2021; Michaels et al., 2023; Nakashima et al., 2019; Peeples and Rosen, 2021; Shin and Brangwynne, 2017; Stender et al., 2021; Vendruscolo and Fuxreiter, 2022).

Since concentration is a key parameter in determining the phase behaviour of proteins, the presence of a dense liquid state could be expected from the observation that proteins are close to their solubility limits (Baldwin et al., 2011; Tartaglia et al., 2007; Vecchi et al., 2020). One of the consequences of the thermodynamic hypothesis of protein aggregation is that proteins in the cellular environment can readily interconvert between the native, droplet and amyloid states (Fuxreiter and Vendruscolo, 2021). In this view, protein liquid-like condensation could be expected to emerge as a widespread phenomenon (Hardenberg et al., 2020).

These observations suggest the presence of a potential alternative route to amyloid aggregation (Han et al., 2012; Patel et al., 2015; Qamar et al., 2018; Ray et al., 2020; Stender et al., 2021) (Figure 2). This route can be termed the condensation pathway, setting it apart from the deposition pathway described above, where amyloid aggregates form directly from the native state (Hardenberg et al., 2021). It has been suggested that this mechanism may be implicated in Parkinson's disease, where the formation of Lewy bodies could potentially occur through either of these pathways (Hardenberg et al., 2021). Similarly, in ALS, the gradual transformation of liquid-like condensates of the proteins FUS and TDP-43 into more solid structures and eventually amyloid aggregates could trigger disease processes (Han et al., 2012; Murakami et al., 2015; Patel et al., 2015; Qamar et al., 2018). These processes could unfold either directly, through the cytotoxic effects of the aggregates themselves, or indirectly, by hindering the breakdown

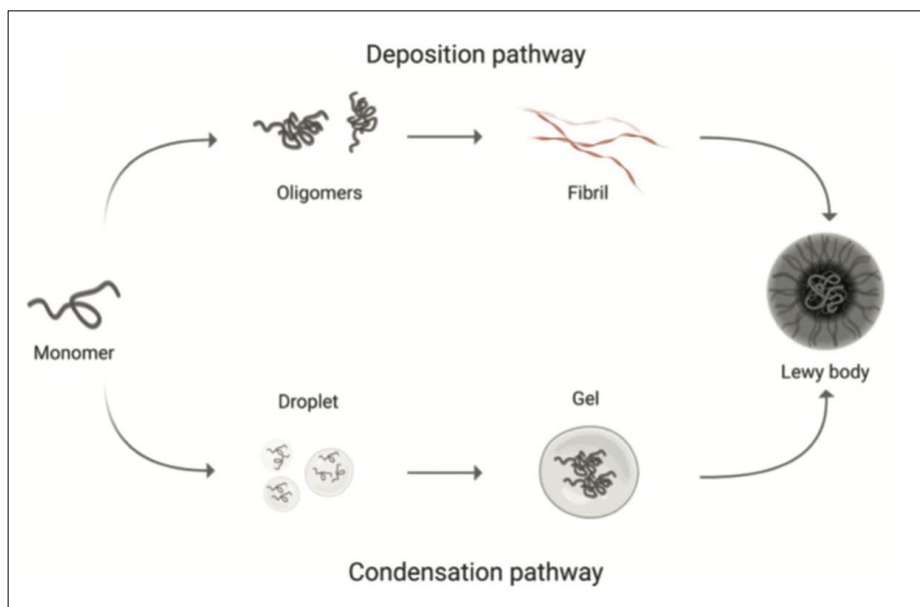


Figure 2 - Deposition and condensation pathways for amyloid aggregation. The amyloid state may form directly from the native state (deposition pathway), or from within an intermediate liquid-like state (condensation pathway) (Hardenberg et al., 2021). In the case of the formation of Lewy bodies by α -synuclein in Parkinson's disease, the kinetic network (Figure 2) appears to be conserved in the two pathways (Dada et al., 2023; Hardenberg et al., 2021). Reprinted with permission from Hardenberg et al. 2021.

of condensates post their physiological roles, thereby disrupting cellular functions (Han et al., 2012; Murakami et al., 2015; Patel et al., 2015; Qamar et al., 2018).

The emergence of deep learning methods in structural biology (Abramson et al., 2024; Jumper et al., 2021; Watson et al., 2023) is providing novel opportunities to understand the structural basis of the phase behaviour of proteins, including those such as FUS and TDP-43 that include both ordered and disordered domains, whose conformational properties should be described in terms of structural ensembles (Brotzakakis et al., 2025; Tesei et al., 2024; von Bülow et al., 2025a; von Bülow et al., 2025b; Zhang et al., 2024).

The thermodynamic hypothesis of protein aggregation

Rather than being a mere coincidence, the common occurrence of protein aggregates suggests that a fundamental driving force is at play to cause their formation. To understand the nature of this driving force, it has been proposed that protein aggregation happens because proteins are expressed at levels close to their supersaturation limits (Tartaglia et al., 2007). Under these conditions, native states are metastable against aggregation (Baldwin et al., 2011; Gazit, 2002; Vecchi et al., 2020) (Figure 1). When this is the case, since the free energy of the aggregated state is lower than that of the native state, aggregation is thermodynamically inevitable. For comparison, Anfinsen's

principle, which concerns the thermodynamic stability of the native state, applies at low concentrations, below the supersaturation limit (Anfinsen, 1973). In this view, native states are populated because after biosynthesis in the ribosome, they are kinetically more accessible than aggregate states through the folding process. However, the free energy barrier preventing their conversion into aggregates can eventually be crossed. Consistently with this expectation, under normal conditions, widespread protein aggregation has been observed (Bourdenx et al., 2021; Chen et al., 2024; Ciryam et al., 2019; Ciryam et al., 2016; Ciryam et al., 2017; Ciryam et al., 2013; David et al., 2010; Freer et al., 2019; Freer et al., 2016; Fu et al., 2019; Györkei et al., 2022; Heller et al., 2020; Huang et al., 2019; Kelmer Sacramento et al., 2020; Leuenberger et al., 2017; Määttä et al., 2020; Olzscha et al., 2011; Reis-Rodrigues et al., 2012; Sui et al., 2020; Wallace et al., 2015; Walther et al., 2015; Zhu et al., 2022b).

The concept of metastability is central to the thermodynamic hypothesis of protein aggregation. As native states may have a borderline thermodynamical stability, their populations can be reduced by even relatively minor perturbations. For instance, genetic mutations might alter the stability of the native state, making a protein more prone to aggregation. Dysregulated post-translational modifications, which naturally accumulate as proteins age, can alter their stability and solubility. Cellular stress caused by factors like infection, inflammation, or exposure to toxins can shift the delicate balance, favoring protein aggregation. These factors, individually or collectively, can push a protein beyond its solubility threshold, initiating the aggregation process.

