UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

Integrazione degli orologi epigenetici in una coorte di pazienti anziani con multimorbidità: valutazione del rischio di morte a 10 anni

Integration of Epigenetic Clocks in a Cohort of Older Patients with Multimorbidity: Assessment of 10-Year Mortality Risk

Candidato: Manuel Pupilli

Relatore: Rippo Maria Rita

Anno accademico 2025-2026

INDICE

INDICE DELLE TABELLE 4

INDICE DELLE FIGURE 5

RINGRAZIAMENTI 7

1 INTRODUZIONE 8

1.1 La Multimorbidità 8

1.2 Epigenetica 9

1.3 Gli Orologi Epigenetici 11

1.4 Calcolo Dell'età Epigenetica 12

1.5 Concetto Di Age Acceleration 13

1.6 Age Acceleration Residuals (AAR) 14

1.7 Varianti Di Age Acceleration 14

1.8 Caratteristiche Generali Dei Principali Orologi Epigenetici 15

2 SCOPO DELLA TESI 18

3 MATERIALI E METODI 19

3.1 Popolazione Dello Studio 19

3.2 Raccolta E Identificazione Dei Campioni Biologici 22

3.3 Isolamento del Dna da sangue intero 23

3.4 Quantificazione E Valutazione Della Purezza Del Dna 26

3.5 Preparazione Delle Aliquote E Conversione Con Bisolfito 27

3.6 Analisi Della Metilazione Mediante Array EPIC v1.0 28

3.7 Pre-Processing E Controllo Qualità Dei Dati 30

3.8 Normalizzazione Dei Dati 31

3.9 Valutazione Degli Effetti Di Batch 31

3.10 Composizione Cellulare Del Campione Studiato 32

3.11 Calcolo Degli Orologi Epigenetici E Standardizzazione 32
3.12 Pattern Di Multimorbidità 33
3.13 Analisi Statistica 34
4 RISULTATI 38
4.1 Idoneità Dei Campioni Di Dna 38
4.2 Valutazione Della Qualità Del Saggio EPIC v1.0 38
4.3 Valutazione Degli Effetti Di Batch 39
4.4 Relazione Tra Orologi Epigenetici Ed Età Cronologica 40
4.5 Confronto Degli AAR Tra Pazienti Vivi E Deceduti 42
4.6 Analisi Di Sopravvivenza Kaplan–Meier 43
4.7 Associazione Tra Orologi Epigenetici E Mortalità: Regressione Di Cox 44
4.8 Contributo Degli Orologi Alla Discriminazione Del Rischio 47
5 DISCUSSIONE 49
5.1 Significato Dei Risultati Nella Popolazione Studiata 49
5.2 Differenze Tra Gli Orologi Epigenetici 49
5.3 Contributo Aggiuntivo E Possibili Implicazioni 50
5.4 Ruolo Delle Condizioni Cliniche E Limiti Dello Studio 50
5.5 Rilevanza Delle Procedure Di Laboratorio 51
CONCLUSIONI 52
RIFERIMENTI 53
SITOGRAFIA 57
APPENDICE A 58

INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1.1 CARATTERISTICHE DEGLI OROLOGI EPIGENETICI INCLUSI NELLO STUDIO. SINTESI BASATA SULLE PUBBLICAZIONI ORIGINALI (9), (12–16), (17). LA CLASSIFICAZIONE IN GENERAZIONI DESCRIVE GLI OBIETTIVI DI SVILUPPO E NON STABILISCE UNA GRADUATORIA DI EFFICACIA CLINICA 17

TABELLA 3.1 CARATTERISTICHE DELLA COORTE E PATOLOGIE UTILIZZATE PER L'ANALISI DELLE CLASSI LATENTI. I VALORI SONO ESPRESSI COME MEDIA ± DEVIAZIONE STANDARD (DS) PER LE VARIABILI CONTINUE, OPPURE NUMERO E PERCENTUALE PER LE VARIABILI CATEGORICHE. LE 24 PATOLOGIE SONO STATE DEFINITE MEDIANTE CODICI ICD-10 DI DIMISSIONE E/O CRITERI FARMACOLOGICI AL RICOVERO INDICE. BPCO: BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA..... 21

TABELLA 4.1 INDICATORI CON DIFFERENZE SIGNIFICATIVE NEL CONFRONTO DESCRITTIVO TRA VIVI (N = 56) E DECEDUTI (N = 232). I P-VALUE DERIVANO DAL TEST DI MANN–WHITNEY E NON TENGONO CONTO DELLA DIVERSA DURATA DEL FOLLOW-UP. LA TABELLA COMPLETA DEGLI INDICATORI (TABELLA A.1) È IN APPENDICE A..... 42

TABELLA 4.2 HAZARD RATIO (HR) E INTERVALLI DI CONFIDENZA AL 95% DEI TRE OROLOGI ASSOCIATI SIGNIFICATIVAMENTE ALLA MORTALITÀ NEI MODELLI PRINCIPALI. GLI HR SONO RIFERITI ALL'AUMENTO DI UNA DEVIAZIONE STANDARD DELL'OROLOGIO. UN HR SUPERIORE A 1 INDICA UN'ASSOCIAZIONE CON UN RISCHIO ISTANTANEO DI DECESSO PIÙ ELEVATO; NON DIMOSTRA CAUSALITÀ. LE STIME COMPLETE DEGLI ALTRI OROLOGI (TABELLA A.2) SONO IN APPENDICE A. 46

TABELLA 4.3 SINTESI DELLE AUC A 10 ANNI. IL MODELLO CLINICO COMPRENDE ETÀ, SESSO, DUE COMPONENTI DELLA COMPOSIZIONE LEUCOCITARIA E CLASSE DI MULTIMORBIDITÀ. LE AUC SONO STIME APPARENTI; IL RISULTATO DI DUNEDINPACE È SUPPORTATO ANCHE DOPO CORREZIONE FDR (Q = 0,028). 47