The protein homeostasis system

The primary function of protein homeostasis system is to maintain a steady state in which protein production, trafficking and degradation are balanced so that a pool of native proteins is always present for optimal cellular function (Balch et al., 2008; Elsasser et al., 2023; Elsasser et al., 2022; Hipp et al., 2019; Labbadia and Morimoto, 2015; Sridharan et al., 2019; Wilson et al., 2023). When this pool is close to its critical concentration, a key activity of protein homeostasis system is to continuously degrade the aggregated proteins that keep forming (Balch et al., 2008; Elsasser et al., 2023; Elsasser et al., 2022; Hipp et al., 2019; Labbadia and Morimoto, 2015; Sridharan et al., 2019; Wilson et al., 2023). However, controlling aggregation only through the balance of synthesis and degradation would result in a fragile system vulnerable to fluctuations. The robustness of the protein homeostasis system is thus established through a range of other processes, which maintain the steady state of the proteome against perturbations. Molecular chaperones are key players as they act against aggregation, in most cases through ATP-dependent processes (Balch et al., 2008; Elsasser et al., 2023; Elsasser et al., 2022; Hipp et al., 2019; Labbadia and Morimoto, 2015; Sridharan et al., 2019; Wilson et al., 2023). This system-level robustness guarantees that the expression levels of individual proteins can be increased several fold without generating aggregation. It is only when persistent large-scale perturbations appear, as those associated with ageing and lifestyles, aggregation escapes control and results in disease.

Possible evolutionary origins of protein supersaturation

It is still unclear why proteins tend to be expressed at levels close to their supersaturation limits, rather than remaining safely well below them. One intriguing, but yet to be proven, possibility is that the solubility of proteins is progressively reduced through neutral evolution (Tartaglia et al., 2007). According to this view, when a protein is highly soluble, there is no evolutionary pressure to eliminate mutations that reduce its solubility, provided that they do not affect its function. In this case, less soluble mutants may not give rise to aggregation. However, this neutral evolutionary drift would eventually stop when the solubility limit is reached. At that point, further reductions in solubility would be selected out to eliminate the burden of aggregation.

This possibility is also compatible with the process leading to the formation of membraneless organelles. These cellular formations can assemble and disassemble rapidly, enabling cells to respond effectively to environmental cues, stress conditions, and changes in metabolic states (Alberti and Hyman, 2021; Banani et al., 2017; Frottin et al., 2019; Fuxreiter and Vendruscolo, 2021; Hardenberg et al., 2020; Lyon et al., 2021; Michaels et al., 2023; Nakashima et al., 2019; Peeples and Rosen, 2021; Shin and Brangwynne, 2017; Stender et al., 2021; Vendruscolo and Fuxreiter, 2022). The ability of membraneless organelles to form and dissolve rapidly suggests that the concentrations of their constituent proteins and biomolecules are finely tuned to be near their phase separation or condensation thresholds (Hardenberg et al., 2020; Vecchi et al., 2020). This delicate balance is critical for ensuring energy-efficient transitions between dispersed and condensed states. For instance, phase separation requires minimal energetic investment compared to constructing membrane-bound organelles, making it an optimal mechanism for transient and reversible cellular functions. The proximity to condensation thresholds also supports a sensitive regulatory mechanism, where small changes in environmental conditions, such as pH, ion concentration, or post-translational modifications, can drive the assembly or disassembly of these structures.

Therapeutic approaches

In the search for therapeutic interventions for conditions related to protein aggregation, major efforts have been devoted on biological strategies aimed on the compensation for the age-related decline of the protein homeostasis system (Aman et al., 2021; Balch et al., 2008; Boland et al., 2018; Cunnane et al., 2020; Marciniak et al., 2022). In parallel, biophysical interventions on the aggregation process have led to the emergence of two distinct methodologies, respectively based on thermodynamic and kinetic principles (Figure 1). The first method, which can be referred to as the thermodynamic approach, revolves around the concept of native state stabilization (Bulawa et al., 2012; Chiti and Kelly, 2022; Heller et al., 2020). Given that the propensity for proteins to aggregate into amyloid structures is determined by the free energy difference between the native and amyloid states, this approach explores the potential of therapeutic agents to stabilise the native state.

The goal is to reverse the thermodynamic driving force towards protein aggregation that is generated by supersaturation. On the other hand, the kinetic approach targets the transition process that underlies aggregation (Habchi et al., 2016; Habchi et al., 2017; Michaels et al., 2018). This strategy focuses on increasing the free energy barrier separating the native and amyloid states. In this approach, while the inherent thermodynamic drive towards aggregation remains unchanged, the time required for the transition becomes significantly longer. This retardation of the process is crucial, as it allows a protein homeostasis system, even one whose efficiency has been compromised due to factors like aging, sufficient time to adapt and effectively counteract the aggregation.

Thermodynamic approaches. The concept of countering protein aggregation through the stabilisation of the native state was pioneered by targeting transthyretin, achieving a milestone in the battle against familial amyloid polyneuropathy and extending its efficacy to both familial and sporadic amyloid cardiomyopathy (Bulawa et al., 2012; Chiti and Kelly, 2022; Miroy et al., 1996). This strategy originated from the analysis of the aggregation pathway of transthyretin, where the initial step is the disassociation of the native homotetramer. The small molecule tafamidis was identified as capable to restore the stability of the native tetrameric structure (Bulawa et al., 2012; Miroy et al., 1996). Inspired by the success of tafamidis, a new class of therapeutic agents, termed pharmacological chaperones, emerged (Chiti and Kelly, 2022; Ringe and Petsko, 2009). These compounds mimic the mechanism of action of tafamidis, offering a clear path towards the stabilization of other proteins prone to aggregation.

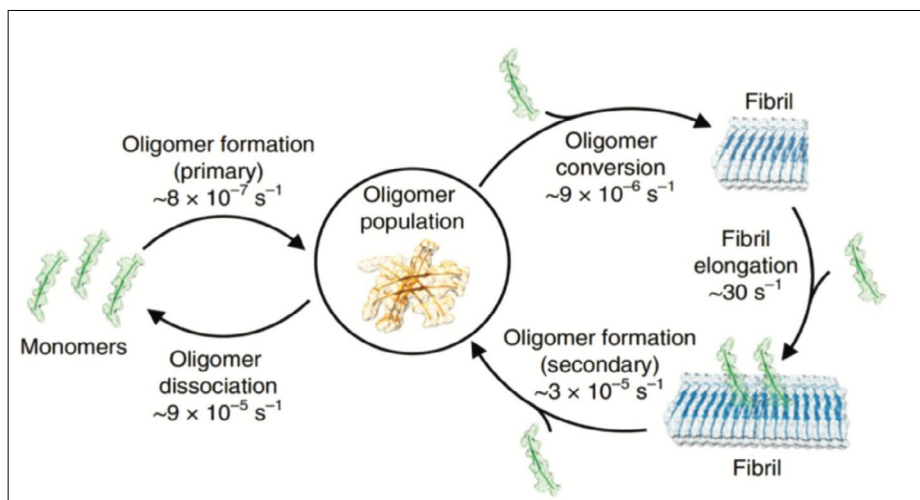


Figure 3 - Kinetics of protein aggregation. The free energy barrier illustrated in Figure 1 is the result of a complex network of microscopic processes, including primary nucleation, oligomer conversion and dissociation, elongation and secondary nucleation. The reaction, and the corresponding reaction rates, are shown here in the case of Aβ42 at a concentration of 5 μM (Michaels et al., 2020). Reprinted with permission from Michaels et al. 2020.

Recent advances suggest the potential expansion of native state stabilization strategies to encompass disordered proteins, a category previously deemed undruggable due to their highly heterogeneous structural characteristics (Biesaga et al., 2021; Follis et al., 2008; Heller et al., 2015; Lohr et al., 2022; Robustelli et al., 2022; Ruan et al., 2019). The implications of this expansion could be profound, considering the vast array of disordered proteins implicated in virtually every major human disease (Heller et al., 2015; Uversky, 2012), representing thousands of new therapeutic targets. The primary challenge lies in the very nature of disordered proteins, which typically lack defined binding pockets, rendering them elusive to forming stable interactions with small molecules. However, this apparent obstacle has not precluded the identification of small molecules capable of binding to such proteins (Ban et al., 2017; Follis et al., 2008; Ruan et al., 2021; Zhu et al., 2022a). A possible mechanism is that these molecules may prompt partial folding in disordered proteins, just enough to create discernible binding pockets (Follis et al., 2008; Toth et al., 2014; Zhu et al., 2013). Yet, it is still unclear whether this interaction mechanism can yield the drug-like affinity and specificity required for therapeutic efficacy. One potential solution to enhance affinity and specificity could be the employment of larger molecules like macrocycles, peptides, or antibodies (Ball et al., 2022; Gallego-Villarejo et al., 2022; Leguizamon Herrera et al., 2022). These larger agents might overcome the limitations faced by small molecules, although they bring other challenges of their own, especially for conditions like brain disorders or diseases characterised by intracellular protein aggregation. In these instances, the ability of small molecules to traverse biological barriers, including the blood-brain barrier and cell membranes, makes them a more favorable option despite the challenges in targeting disordered proteins.

Moving beyond traditional strategies that hinge on the presence of binding pockets, an innovative approach has been put forward based on the idea that the complexes formed between proteins and small molecules remain disordered (Heller et al., 2020; Lohr et al., 2022; Zhang et al., 2023). Such a disordered binding mechanism is not without precedent, as it mirrors the mechanisms observed in protein-protein and protein-nucleic acid interactions (Borgia et al., 2018; Schuler et al., 2020; Sottini et al., 2020). Intriguingly, this mechanism of binding may play a pivotal role in protein phase separation, a process likely to underlie the formation of membraneless organelles (Alberti and Hyman, 2021; Banani et al., 2017; Fuxreiter and Vendruscolo, 2021; Shin and Brangwynne, 2017; Vendruscolo and Fuxreiter, 2022). By exploring this unconventional pathway, new therapeutic avenues may be discovered that overcome the limitations set by traditional protein structure paradigms (Heller et al., 2020; Lohr et al., 2022; Zhang et al., 2023).

Kinetic approaches. Kinetic strategies in combating protein aggregation hinge on the identification of compounds that slow down the conversion between the native and amyloid states. However, a significant obstacle arises from the fact that the simplistic, one-dimensional free energy barrier depicted in Figure 1 does not fully capture the complexity of the aggregation process. The overall rate of aggregation is the result of a combination of multiple microscopic processes, each

with its own rate constants: (i) primary nucleation, where disordered oligomeric intermediates form from individual monomeric reactants, (ii) oligomer conversion, leading to the creation of ordered structures that bear the hallmark cross- β configuration of amyloid fibrils, (iii) elongation, a stage marked by the growth of amyloid fibrils through the continuous addition of monomers, and (iv) secondary nucleation, a process where existing amyloid fibrils act as a catalyst, accelerating the production of new oligomers (Cohen et al., 2013; Michaels et al., 2020) (Figure 3). This complexity underscores the challenge in devising kinetic strategies, as it calls for a nuanced understanding and manipulation of several microscopic steps. The proteins that aggregate play multiple roles in the process: they are the reactants (monomers), the end products (amyloid fibrils), the intermediates (oligomers), as well as the catalysts (surfaces of the amyloid fibrils). It is thus essential to establish the exact microscopic steps primarily responsible for the emergence of cytotoxic forms (Linse et al., 2020; Michaels et al., 2022). The identity of such toxic species is not universal, and it varies depending on the condition. For instance, in amyloid light chain amyloidosis, the amyloid fibrils themselves are the culprits (Falk et al., 2016; Merlini and Bellotti, 2003), whereas in the case of A β involved in Alzheimer's disease the major threat lies in the oligomeric intermediates (Benilova et al., 2012; Fusco et al., 2017; Haass and Selkoe, 2007). However, the complexity does not end there. The kinetic network that drives A β aggregation is non-linear and highly interconnected, complicating predictions on how compounds designed to alter the rate constants of specific microscopic stages might impact oligomer production (Michaels et al., 2022). For example, reducing primary nucleation could delay the onset of oligomer formation, but it might not affect the total number of oligomers eventually produced. Consequently, drugs that inhibit primary nucleation might have a preventative role, rather than a curative one (Habchi et al., 2016).

One of the significant hurdles in this field is decoding how macroscopic observations of amyloid aggregates can provide insights into the actual number of oligomers formed, thereby predicting the potential efficacy of a drug candidate in mitigating oligomer-induced toxicity. A prime example of this challenge is the behavior of compounds that slow down the elongation process. While they succeed in slowing down amyloid fibril formation, they may inadvertently increase the concentration of toxic oligomers during the reaction (Linse et al., 2020; Michaels et al., 2022). This perhaps counterintuitive outcome occurs because amyloid fibrils typically serve as a sink for monomers. When the formation of fibrils is hindered, these monomers divert their path, contributing instead to the oligomer buildup. This complex dynamic might shed light on the recent setbacks faced in clinical trials of gantenerumab, an antibody aimed at targeting A β aggregation (Ostrowitzki et al., 2017). The underperformance of this antibody could be partially attributed to this intricate interplay between fibril and oligomer formation (Linse et al., 2020; Michaels et al., 2022).

In the realm of protein aggregation, particularly with A β and α -synuclein, research indicates that secondary nucleation is the pivotal microscopic process contributing to oligomer production (Buell et al., 2014; Cohen et al., 2013; Michaels et al., 2020). Therefore, compounds that can effectively curb the rate of

secondary nucleation present a promising therapeutic avenue (Chia et al., 2018; Habchi et al., 2017; Horne et al., 2024; Staats et al., 2020). One strategy involves deploying compounds that bind the catalytic sites on the surface of amyloid fibrils. The molecular chaperone BRICHOS offers a proof-of-principle of this approach (Cohen et al., 2015). Notably, aducanumab, the first disease-modifying drug for Alzheimer's disease, exhibits this mechanism of action (Linse et al., 2020) beyond its standard effector function (Sevigny et al., 2016).