TABELLA A.1 OUTPUT GREZZI DEGLI OROLOGI E AAR RICALCOLATI NELLA COORTE, PER STATO VITALE ALL'ULTIMA OSSERVAZIONE. 58

TABELLA A.2 HR PER INCREMENTO DI UNA DS DELL'INDICATORE EPIGENETICO NELLE COX AGGIUSTATE. 59

INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 1.1 DISTRIBUZIONE DEL NUMERO DI PATOLOGIE CRONICHE TRA 70 E 100 ANNI, STRATIFICATA PER SESSO, NELLE COORTI SVEDESI NATE NEL 1920–1922. FONTE: ZHANG ET AL. (2). 8

FIGURA 1.2 STATI DELLA CROMATINA ASSOCIATI ALLE ISOLE CPG: CONFIGURAZIONE PERMISSIVA ALLA TRASCRIZIONE, REPRESSIONE ASSOCIATA ALLA METILAZIONE DEL DNA E REPRESSIONE MEDIATA DA POLYCOMB. FONTE: DEATON E BIRD (4). 10

FIGURA 1.3. RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DELL'EVOLUZIONE DEGLI ARRAY DI METILAZIONE ILLUMINA. AGGIORNATO AD OTTOBRE 2026 12

FIGURA 1.4 SCHEMA DELLE REAZIONI DELLA CITOSINA E DELLA 5-METILCITOSINA CON IL BISOLFITO. FONTE: NOTA TECNICA ILLUMINA "AUTOMATED BISULFITE CONVERSION FOR INFINIUM METHYLATION BEADCHIPS" 13

FIGURA 3.1 SCHEMA ILLUSTRATIVO DEL WORKFLOW METODOLOGICO 19

FIGURA 3.2 ESEMPIO DI RICODIFICA DEI CAMPIONI MEDIANTE ASSEGNAZIONE DI UN IDENTIFICATIVO INTERNO DI LABORATORIO. 23

FIGURA 3.3 SCHEMA ILLUSTRATIVO DELL'ISOLAMENTO DEL DNA MEDIANTE MEMBRANA DI SILICE. IL KIT UTILIZZATO NELLO STUDIO È IL QIAAMP DNA BLOOD MINI KIT (QIAGEN). IMMAGINE ADATTATA DA: HTTPS://WWW.QIAGEN.COM/US/PRODUCTS/DIAGNOSTICS-AND-CLINICAL-RESEARCH/SOLUTIONS-FOR-LABORATORY-DEVELOPED-TESTS/QIAAMP-DSP-DNA-BLOOD-MINI-KIT 25

FIGURA 3.4 ESEMPIO DI SPETTRO DI ASSORBIMENTO DEGLI ACIDI NUCLEICI. IMMAGINE ILLUSTRATIVA; FONTE: "EPPENDORF, UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY - EASY AND QUICK QUANTIFICATION OF NUCLEIC ACIDS". LA FONTE NON COSTITUISCE UN RISULTATO SPERIMENTALE DELLA COORTE. (HTTPS://WWW.EPPENDORF.COM/KR-EN/LAB-ACADEMY/LIFE-SCIENCE/CELL-BIOLOGY/UV-VIS-SPECTROPHOTOMETRY-EASY-AND-QUICK-QUANTIFICATION-OF-NUCLEIC-ACIDS/) 26

FIGURA 3.5 WORKFLOW DELLA PROFILAZIONE DELLA METILAZIONE MEDIANTE ILLUMINA INFINIUM METHYLATIONEPIC BEADCHIP V1.0: CONVERSIONE CON BISOLFITO, AMPLIFICAZIONE GENOMICA, FRAMMENTAZIONE, IBRIDAZIONE, ESTENSIONE E MARCATURA DELLE SONDE, SCANSIONE IN FLUORESCENZA. L'ELABORAZIONE DELLE INTENSITÀ DEI SEGNALI METILATI (M) E NON METILATI (U) CONSENTE DI STIMARE I B-VALUE PER CIASCUN SITO CPG. 30

FIGURA 3.6 SCHEMA RIASSUNTIVO DELLE PRINCIPALI ANALISI STATISTICHE DELLO STUDIO. ELABORAZIONE ORIGINALE BASATA SULLA METODOLOGIA DESCRITTA NEL PARAGRAFO 3.13. AAR:RESIDUI DI ACCELERAZIONE DELL'ETÀ EPIGENETICA; DS: DEVIAZIONE STANDARD;HR: HAZARD RATIO; IC95%: INTERVALLO DI CONFIDENZA AL 95%; AUC: AREA SOTTO LA CURVA ROC 37

FIGURA 4.1 RELAZIONE TRA I VALORI ORIGINALI DEI NOVE OROLOGI EPIGENETICI E L'ETÀ CRONOLOGICA DEI PARTECIPANTI. OGNI PUNTO RAPPRESENTA UN PAZIENTE DELLA COORTE (N = 288), DISTINTO PER SESSO: BLU PER I MASCHI E ARANCIONE PER LE FEMMINE. LE LINEE CONTINUE RAPPRESENTANO LE RETTE DI REGRESSIONE LINEARE CALCOLATE SULL'INTERO CAMPIONE. I COEFFICIENTI DI PEARSON (R) RIPORTATI NEI SINGOLI GRAFICI INDICANO L'INTENSITÀ DI CORRELAZIONE LINEARE TRA IL VALORE DELL'OROLOGIO E L'ETÀ CRONOLOGICA. NEL