Liquid-liquid phase separation. While the process of protein liquid-liquid phase separation presents a wide range of possible therapeutic avenues to explore (Berkeley and Debelouchina, 2022; Mitrea et al., 2022; Vendruscolo and Fuxreiter, 2022), our focus here narrows on strategies specifically aimed at inhibiting the amyloid aggregation process within these liquid-like condensates. Preliminary findings suggest a promising possibility - that the kinetic models initially proposed for understanding and intervening in the deposition pathway might be relevant for the condensation pathway as well (Dada et al., 2023; Dada et al., 2024; Morris et al., 2024; Šneiderienė et al., 2025). This observation implies that the kinetic approach could potentially be adapted to address the challenges posed by the condensation pathway. Moreover, the thermodynamic strategy remains also possible, as by employing small molecules that bind to and stabilize the native state, this approach aims to reduce the populations of both condensed and amyloid states, thereby restoring cellular balance.

Outlook

Given the fundamental nature of protein aggregation in living systems, the concepts that we have discussed may guide future research endeavors for the discovery of the molecular origins of protein misfolding diseases, and for the development of diagnostic and therapeutic strategies based on this understanding.

While a thermodynamic driving force directs proteins towards the formation of condensed states, under normal conditions these populations are in a steady state controlled by the protein homeostasis system for optimal biological function. Based on this insight, it is becoming possible develop therapeutic strategies to combat protein misfolding diseases (Chia et al., 2018; Chiti and Kelly, 2022; Dada et al., 2024; Heller et al., 2020; Horne et al., 2024; Zhang et al., 2023). Explorations of the different branches of the protein homeostasis system may reveal ways to augment cellular defenses against protein misfolding, particularly under stress conditions that predispose proteins to aggregate (Arosio et al., 2016; Balch et al., 2008; Hipp et al., 2019; Knowles et al., 2014; Labbadia and Morimoto, 2015). The integration of computational biology and machine learning is making it possible to analyse vast biological data sets, identifying subtle cellular perturbations that precede aggregation and suggesting potential therapeutic targets with enhanced precision and speed (Lim et al., 2023; Mitrea et al., 2022; Vendruscolo and Fuxreiter, 2022).

The complexity of intracellular environments necessitates approaches that consider not only individual proteins but also their intricate interactions with one

another and with other cellular constituents (Balch et al., 2008; Barabási et al., 2011; Hipp et al., 2019; Huttlin et al., 2017). This complexity is compounded by the heterogeneity observed in neurodegenerative diseases, where genetic, environmental, and lifestyle factors interplay in a convoluted mosaic of causality (De Strooper and Karran, 2016; Hampel et al., 2021; Poewe et al., 2017; Scheltens et al., 2021). Thus, interdisciplinary collaborations become of paramount importance, bringing together insights ranging from molecular biology and neuroscience to biophysics, chemistry and computational science.

In conclusion, we suggest that the thermodynamic hypothesis of protein aggregation offers a conceptual framework for understanding protein misfolding diseases, and for developing a range of possible routes for therapeutic interventions. While formidable challenges lie ahead, the convergence of diverse scientific disciplines is providing use with an increasing ability to decipher the causes of protein aggregation. With each step forward, we edge closer to alleviating the burden of protein misfolding diseases on our society.

References

1. Abramson J, Adler J, Dunger J, Evans R, Green T, Pritzel A, Ronneberger O, Willmore L, Ballard AJ, Bambrick J. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024; 630 (8016): 493-500.
2. Alberti S, Hyman AA. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2021; 22 (3): 196-213.
3. Alberts B, Heald R, Johnson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell: Seventh International Student Edition with Registration Card*. WW Norton & Company. 2022.
4. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat. Aging*. 2021; 1 (8): 634-650.
5. Anfinsen CB. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973; 181 (4096): 223-230.
6. Arosio P, Michaels TC, Linse S, Månsson C, Emanuelsson C, Presto J, Johansson J, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TP. Kinetic analysis reveals the diversity of microscopic mechanisms through which molecular chaperones suppress amyloid formation. *Nat. Comm.* 2016; 7 (1): 10948.
7. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 2008; 319 (5865): 916-919.
8. Baldwin AJ, Knowles TP, Tartaglia GG, Fitzpatrick AW, Devlin GL, Shammas SL, Waudby CA, Mossuto MF, Meehan S, Gras SL. Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; 133 (36): 14160-14163.
9. Ball SR, Adamson JS, Sullivan MA, Zimmermann MR, Lo V, Sanz-Hernandez M, Jiang X, Kwan AH, McKenzie AD, Werry EL. Perphenazine-macrocyclic conjugates rapidly sequester the A β 42 monomer and prevent formation of toxic oligomers and amyloid. *ACS Chem. Neurosci.* 2022; 14 (1): 87-98.

10. Ban D, Iconaru LI, Ramanathan A, Zuo J, Kriwacki RW. A small molecule causes a population shift in the conformational landscape of an intrinsically disordered protein. *J. Am. Chem. Soc.* 2017; 139 (39): 13692-13700.
11. Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017; 18 (5): 285-298.
12. Barabási A-L, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature reviews genetics.* 2011; 12 (1), 56-68.
13. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 2012; 15 (3): 349-357.
14. Berkeley RF, Debelouchina GT. Chemical tools for study and modulation of biomolecular phase transitions. *Chem. Sci.* 2022; 13 (48): 14226-14245.
15. Biesaga M, Frigolé-Vivas M, Salvatella X. Intrinsically disordered proteins and biomolecular condensates as drug targets. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2021; 62: 90-100.
16. Boland B, Yu WH, Corti O, Mollereau B, Henriques A, Bezard E, Pastores GM, Rubinsztein DC, Nixon RA, Duchen MR. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2018; 17 (9): 660-688.
17. Borgia A, Borgia MB, Bugge K, Kissling VM, Heidarsson PO, Fernandes CB, Sottini A, Soranno A, Buholzer KJ, Nettels D. Extreme disorder in an ultra-high-affinity protein complex. *Nature.* 2018; 555 (7694): 61-66.
18. Bourdenx M, Martín-Segura A, Scrivo A, Rodriguez-Navarro JA, Kaushik S, Tasset I, Diaz A, Storm NJ, Xin Q, Juste YR. Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome. *Cell.* 2021; 184 (10): 2696-2714. e2625.
19. Brotzakis ZF, Zhang S, Murtada MH, Vendruscolo M. AlphaFold prediction of structural ensembles of disordered proteins. *Nat. Comm.* 2025; 16 (1): 1632.
20. Buell AK, Galvagnion C, Gaspar R, Sparr E, Vendruscolo M, Knowles T.P., Linse S, Dobson CM. Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111 (21): 7671-7676.
21. Buell AK. Stability matters, too-the thermodynamics of amyloid fibril formation. *Chem. Sci.* 2022; 13 (35): 10177-10192.
22. Bulawa CE, Connelly S, DeVit M, Wang L, Weigel C, Fleming JA, Packman J, Powers ET, Wiseman RL, Foss TR. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109 (24): 9629-9634.
23. Chen YR, Harel I, Singh PP, Ziv I, Moses E, Goshtchevsky U, Machado BE, Brunet A, Jarosz DF. Tissue-specific landscape of protein aggregation and quality control in an aging vertebrate. *Dev. Cell.* 2024; 59 (14): 1892-1911. e1813.
24. Chia S, Habchi J, Michaels TC, Cohen SI, Linse S, Dobson CM, Knowles TP, Vendruscolo M. SAR by kinetics for drug discovery in protein misfolding diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018; 115 (41): 10245-10250.
25. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu. Rev. Biochem.* 2017; 86 (1): 27-68.

26. Chiti F, Kelly JW. Small molecule protein binding to correct cellular folding or stabilize the native state against misfolding and aggregation. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2022; 72: 267-278.
27. Chiti F, Stefani M, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature.* 2003; 424 (6950): 805-808.
28. Ciryam P, Antalek M, Cid F, Tartaglia GG, Dobson CM, Guettches A-K, Eggers B, Vorgerd M, Marcus K, Kley RA. A metastable subproteome underlies inclusion formation in muscle proteinopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* 2019; 7 (1): 1-14.
29. Ciryam P, Kundra R, Freer R, Morimoto RI, Dobson CM, Vendruscolo M. A transcriptional signature of Alzheimer's disease is associated with a metastable subproteome at risk for aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113 (17): 4753-4758.
30. Ciryam P, Kundra R, Morimoto RI, Dobson CM, Vendruscolo M. Supersaturation is a major driving force for protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 2015; 36 (2): 72-77.
31. Ciryam P, Lambert-Smith IA, Bean DM, Freer R, Cid F, Tartaglia GG, Saunders DN, Wilson MR, Oliver SG, Morimoto RI. Spinal motor neuron protein supersaturation patterns are associated with inclusion body formation in ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017; 114 (20): E3935-E3943.
32. Ciryam P, Tartaglia GG, Morimoto RI, Dobson CM, Vendruscolo M. Widespread aggregation and neurodegenerative diseases are associated with supersaturated proteins. *Cell Rep.* 2013; 5 (3): 781-790.
33. Cohen FE, Kelly JW. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature.* 2003; 426 (6968): 905-909.
34. Cohen SI, Arosio P, Presto J, Kurudenkandy FR, Biverstål H, Dolfe L, Dunning C, Yang X, Frohm B, Vendruscolo M. A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A β oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015; 22 (3): 207-213.
35. Cohen SI, Linse S, Luheshi LM, Hellstrand E, White DA, Rajah L, Otzen DE, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TP. Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110 (24): 9758-9763.
36. Cunnane SC, Trushina E, Morland C, Prigione A, Casadesus G, Andrews ZB, Beal MF, Bergersen LH, Brinton RD, de la Monte S. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; 19 (9): 609-633.
37. Dada ST, Hardenberg MC, Toprakcioglu Z, Mrugalla LK, Cali MP, McKeon MO, Klimont E, Michaels TC, Knowles TP, Vendruscolo M. Spontaneous nucleation and fast aggregate-dependent proliferation of α -synuclein aggregates within liquid condensates at neutral pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2023; 120 (9): e2208792120.
38. Dada ST, Toprakcioglu Z, Cali MP, Röntgen A, Hardenberg MC, Morris OM, Mrugalla LK, Knowles TP, Vendruscolo M. Pharmacological inhibition of

- α -synuclein aggregation within liquid condensates. *Nat. Comm.* 2024; 15 (1): 3835.
39. David DC, Ollikainen N, Trinidad JC, Cary MP, Burlingame AL, Kenyon C. Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol.* 2010; 8 (8): e1000450.
 40. De Strooper B, Karran E. The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell.* 2016; 164 (4): 603-615.
 41. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature.* 2003; 426 (6968): 884-890.
 42. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell.* 2012; 148 (6): 1188-1203.
 43. Elsasser S, Elia LP, Morimoto RI, Powers ET, Finley D, Costa B, Budron M, Tokuno Z, Wang S, Iyer RG. A Comprehensive Enumeration of the Human Proteostasis Network. 2. Components of the Autophagy-Lysosome Pathway. *bioRxiv.* 2023; 2023.2003.2022.533675
 44. Elsasser S, Finley D, Mockler E, Lima L, Finkbeiner S, Gestwicki JE, Stoeger TE, Cao K, Garza D. A comprehensive enumeration of the human proteostasis network. 1. Components of translation, protein folding, and organelle-specific systems. *bioRxiv.* 2022; 2022.2008.2030.505920.
 45. Falk RH, Alexander KM, Liao R, Dorbala S. AL (light-chain) cardiac amyloidosis: a review of diagnosis and therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016; 68 (12): 1323-1341.
 46. Fernandez-Escamilla A-M, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat. Biotech.* 2004; 22 (10): 1302-1306.
 47. Fitzpatrick AW, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, Crowther RA, Ghetti B, Goedert M, Scheres SH. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature.* 2017; 547 (7662): 185-190.
 48. Follis AV, Hammoudeh DI, Wang H, Prochownik EV, Metallo SJ. Structural rationale for the coupled binding and unfolding of the c-Myc oncoprotein by small molecules. *Chem. Biol.* 2008; 15 (11): 1149-1155.
 49. Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid—from bacteria to humans. *Trends Bioch. Sci.* 2007; 32 (5): 217-224.
 50. Freer R, Sormanni P, Ciryam P, Rammner B, Rizzoli SO, Dobson CM, Vendruscolo M. Supersaturated proteins are enriched at synapses and underlie cell and tissue vulnerability in Alzheimer's disease. *Heliyon.* 2019; 5 (11).
 51. Freer R, Sormanni P, Vecchi G, Ciryam P, Dobson CM, Vendruscolo M. A protein homeostasis signature in healthy brains recapitulates tissue vulnerability to Alzheimer's disease. *Sci. Adv.* 2016; 2 (8): e1600947.
 52. Frottin F, Schueder F, Tiwary S, Gupta R, Körner R, Schlichthaerle T, Cox J, Jungmann R, Hartl F, Hipp M. The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment. *Science.* 2019; 365 (6451): 342-347.
 53. Fu H, Possenti A, Freer R, Nakano Y, Hernandez Villegas NC, Tang M, Cauhy PV, Lassus BA, Chen S, Fowler SL. A tau homeostasis signature is linked with the cellular and regional vulnerability of excitatory neurons to tau pathology. *Nat. Neurosci.* 2019; 22 (1): 47-56.