grafico relativo a DunedinPACE, la linea orizzontale tratteggiata indica il valore medio dell'indicatore della coorte (circa 1,23). 41
Figura 4.2 Curve di sopravvivenza Kaplan–Meier relative ai nove indicatori epigenetici, suddivisi in due gruppi in base al valore standardizzato: inferiore alla media (z < 0, blu) o uguale/superiore alla media (z ≥ 0, rosso). Per gli otto orologi espressi in anni sono stati utilizzati gli Age Acceleration Residuals (AAR) standardizzati, mentre DunedinPACE è stato standardizzato senza residualizzazione. Il tempo è espresso in anni dal ricovero. Le aree ombreggiate rappresentano gli intervalli di confidenza puntuali al 95%, calcolati mediante la varianza di Greenwood. I p-value riportati nei grafici derivano dal test log-rank e sono nominali. 44
Figura 4.3 Hazard Ratio (HR) e relativi intervalli di confidenza al 95% dei nove orologi epigenetici, calcolati mediante regressione di Cox a 1, 5 e 10 anni. Le stime sono riferite all'incremento di una deviazione standard (DS) dell'indicatore e derivano da modelli aggiustati per età, sesso, composizione leucocitaria (CellPC1 e CellPC2) e classe latente di multimorbidità. La linea verticale tratteggiata indica HR = 1, corrispondente all'assenza di associazione. I punti rappresentano le stime degli HR, mentre le barre orizzontali indicano gli intervalli di confidenza al 95%..... 46

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare Francesco Piacenza, che mi ha fornito i dati e i risultati sperimentali necessari alla realizzazione di questa tesi. Sebbene non sia stato possibile nominarlo ufficialmente come correlatore, il suo contributo è stato fondamentale.
Un sentito ringraziamento va anche alla professoressa Maria Rita Rippo, che mi ha supportato e guidato nella stesura e nella revisione di questa tesi sperimentale. Nonostante i numerosi impegni, si è sempre dimostrata solare e disponibile.

Ringrazio la coordinatrice del mio corso di laurea, Marinella Balercia, e i miei tutor di tirocinio, Lucia Bisceglia ed Emanuele Moglie, per il sostegno che mi hanno offerto durante questi anni e per aver sempre creduto in me, fin dal mio primo esame di tirocinio. Le loro parole di incoraggiamento mi hanno aiutato a maturare, alimentando in me il desiderio di crescere e migliorarmi costantemente.

Infine, desidero ringraziare la Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università Politecnica delle Marche. Sebbene alcuni aspetti organizzativi, come la gestione degli orari, la qualità della connessione Wi-Fi e il servizio della Segreteria Studenti, possano essere migliorati, il percorso formativo offerto da questo corso di laurea e dai suoi docenti ha rappresentato per me un'importante occasione di crescita scientifica e professionale, della quale sono profondamente grato.

1 INTRODUZIONE

1.1 La Multimorbidità

La multimorbidità (MM) è comunemente definita come la coesistenza di due o più condizioni croniche nello stesso individuo. La sua frequenza aumenta con l'età, ma non è limitata alla popolazione anziana. La revisione di Bochtler e Houta riporta, sulla base di precedenti studi, una prevalenza globale del 37,2% nella popolazione adulta e del 39,2% in Europa (1). Le stime dipendono dalla popolazione, dal numero di patologie considerate e dalla definizione operativa adottata. La MM non consiste soltanto in un accumulo di diagnosi: le interazioni tra malattie e trattamenti possono compromettere funzionalità, qualità della vita e prognosi e rendere più complessa l'assistenza.

Nella coorte svedese studiata da Zhang et al., l'accumulo di malattie accelera tra 70 e 80 anni, mantiene una velocità relativamente stabile fino a circa 90 anni e successivamente rallenta. Il carico complessivo di malattia e la complessità delle combinazioni continuano tuttavia ad aumentare nelle età estreme (2). La Figura 1.1 illustra la distribuzione del numero di patologie per età e sesso. Questi risultati sottolineano la necessità di strumenti capaci di descrivere sia il carico di malattia sia l'eterogeneità dei pazienti anziani.

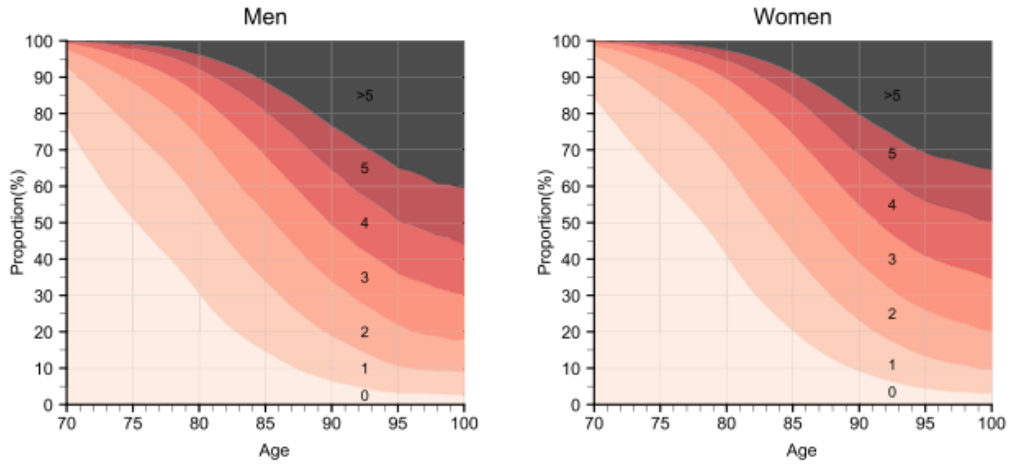


Figura 1.1 Distribuzione del numero di patologie croniche tra 70 e 100 anni, stratificata per sesso, nelle coorti svedesi nate nel 1920–1922. Fonte: Zhang et al. (2).

L’aumento della complessità clinica richiede modelli assistenziali integrati e flessibili. Nelle età avanzate, combinazioni di malattie che interessano sistemi d’organo differenti possono richiedere il coordinamento di più percorsi diagnostici e terapeutici e una valutazione congiunta dello stato funzionale e delle priorità del paziente (2).