54. Fusco G, Chen SW, Williamson PT, Cascella R, Perni M, Jarvis JA, Cecchi C, Vendruscolo M, Chiti F, Cremades N. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science*. 2017; 358 (6369): 1440-1443.
55. Fuxreiter M, Vendruscolo M. Generic nature of the condensed states of proteins. *Nat. Cell Biol.* 2021; 23 (6): 587-594.
56. Gallego-Villarejo L, Wallin C, Król S, Enrich-Bengoia J, Suades A, Aguilera-Arzo M, Gomara MJ, Haro I, Wärmlander S, Muñoz FJ. Big dynorphin is a neuroprotector scaffold against amyloid β -peptide aggregation and cell toxicity. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022; 20: 5672-5679.
57. Gazit E. The “correctly folded” state of proteins: is it a metastable state? *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002; 41 (2): 257-259.
58. Györkei Á, Daruka L, Balogh D, Ősz E, Magyar Z, Szappanos B, Fekete G, Fuxreiter M, Horváth P, Pál C. Proteome-wide landscape of solubility limits in a bacterial cell. *Sci. Rep.* 2022; 12 (1): 6547.
59. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer’s amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8 (2): 101-112.
60. Habchi J, Arosio P, Perni M, Costa AR, Yagi-Utsumi M, Joshi P, Chia S, Cohen SI, Müller MB, Linse S. An anticancer drug suppresses the primary nucleation reaction that initiates the production of the toxic A β 42 aggregates linked with Alzheimer’s disease. *Sci. Adv.* 2016; 2 (2): e1501244.
61. Habchi J, Chia S, Limbocker R, Mannini B, Ahn M, Perni M, Hansson O, Arosio P, Kumita JR, Challa PK. Systematic development of small molecules to inhibit specific microscopic steps of A β 42 aggregation in Alzheimer’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017; 114 (2): E200-E208.
62. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, Villemagne VL, Aisen P, Vendruscolo M, Iwatsubo T. The amyloid- β pathway in Alzheimer’s disease. *Mol. Psychiatry.* 2021; 26 (10): 5481-5503.
63. Han TW, Kato M, Xie S, Wu LC, Mirzaei H, Pei J, Chen M, Xie Y, Allen J, Xiao G. Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell.* 2012; 149 (4): 768-779.
64. Hardenberg M, Horvath A, Ambrus V, Fuxreiter M, Vendruscolo M. Widespread occurrence of the droplet state of proteins in the human proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117 (52): 33254-33262.
65. Hardenberg MC, Sinnige T, Casford S, Dada ST, Poudel C, Robinson EA, Fuxreiter M, Kaminski CF, Kaminski Schierle GS, Nollen EA. Observation of an α -synuclein liquid droplet state and its maturation into Lewy body-like assemblies. *J. Mol. Cell Biol.* 2021; 13 (4): 282-294.
66. Heller GT, Aprile FA, Michaels TC, Limbocker R, Perni M, Ruggeri FS, Mannini B, Löhr T, Bonomi M, Camilloni C. Small-molecule sequestration of amyloid- β as a drug discovery strategy for Alzheimer’s disease. *Sci. Adv.* 2020; 6 (45): eabb5924.
67. Heller GT, Sormanni P, Vendruscolo M. Targeting disordered proteins with small molecules using entropy. *Trends Bioch. Sci.* 2015; 40 (9): 491-496.

68. Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20 (7): 421-435.
69. Horne RI, Andrzejewska EA, Alam P, Brotzakis ZF, Srivastava A, Aubert A, Nowinska M, Gregory RC, Staats R, Possenti A. Discovery of potent inhibitors of α -synuclein aggregation using structure-based iterative learning. *Nat. Chem. Biol.* 2024; 20 (5): 634-645.
70. Huang C, Wagner-Valladolid S, Stephens AD, Jung R, Poudel C, Sinnige T, Lechler MC, Schlörit N, Lu M, Laine RF. Intrinsically aggregation-prone proteins form amyloid-like aggregates and contribute to tissue aging in *Caenorhabditis elegans*. *eLife.* 2019; 8: e43059.
71. Huttlin EL, Bruckner RJ, Paulo JA, Cannon JR, Ting L, Baltier K, Colby G, Gebreab F, Gygi MP, Parzen H. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature.* 2017; 545 (7655): 505-509.
72. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *nature.* 2021; 596 (7873): 583-589.
73. Kelmer Sacramento E, Kirkpatrick JM, Mazzetto M, Baumgart M, Bartolome A, Di Sanzo S, Caterino C, Sanguanini M, Papaevgeniou N, Lefaki M. Reduced proteasome activity in the aging brain results in ribosome stoichiometry loss and aggregation. *Mol. Sys. Biol.* 2020; 16 (6): e9596.
74. Knowles TP, Fitzpatrick AW, Meehan S, Mott HR, Vendruscolo M, Dobson CM, Welland ME. Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science.* 2007; 318 (5858): 1900-1903.
75. Knowles TP, Mezzenga R. Amyloid fibrils as building blocks for natural and artificial functional materials. *Adv. Mater.* 2016; 28 (31): 6546-6561.
76. Knowles TP, Vendruscolo M, Dobson CM. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15 (6): 384-396.
77. Labbadia J, Morimoto RI. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2015; 84 (1): 435-464.
78. Leguizamon Herrera VL, Buell AK, Willbold D, Barz B. Interaction of therapeutic d-peptides with $a\beta$ 42 monomers, thermodynamics, and binding analysis. *ACS Chem. Neurosci.* 2022; 13 (11): 1638-1650.
79. Leuenberger P, Gansch S, Kahraman A, Cappelletti V, Boersema PJ, von Mering C, Claassen M, Picotti P. Cell-wide analysis of protein thermal unfolding reveals determinants of thermostability. *Science.* 2017; 355 (6327): eaai7825.
80. Levkovich SA, Gazit E, Bar-Yosef DL. Two decades of studying functional amyloids in microorganisms. *Trends Microbiol.* 2021; 29 (3): 251-265.
81. Lim CM, González Díaz A, Fuxreiter M, Pun FW, Zhavoronkov A, Vendruscolo M. Multiomic prediction of therapeutic targets for human diseases associated with protein phase separation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2023; 120 (40), e2300215120.
82. Linse S, Scheidt T, Bernfur K, Vendruscolo M, Dobson CM, Cohen SI, Sileikis E, Lundqvist M, Qian F, O'Malley T. Kinetic fingerprints differentiate the mechanisms of action of anti-A β antibodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020; 27 (12): 1125-1133.