La MM si associa frequentemente a polifarmacoterapia, ricoveri ripetuti, dipendenza assistenziale e maggiori costi sanitari. La polifarmacoterapia, spesso definita come l’assunzione contemporanea di almeno cinque farmaci, può aumentare il rischio di interazioni e prescrizioni inappropriate. La valutazione geriatrica deve pertanto integrare le diagnosi con le condizioni funzionali, cognitive e sociali. In pazienti anziani ospedalizzati, l’informazione funzionale e alcuni biomarcatori possono integrare la valutazione prognostica basata sulle patologie (3).

Il semplice conteggio delle condizioni croniche è intuitivo, ma non considera il diverso peso prognostico delle malattie. L’identificazione di combinazioni ricorrenti di malattie, definite pattern di multimorbidità, può descrivere l’eterogeneità clinica, ma dipende dalle patologie e dai metodi analitici utilizzati.

L’integrazione delle informazioni cliniche con biomarcatori dell’invecchiamento potrebbe migliorare la caratterizzazione del rischio.

In questo contesto, gli orologi epigenetici forniscono misure basate sulla metilazione del DNA che possono essere confrontate con gli indicatori clinici tradizionali. Il loro eventuale contributo prognostico deve essere valutato separando associazione statistica, discriminazione del rischio e utilità clinica.

1.2 Epigenetica

L’epigenetica studia modificazioni della regolazione del genoma che possono modificare l’attività dei geni senza alterare la sequenza nucleotidica del DNA. Tra i principali meccanismi epigenetici rientrano la metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni e i meccanismi che regolano l’organizzazione della cromatina. Tra questi, la metilazione del DNA rappresenta uno dei fenomeni maggiormente studiati nell’invecchiamento. Essa consiste nell’aggiunta di un

gruppo metile alla citosina e, nel genoma umano, viene analizzata soprattutto in corrispondenza dei dinucleotidi CpG, cioè sequenze nelle quali una citosina è seguita da una guanina. I CpG non sono distribuiti uniformemente nel genoma. Alcune regioni, definite isole CpG, presentano infatti un'elevata concentrazione di dinucleotidi CpG e un alto contenuto di guanina e citosina; queste regioni sono frequentemente associate alle porzioni iniziali dei geni e alle regioni coinvolte nella loro regolazione. Lo stato di metilazione dei siti CpG può cambiare nel corso della vita e risentire sia dell'età che delle condizioni ambientali e dello stile di vita.

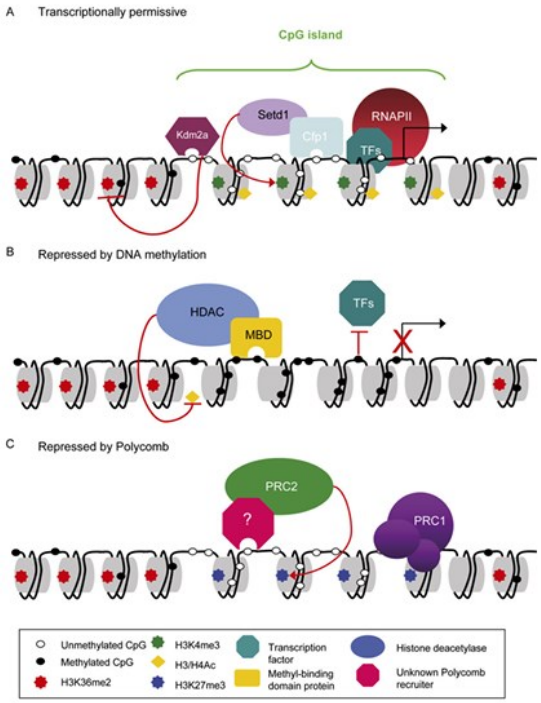


Figura 1.2 Stati della cromatina associati alle isole CpG: configurazione permissiva alla trascrizione, repressione associata alla metilazione del DNA e repressione mediata da Polycomb. Fonte: Deaton e Bird (4).

Come illustrato nella Figura 1.2, le isole CpG non metilate sono spesso associate a una configurazione della cromatina permissiva alla trascrizione (A), mentre la metilazione può associarsi a una repressione stabile (B). La repressione può anche essere mediata dai complessi Polycomb (C). Il rapporto tra metilazione ed espressione dipende tuttavia dalla regione genomica e dal contesto cellulare (4).

L'invecchiamento si associa a variazioni della metilazione distribuite in modo eterogeneo nel genoma: possono coesistere ipometilazione in alcune regioni e

ipermetilazione di specifici siti CpG, anche in prossimità dei promotori (5), (6). Questi cambiamenti si inseriscono in un quadro che comprende il rimodellamento immunitario e l'infiammazione cronica di basso grado, o inflammaging. Studi che integrano informazioni epigenetiche e infiammatorie suggeriscono relazioni tra questi processi, senza stabilire che ogni variazione di metilazione abbia un ruolo causale (7).

Gli orologi epigenetici utilizzano specifici siti CpG selezionati per la loro capacità di descrivere l'età o altri aspetti dell'invecchiamento. Non misurano quindi le isole CpG nel loro complesso, ma combinano i livelli di metilazione di siti definiti in un indicatore quantitativo (8), (9).

1.3 Gli Orologi Epigenetici

Gli orologi epigenetici sono modelli matematici che combinano livelli di metilazione del DNA per stimare l'età cronologica o indicatori legati all'invecchiamento e alla salute. Il loro significato dipende dalla variabile utilizzata nell'addestramento: una stima dell'età basata sulla metilazione non rappresenta automaticamente una misura completa dell'età biologica. Il DNA Methylation Age Calculator della Clock Foundation permette di ottenere diversi indicatori a partire dai profili di metilazione (*https://dnamage.clockfoundation.org*). Il primo clock multi-tessuto di Horvath è stato sviluppato utilizzando circa 8.000 campioni di 82 dataset, comprendenti 51 tessuti e tipi cellulari. Il modello finale utilizza 353 siti CpG e produce una stima dell'età espressa in anni, indicata come DNAmAge (9).

In seguito sono stati sviluppati altri orologi epigenetici, tra cui DNAmAge Hannum, DNAmPhenoAge, DNAmGrimAge, DNAmGrimAge2, DunedinPACE, YingAdaptAge, YingCausAge e YingDamAge. La possibilità di calcolare gli orologi deriva sia dalle possibilità offerte dal sito di Horvath ma soprattutto dall'evoluzione tecnologica della piattaforma di Illumina (https://www.illumina.com) che con il tempo ha performato i kit di analisi del metiloma a partire da 4,5k a 920k siti di metilazione.



Figura 1.3. Rappresentazione schematica dell'evoluzione degli array di metilazione Illumina. Aggiornato ad ottobre 2026

1.4 Calcolo Dell'età Epigenetica

La determinazione della metilazione del DNA richiede la conversione con bisolfito. Le citosine non metilate vengono convertite in uracile, mentre le 5-metilcitosine rimangono prevalentemente inalterate. Nelle successive fasi di amplificazione, l'uracile viene letto come timina. Gli array distinguono quindi i segnali derivati dalle sequenze convertite e non convertite (Figura 1.4). La conversione convenzionale con bisolfito non distingue la 5-metilcitosina dalla 5-idrossimetilcitosina. Per ciascun sito CpG, il livello di metilazione può essere descritto con un β-value, ottenuto dalle intensità dei segnali metilato e non metilato. I valori prossimi a 0 indicano una bassa proporzione di metilazione e quelli prossimi a 1 una proporzione elevata. Le procedure di controllo di qualità e normalizzazione riducono la variabilità tecnica prima dell'applicazione dei modelli (10). Durante lo sviluppo del clock di Horvath sono stati considerati 21.369 siti CpG comuni agli array Illumina 27K e 450K. Una regressione penalizzata Elastic Net, con una trasformazione dell'età come variabile da predire, ha selezionato 353 CpG e i rispettivi coefficienti. Nell'applicazione a nuovi campioni la selezione non viene

ripetuta: si impiegano i coefficienti già definiti. Una trasformazione inversa riporta il risultato sulla scala degli anni.

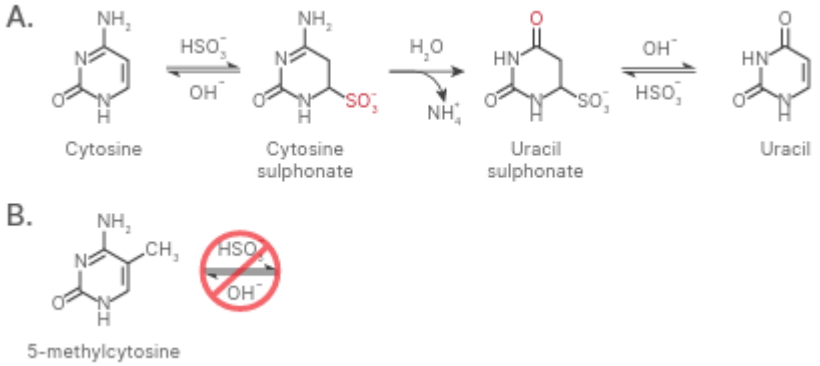


Figura 1.4 Schema delle reazioni della citosina e della 5-metilcitosina con il bisolfito. Fonte: nota tecnica Illumina "Automated bisulfite conversion for Infinium Methylation BeadChips".

La trasformazione tiene conto della relazione non lineare tra metilazione ed età durante lo sviluppo, che diventa approssimativamente lineare nell'età adulta (9).
Gli orologi sviluppati successivamente differiscono per siti CpG, tessuto di riferimento e obiettivo di addestramento: Horvath e Hannum stimano principalmente l'età cronologica; PhenoAge e GrimAge incorporano informazioni relative al fenotipo clinico o alla mortalità. Queste differenze impediscono di considerare intercambiabili le loro stime (9), (11), (12), (13), (14) .
Nel paragrafo 1.8 e nella Tabella 1.1 vengono descritti con maggior dettaglio i diversi orologi biologici e le loro principali differenze.

1.5 Concetto Di Age Acceleration

Sebbene l'età epigenetica sia strettamente associata all'età cronologica, i due valori non coincidono necessariamente nel singolo individuo. Persone della stessa età anagrafica possono infatti presentare valori differenti di DNAm age, mostrando quindi un diverso grado di avanzamento dei cambiamenti epigenetici associati all'età. Da questa osservazione deriva il concetto di epigenetic age acceleration, utilizzato per descrivere lo scostamento dell'età epigenetica rispetto a quella attesa sulla base dell'età cronologica.
In termini semplici, una DNAm age superiore a quella attesa viene interpretata

come un'accelerazione dell'età epigenetica, mentre un valore inferiore indica una decelerazione. Una prima valutazione può essere ottenuta considerando direttamente la differenza tra DNAm age ed età cronologica, definita anche *delta age*. Tuttavia, questa semplice differenza può risultare ancora associata all'età cronologica; per questo motivo, negli studi sull'invecchiamento viene spesso utilizzata una misura più rigorosa basata sui residui di regressione, gli Age Acceleration Residuals, descritti nel paragrafo successivo (15).

1.6 Age Acceleration Residuals (AAR)

Gli Age Acceleration Residuals (AAR) sono i residui della regressione lineare dell'età epigenetica sull'età cronologica. Per ciascun individuo: AAR = età epigenetica osservata − età epigenetica prevista dal modello. Un residuo positivo indica una stima epigenetica superiore a quella attesa per l'età cronologica, mentre un residuo negativo indica una stima inferiore.
L'AAR è distinto dalla differenza diretta DNAmAge − età cronologica. In una regressione lineare con intercetta, i residui risultano non correlati linearmente con l'età nel campione utilizzato per stimare il modello; questa proprietà non implica indipendenza statistica generale e non è garantita in un campione esterno (15).