83. Lohr T, Kohlhoff K, Heller GT, Camilloni C, Vendruscolo M. A small molecule stabilizes the disordered native state of the Alzheimer's A β peptide. *ACS Chem. Neurosci.* 2022; 13 (12): 1738-1745.
84. Lyon AS, Peeples WB, Rosen MK. A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2021; 22 (3): 215-235.
85. Määttä TA, Rettel M, Sridharan S, Helm D, Kurzawa N, Stein F, Savitski MM. Aggregation and disaggregation features of the human proteome. *Mol. Sys. Biol.* 2020; 16 (10): e9500.
86. Marciniak SJ, Chambers JE, Ron D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022; 21 (2): 115-140.
87. Mathieu C, Pappu RV, Taylor JP. Beyond aggregation: Pathological phase transitions in neurodegenerative disease. *Science.* 2020; 370 (6512): 56-60.
88. Meisl G. The thermodynamics of neurodegenerative disease. *Biophys. Rev.* 2024; 5 (1).
89. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349 (6): 583-596.
90. Michaels TC, Dear AJ, Cohen SI, Vendruscolo M, Knowles TP. Kinetic profiling of therapeutic strategies for inhibiting the formation of amyloid oligomers. *J. Chem. Phys.* 2022; 156 (16).
91. Michaels TC, Qian D, Šarić A, Vendruscolo M, Linse S, Knowles TP. Amyloid formation as a protein phase transition. *Nat. Rev. Phys.* 2023; 5 (7): 379-397.
92. Michaels TC, Šarić A, Curk S, Bernfur K, Arosio P, Meisl G, Dear AJ, Cohen SI, Dobson CM, Vendruscolo M. Dynamics of oligomer populations formed during the aggregation of Alzheimer's A β 42 peptide. *Nat. Chem.* 2020; 12 (5): 445-451.
93. Michaels TC, Šarić A, Habchi J, Chia S, Meisl G, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TP. Chemical kinetics for bridging molecular mechanisms and macroscopic measurements of amyloid fibril formation. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2018; 69, 273-298.
94. Miroy GJ, Lai Z, Lashuel HA, Peterson SA, Strang C, Kelly JW. Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93 (26): 15051-15056.
95. Mitrea DM, Mittasch M, Gomes BF, Klein IA, Murcko MA. Modulating biomolecular condensates: a novel approach to drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022; 21 (11): 841-862.
96. Molliex A, Temirov J, Lee J, Coughlin M, Kanagaraj AP, Kim HJ, Mittag T, Taylor JP. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell.* 2015; 163 (1): 123-133.
97. Morris OM, Toprakcioglu Z, Röntgen A, Cali M, Knowles TP, Vendruscolo M. Aggregation of the amyloid- β peptide (A β 40) within condensates generated through liquid-liquid phase separation. *Sci. Rep.* 2024; 14 (1): 22633.
98. Murakami T, Qamar S, Lin JQ, Schierle GSK, Rees E, Miyashita A, Costa AR, Dodd RB, Chan FT, Michel CH. ALS/FTD mutation-induced phase transition of FUS liquid droplets and reversible hydrogels into irreversible hydrogels impairs RNP granule function. *Neuron.* 2015; 88 (4): 678-690.

99. Nakashima KK, Vibhute MA, Spruijt E. Biomolecular chemistry in liquid phase separated compartments. *Front. mol. biosci.* 2019; 6: 21.
100. Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, Pinkert S, Hecht MH, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Hayer-Hartl M, Hartl FU, Vabulas RM. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell.* 2011; 144 (1): 67-78.
101. Ostrowitzki S, Lasser RA, Dorflinger E, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T, Ashford E, Retout S, Hofmann C, Delmar P. A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 2017; 9 (1): 1-15.
102. Patel A, Lee HO, Jawerth L, Maharana S, Jahnel M, Hein MY, Stoyanov S, Mahamid J, Saha S, Franzmann TM. A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell.* 2015; 162 (5): 1066-1077.
103. Peebles W, Rosen MK. Mechanistic dissection of increased enzymatic rate in a phase-separated compartment. *Nat. Chem. Biol.* 2021; 17 (6): 693-702.
104. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag A-E, Lang AE. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017; 3 (1): 1-21.
105. Qamar S, Wang G, Randle SJ, Ruggeri FS, Varela JA, Lin JQ, Phillips EC, Miyashita A, Williams D, Ströhl F. FUS phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation- π interactions. *Cell.* 2018; 173 (3): 720-734. e715.
106. Ray S, Singh N, Kumar R, Patel K, Pandey S, Datta D, Mahato J, Panigrahi R, Navalkar A, Mehra S. α -Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation. *Nat. Chem.* 2020; 12 (8): 705-716.
107. Reis-Rodrigues P, Czerwieniec G, Peters TW, Evani US, Alavez S, Gaman EA, Vantipalli M, Mooney SD, Gibson BW, Lithgow GJ. Proteomic analysis of age-dependent changes in protein solubility identifies genes that modulate lifespan. *Aging cell.* 2012; 11 (1): 120-127.
108. Ringe D, Petsko GA. Q&A: What are pharmacological chaperones and why are they interesting? *J. Biol.* 2009; 8 (9): 1-4.
109. Robustelli P, Ibanez-de-Opakua A, Campbell-Bezatz C, Giordanetto F, Becker S, Zweckstetter M, Pan AC, Shaw DE. Molecular basis of small-molecule binding to α -synuclein. *J. Am. Chem. Soc.* 2022; 144 (6): 2501-2510.
110. Ruan H, Sun Q, Zhang W, Liu Y, Lai L. Targeting intrinsically disordered proteins at the edge of chaos. *Drug Discov. Today.* 2019; 24 (1): 217-227.
111. Ruan H, Yu C, Niu X, Zhang W, Liu H, Chen L, Xiong R, Sun Q, Jin C, Liu Y. Computational strategy for intrinsically disordered protein ligand design leads to the discovery of p53 transactivation domain I binding compounds that activate the p53 pathway. *Chem. Sci.* 2021; 12 (8): 3004-3016.
112. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Ch  telat G, Teunissen CE, Cummings J, van der Flier WM. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2021; 397 (10284): 1577-1590.
113. Scheres SH, Ryskeldi-Falcon B, Goedert M. Molecular pathology of neurodegenerative diseases by cryo-EM of amyloids. *Nature.* 2023; 621 (7980): 701-710.