1.7 Varianti Di Age Acceleration

Nei campioni di sangue, la stima dell'età epigenetica può essere influenzata anche dalla composizione delle diverse popolazioni cellulari, poiché ciascun tipo cellulare presenta un proprio profilo di metilazione e le loro proporzioni cambiano con l'età. Per questo motivo sono state sviluppate due principali varianti dell'age acceleration: la Intrinsic Epigenetic Age Acceleration (IEAA) e la Extrinsic Epigenetic Age Acceleration (EEAA).
La IEAA è stata sviluppata per valutare l'accelerazione epigenetica riducendo l'influenza della composizione leucocitaria. Viene calcolata come residuo di un modello di regressione che considera, oltre all'età cronologica, anche le stime delle principali popolazioni cellulari del sangue. In questo modo, la variazione della DNAm age spiegabile dalle differenze nella composizione cellulare viene in gran

parte rimossa, ottenendo una misura maggiormente rappresentativa dei cambiamenti epigenetici intrinseci alle cellule.

La EEAA, al contrario, incorpora intenzionalmente i cambiamenti della composizione immunitaria associati all'età. Questa misura deriva dal clock di Hannum, il cui contributo viene combinato con quello di alcune popolazioni cellulari che variano durante l'invecchiamento, in particolare cellule T CD8+ naïve, cellule T CD8+ più differenziate e plasmablasti. La misura ottenuta viene successivamente corretta per l'età cronologica mediante regressione. La EEAA riflette quindi sia i cambiamenti epigenetici cellulari sia quelli della composizione del sistema immunitario e può essere interpretata come un indicatore maggiormente collegato ai processi di immunosenescenza.

Perciò, mentre la IEAA cerca di rendere l'age acceleration il più possibile indipendente dalle variazioni delle cellule ematiche, la EEAA utilizza proprio tali variazioni come parte dell'informazione biologica associata all'invecchiamento. (15)

1.8 Caratteristiche Generali Dei Principali Orologi Epigenetici

I nove indicatori considerati sono descritti nella Tabella 1.1. Horvath e Hannum sono orologi di prima generazione, sviluppati per stimare l'età cronologica; utilizzano rispettivamente 353 e 71 siti CpG (9), (11). DNAmPhenoAge predice una misura fenotipica costruita combinando età e biomarcatori clinici e utilizza 513 CpG (12).

DNAmGrimAge integra età, sesso, surrogati epigenetici dell'esposizione cumulativa al fumo e di sette proteine plasmatiche, selezionati in relazione al tempo alla morte (13). GrimAge2 aggiunge surrogati epigenetici della proteina C-reattiva ad alta sensibilità e dell'emoglobina glicata, entrambe trasformate logaritmicamente (14).

DunedinPACE descrive il ritmo dell'invecchiamento e non un'età in anni. È stato sviluppato a partire dai cambiamenti longitudinali di 19 indicatori dell'integrità dei sistemi d'organo nella coorte Dunedin e utilizza 173 CpG. Il valore 1 rappresenta il ritmo di riferimento della coorte di sviluppo, mentre valori superiori o inferiori indicano rispettivamente un ritmo più rapido o più lento rispetto a tale riferimento

(16).

CausAge, DamAge e AdaptAge, sviluppati da Ying et al., incorporano informazioni di randomizzazione mendeliana per distinguere modificazioni epigenetiche potenzialmente dannose da modificazioni adattative. CausAge integra l'informazione causale nel modello; DamAge e AdaptAge utilizzano rispettivamente siti con effetti classificati come dannosi e adattativi. La denominazione "causale" descrive il metodo di sviluppo e non dimostra che un'associazione osservata nella presente coorte abbia un significato causale (17).

Tabella 1.1 Caratteristiche degli orologi epigenetici inclusi nello studio. Sintesi basata sulle pubblicazioni originali (9), (12–16), (17). La classificazione in generazioni descrive gli obiettivi di sviluppo e non stabilisce una graduatoria di efficacia clinica.

Orologio	Generazione	Caratteristiche Principali
DNAmAge (Horvath)	1ª generazione	Stima età cronologica (353 CpG)
DNAmAge Hannum	1ª generazione	Stima età cronologica (71 CpG)
DNAmPhenoAge	2ª generazione	Stima della Phenotypic Age (513 CpG), associata a morbilità e mortalità
DNAmGrimAge	2ª generazione	Età e sesso + surrogati DNAm di sette proteine plasmatiche e del fumo; modello sviluppato per il tempo alla morte
DNAmGrimAge2	2ª generazione	Evoluzione di GrimAge con aggiunta di DNAm logCRP e DNAm logHbA1c
DunedinPACE	3ª generazione	Ritmo di invecchiamento; firma di 173 CpG
YingAdaptAge	Causale	Informazione su modificazioni adattative (1.000 CpG)
YingCausAge	Causale	Modello arricchito di informazione causale (586 CpG)
YingDamAge	Causale	Informazione su modificazioni potenzialmente dannose (1.090 CpG)

2 SCOPO DELLA TESI

Gli orologi epigenetici sono stati proposti come indicatori dell'invecchiamento biologico e alcuni di essi hanno mostrato associazioni con il rischio di mortalità (13), (14), (15). Tuttavia, le evidenze derivanti dal confronto diretto tra diversi orologi nei pazienti anziani ospedalizzati sono ancora limitate. Poiché tali orologi sono stati sviluppati con obiettivi diversi e prendendo come riferimento popolazioni con caratteristiche differenti, è necessario valutarne le prestazioni nel contesto geriatrico, chiarendo quali indicatori forniscano informazioni prognostiche aggiuntive rispetto all'età e alle caratteristiche cliniche, inclusi i pattern di multimorbidità, e se tale contributo vari in funzione dell'orizzonte temporale considerato.

Il presente lavoro di tesi si inserisce in uno studio volto a confrontare il valore prognostico dei nove orologi epigenetici descritti nella Tabella 1.1 rispetto alla mortalità per tutte le cause a 1, 5 e 10 anni in una coorte di pazienti anziani ospedalizzati confrontandoli con un modello di riferimento comprendente età, sesso, composizione leucocitaria e pattern di multimorbidità. Nell'ambito di questo progetto, l'attività sperimentale svolta durante il lavoro di tesi ha riguardato il processamento dei campioni di sangue e l'estrazione del DNA destinato all'analisi della metilazione. I dati di metilazione così ottenuti sono stati utilizzati per il calcolo degli orologi epigenetici e per le successive analisi prognostiche, articolate in due obiettivi:

1) valutare l'associazione tra ciascun orologio epigenetico e il rischio di mortalità per tutte le cause mediante modelli di regressione di Cox;
2) determinare se l'aggiunta di ciascun orologio al modello di riferimento ne migliori la capacità di discriminare il rischio di mortalità a 1, 5 e 10 anni, mediante il confronto delle aree sotto la curva ROC (AUC) dipendenti dal tempo.

Il confronto mira quindi a identificare gli orologi epigenetici che offrono il maggiore contributo prognostico oltre le informazioni cliniche disponibili e a valutarne l'utilità nei diversi orizzonti temporali.

3 MATERIALI E METODI

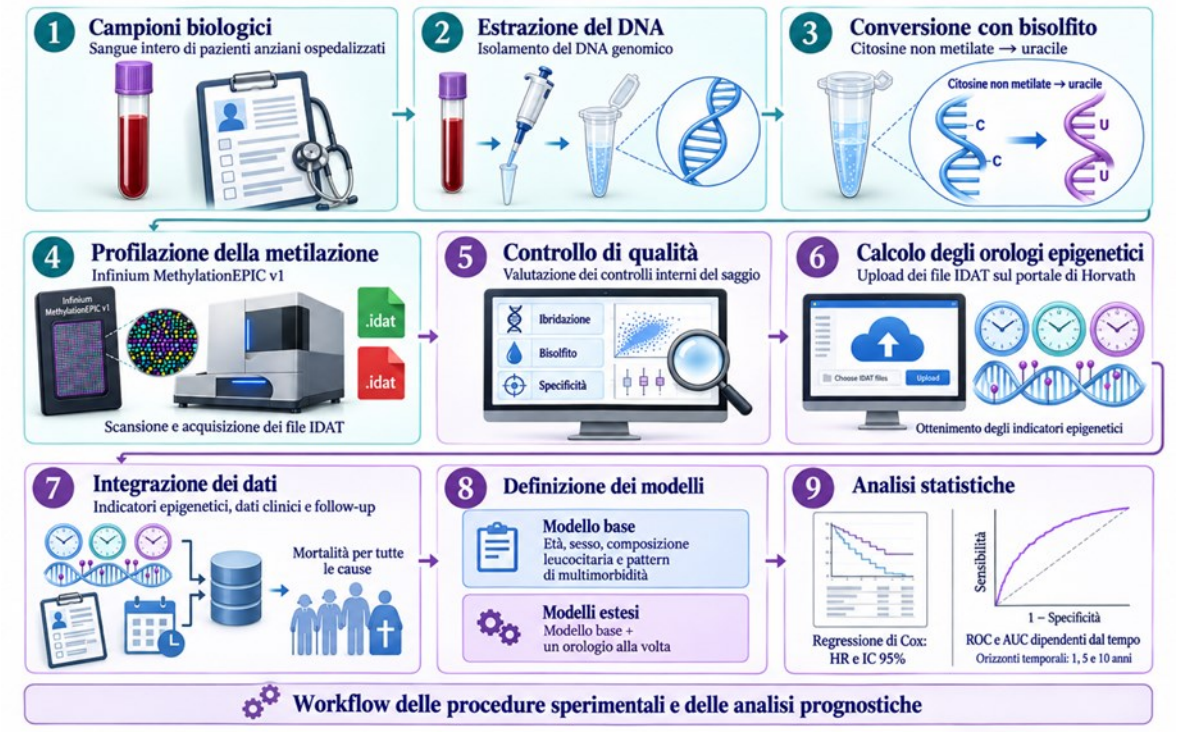


Figura 3.1 Schema illustrativo del workflow metodologico

3.1 Popolazione Dello Studio

Lo studio è stato condotto su una coorte di 288 pazienti precedentemente selezionati tra i soggetti ricoverati nei reparti per acuti dell'IRCCS INRCA di Ancona, nell'ambito del progetto PROMOTERA, finanziato dal Ministero della Salute (GR-2019-12368606) e inserito nell'osservatorio Report-AGE (3), (18). I pazienti sono stati inclusi sulla base della disponibilità di campioni ematici idonei alla profilazione della metilazione del DNA e di informazioni cliniche e di follow-up complete.

La popolazione comprendeva pazienti con un'età media di 83,3 ± 7,4 anni (intervallo 62–102 anni), di cui 157 donne (54,5%). Le principali caratteristiche demografiche e cliniche della coorte, comprese le patologie considerate per la valutazione della multimorbidità, sono riportate nella Tabella 3.1.

Le informazioni cliniche al basale sono state raccolte mediante il *Minimum Data Set for Acute Care* (MDS-AC), uno strumento di valutazione multidimensionale del gruppo interRAI utilizzato nei pazienti ospedalizzati in regime di acuzie. Le variabili disponibili comprendevano diagnosi, condizioni funzionali e cognitive, trattamenti farmacologici e parametri ematologici (3).
La multimorbidità è stata caratterizzata mediante 24 indicatori binari di patologia, definiti sulla base dei codici ICD-10 di dimissione e/o di criteri farmacologici al ricovero. Sono state considerate condizioni cardiovascolari, cerebrovascolari, metaboliche, respiratorie, muscoloscheletriche, neurologiche e oncologiche. Mediante un'analisi delle classi latenti (*Latent Class Analysis*, LCA), precedentemente effettuata sulla coorte, sono stati identificati due gruppi caratterizzati da differenti pattern di multimorbidità: uno prevalentemente cardio-renale e cardiorespiratorio e uno neurovascolare, neurologico e muscoloscheletrico. Tali gruppi sono stati successivamente utilizzati nei modelli prognostici.
I campioni ematici sono stati raccolti al momento del ricovero e conservati per le successive analisi a -80°C nella biobanca Bioger del IRCCS INRCA.