114. Schuler B, Borgia A, Borgia MB, Heidarsson PO, Holmstrom ED, Nettels D, Sottini A. Binding without folding—the biomolecular function of disordered polyelectrolyte complexes. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2020; 60: 66-76.
115. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 2016; 8 (6): 595-608.
116. Sevigny J, Chiao P, Bussi re T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2016; 537 (7618): 50-56.
117. Shi Y, Zhang W, Yang Y, Murzin AG, Falcon B, Kotecha A, van Beers M, Tarutani A, Kametani F, Garringer HJ. Structure-based classification of tauopathies. *Nature.* 2021; 598 (7880): 359-363.
118. Shin Y, Brangwynne CP. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science.* 2017; 357 (6357): eaaf4382.
119. Šneiderien  G, Gonz lez D az A, Adhikari SD, Wei J, Michaels T, Šneideris T, Linse S, Vendruscolo M, Garai K, Knowles TP. Lipid-induced condensate formation from the Alzheimer's A β peptide triggers amyloid aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2025; 122 (4): e2401307122.
120. Sormanni P, Piovesan D, Heller GT, Bonomi M, Kukic P, Camilloni C, Fuxreiter M, Dosztanyi Z, Pappu RV, Babu MM. Simultaneous quantification of protein order and disorder. *Nat. Chem. Biol.* 2017; 13 (4): 339-342.
121. Sottini A, Borgia A, Borgia MB, Bugge K, Nettels D, Chowdhury A, Heidarsson PO, Zosel F, Best RB, Kragelund BB. Polyelectrolyte interactions enable rapid association and dissociation in high-affinity disordered protein complexes. *Nat. Comm.* 2020; 11 (1): 5736.
122. Sridharan S, Kurzawa N, Werner T, G nthner I, Helm D, Huber W, Bantscheff M, Savitski MM. Proteome-wide solubility and thermal stability profiling reveals distinct regulatory roles for ATP. *Nat. Comm.* 2019; 10 (1): 1155.
123. Staats R, Michaels TC, Flagmeier P, Chia S, Horne RI, Habchi J, Linse S, Knowles TP, Dobson CM, Vendruscolo M. Screening of small molecules using the inhibition of oligomer formation in α -synuclein aggregation as a selection parameter. *Comm. Chem.* 2020; 3 (1): 191.
124. Stender EG, Ray S, Norrild RK, Larsen JA, Petersen D, Farzadfard A, Galvagnion C, Jensen H, Buell AK. Capillary flow experiments for thermodynamic and kinetic characterization of protein liquid-liquid phase separation. *Nat. Comm.* 2021; 12 (1): 7289.
125. Sui X, Pires DE, Ormsby AR, Cox D, Nie S, Vecchi G, Vendruscolo M, Ascher DB, Reid GE, Hatters DM. Widespread remodeling of proteome solubility in response to different protein homeostasis stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117 (5): 2422-2431.
126. Tartaglia GG, Pechmann S, Dobson CM, Vendruscolo M. Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. *Trends Bioch. Sci.* 2007; 32 (5): 204-206.
127. Tartaglia GG, Vendruscolo M. The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chem. Soc. Rev.* 2008; 37 (7): 1395-1401.
128. Tesei G, Trolle AI, Jonsson N, Betz J, Knudsen FE, Pesce F, Johansson KE,

- Lindorff-Larsen K. Conformational ensembles of the human intrinsically disordered proteome. *Nature*. 2024; 626 (8000): 897-904.
129. Toth G, Gardai SJ, Zago W, Bertoncini CW, Cremades N, Roy SL, Tambe MA, Rochet J-C, Galvagnion C, Skibinski G. Targeting the intrinsically disordered structural ensemble of α -synuclein by small molecules as a potential therapeutic strategy for Parkinson's disease. *PLoS One*. 2014; 9 (2): e87133.
 130. Uversky VN. Intrinsically disordered proteins and novel strategies for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2012; 7 (6): 475-488.
 131. Vecchi G, Sormanni P, Mannini B, Vandelli A, Tartaglia GG, Dobson CM, Hartl FU, Vendruscolo M. Proteome-wide observation of the phenomenon of life on the edge of solubility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117 (2): 1015-1020.
 132. Vendruscolo M, Fuxreiter M. Protein condensation diseases: therapeutic opportunities. *Nat. Comm.* 2022; 13 (1): 5550.
 133. Vendruscolo M, Fuxreiter M. Towards sequence-based principles for protein phase separation predictions. *Curr. Op. Chem. Biol.* 2023; 75: 102317.
 134. Visser BS, Lipiński WP, Spruijt E. The role of biomolecular condensates in protein aggregation. *Nat. Rev. Chem.* 2024; 8 (9): 686-700.
 135. von Bülow S, Tesei G, Lindorff-Larsen K. Machine learning methods to study sequence–ensemble–function relationships in disordered proteins. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2025a; 92: 103028.
 136. von Bülow S, Tesei G, Zaidi FK, Mittag T, Lindorff-Larsen K. Prediction of phase-separation propensities of disordered proteins from sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2025b; 122 (13): e2417920122.
 137. Wallace EW, Kear-Scott JL, Pilipenko EV, Schwartz MH, Laskowski PR, Rojek AE, Katanski CD, Riback JA, Dion MF, Franks AM. Reversible, specific, active aggregates of endogenous proteins assemble upon heat stress. *Cell*. 2015; 162 (6): 1286-1298.
 138. Walther DM, Kasturi P, Zheng M, Pinkert S, Vecchi G, Ciryam P, Morimoto RI, Dobson CM, Vendruscolo M, Mann M. Widespread proteome remodeling and aggregation in aging *C. elegans*. *Cell*. 2015; 161 (4): 919-932.
 139. Wang J, Choi J-M, Holehouse AS, Lee HO, Zhang X, Jahnel M, Maharana S, Lemaitre R, Pozniakovsky A, Drechsel D. A molecular grammar governing the driving forces for phase separation of prion-like RNA binding proteins. *Cell*. 2018; 174 (3): 688-699. e616.
 140. Watson JL, Juergens D, Bennett NR, Trippe BL, Yim J, Eisenach HE, Ahern W, Borst AJ, Ragotte RJ, Milles LF. De novo design of protein structure and function with RFdiffusion. *Nature*. 2023; 620 (7976): 1089-1100.
 141. Wegmann S, Eftekharzadeh B, Tepper K, Zoltowska KM, Bennett RE, Dujardin S, Laskowski PR, MacKenzie D, Kamath T, Commins C. Tau protein liquid–liquid phase separation can initiate tau aggregation. *EMBO J.* 2018; 37 (7): e98049.
 142. Wilson MR, Satapathy S, Vendruscolo M. Extracellular protein homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 2023; 19 (4): 235-245.
 143. Yang Y, Arseni D, Zhang W, Huang M, Lövestam S, Schweighauser M, Kote-

- cha A, Murzin AG, Peak-Chew SY, Macdonald J. Cryo-EM structures of amyloid- β 42 filaments from human brains. *Science*. 2022a; 375 (6577): 167-172.
144. Yang Y, Shi Y, Schweighauser M, Zhang X, Kotecha A, Murzin AG, Garringer HJ, Cullinane PW, Saito Y, Foroud T. Structures of α -synuclein filaments from human brains with Lewy pathology. *Nature*. 2022b; 610 (7933): 791-795.
145. Zhang S, Huo D, Horne RI, Qi Y, Ojeda SP, Yan A, Vendruscolo M. Sequence-based drug design using transformers. *bioRxiv*. 2023; 2023.2011.2027.568880.
146. Zhang S, Lim CM, Occhetta M, Vendruscolo M. AlphaFold2-based prediction of the co-condensation propensity of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2024; 121 (34): e2315005121.
147. Zhu J, Salvatella X, Robustelli P. Small molecules targeting the disordered transactivation domain of the androgen receptor induce the formation of collapsed helical states. *Nat. Comm*. 2022a; 13 (1): 6390.
148. Zhu M, De Simone A, Schenk D, Toth G, Dobson CM, Vendruscolo M. Identification of small-molecule binding pockets in the soluble monomeric form of the A β 42 peptide. *J. Chem. Phys*. 2013; 139 (3).
149. Zhu M, Kuechler ER, Wong RW, Calabrese G, Sitarik IM, Rana V, Stoykov N, O'Brien EP, Gsponer J, Mayor T. Pulse labeling reveals the tail end of protein folding by proteome profiling. *Cell Rep*. 2022b; 40 (3).