Il DNA utilizzato per la profilazione della metilazione è stato estratto dal sangue intero, secondo la procedura descritta nel paragrafo successivo.
L'esito considerato nello studio è stato la mortalità per tutte le cause. Lo stato vitale dei partecipanti è stato verificato mediante collegamento con il registro regionale della popolazione, senza perdite al follow-up. Il periodo di osservazione è stato calcolato a partire dal ricovero fino al decesso o alla data di conclusione del follow-up, fissata al 20 novembre 2024, per una durata massima di circa 12,5 anni.
Lo studio è stato condotto in conformità alla Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS INRCA (CE INRCA 20031, 4 febbraio 2021).

Tabella 3.1 Caratteristiche della coorte e patologie utilizzate per l'analisi delle classi latenti.
I valori sono espressi come media ± deviazione standard (DS) per le variabili continue, oppure numero e percentuale per le variabili categoriche. Le 24 patologie sono state definite mediante codici ICD-10 di dimissione e/o criteri farmacologici al ricovero indice. BPCO: broncopneumopatia cronica ostruttiva.

CARATTERISTICA	CAMPIONE (N°= 288)
Età, anni (media ± DS)	83,3 ± 7,4
Intervallo di età, anni	62–102
Sesso femminile	157 (54,5%)
Tempo di osservazione, anni (mediana; IQR)	4,2 (1,5–8,2)
Follow-up massimo, anni	12,5
Decessi per tutte le cause	232 (80,6%)
CLASSE DI MULTIMORBIDITÀ	**N° (%)**
Classe 1: cardio-renale e cardiorespiratoria	161 (55,9%)
Classe 2: neurovascolare, neurologica e muscoloscheletrica	127 (44,1%)
PATOLOGIE	**N° (%)**
Ipertensione	166 (57,6%)
Scompenso cardiaco	127 (44,1%)
Malattia cerebrovascolare	98 (34,0%)
Malattia renale cronica	66 (22,9%)
Diabete mellito	66 (22,9%)
Aritmie atriali	56 (19,4%)
Anemia	65 (22,6%)
BPCO, enfisema o bronchite cronica	52 (18,1%)
Cardiopatia ischemica	45 (15,6%)
Tumori solidi	40 (13,9%)

Colite o malattia infiammatoria intestinale	38 (13,2%)
Deficit visivo	35 (12,2%)
Dislipidemia	31 (10,8%)
Altre condizioni respiratorie	30 (10,4%)
Dorsopatie	30 (10,4%)
Demenza	71 (24,7%)
Altri disturbi neurologici	47 (16,3%)
Patologia prostatica	55 (19,1%)
Malattia di Parkinson	31 (10,8%)
Deficit uditivo	31 (10,8%)
Altri disturbi metabolici	15 (5,2%)
Artrosi o patologie articolari	15 (5,2%)
Osteoporosi	25 (8,7%)
Disturbi tiroidei	24 (8,3%)

3.2 Raccolta E Identificazione Dei Campioni Biologici

I campioni di sangue intero sono stati recuperati dalla biobanca Bioger dell'INRCA e identificati mediante i codici di studio. La corrispondenza tra identificativi dei campioni e dati clinici è stata verificata prima della ricodifica interna di laboratorio. La Figura 3.2 illustra un esempio della procedura di identificazione.

Codice provetta laboratorio	Cognome	Nome	Codice interno laboratorio
12041710062AN	XXXXXXX	XXXXXXX	001
12053010075AN	XXXXXXX	XXXXXXX	002
12061110115AN	XXXXXXX	XXXXXXX	003
12061910097AN	XXXXXXX	XXXXXXX	004

Figura 3.2 Esempio di ricodifica dei campioni mediante assegnazione di un identificativo interno di laboratorio.

3.3 Isolamento del Dna da sangue intero

Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue intero mediante il QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN), seguendo le istruzioni del produttore (https://www.qiagen.com/it/resources/kithandbook/hb-0329-007-hb-qiaamp-dna-mini-blood-mini-0725-ww).

Per ciascun campione, un'aliquota di 200 µL di sangue intero, quando disponibile, è stata trasferita dalla provetta madre a una microprovetta Eppendorf da 1,5 mL, utilizzando micropipette a volume variabile. Per le successive fasi di separazione sono state impiegate centrifughe Eppendorf. Poiché gli eritrociti maturi sono privi di nucleo, il DNA genomico ottenuto dal sangue intero deriva principalmente dai leucociti, che rappresentano la principale componente cellulare nucleata del campione.

La procedura di estrazione si basa sulla purificazione del DNA mediante colonne dotate di una membrana di silice. La prima fase consiste nella lisi delle cellule attraverso l'aggiunta del buffer AL e della proteinasi K. Il buffer AL favorisce la rottura delle membrane cellulari e nucleari, permettendo il rilascio degli acidi nucleici, mentre la proteinasi K degrada le proteine cellulari, comprese quelle associate al DNA, e contribuisce all'inattivazione delle nucleasi che potrebbero degradarlo.

Durante il processamento è stato osservato che alcuni campioni, precedentemente conservati, presentavano coaguli visibili oppure un volume di sangue inferiore ai 200 µL previsti dalla procedura standard. Per questi campioni è stato quindi

necessario adattare la fase di lisi, aumentando il volume di proteinasi K dai 20 µL previsti dal protocollo a 25 o 30 µL, in base alle caratteristiche del materiale biologico. Questa modifica è stata effettuata con l'obiettivo di favorire la digestione delle componenti proteiche e ottenere una lisi più efficace anche nei campioni che presentavano una maggiore coagulazione.

Dopo la miscelazione e l'incubazione previste dal protocollo, viene aggiunto etanolo, necessario per creare condizioni favorevoli al successivo legame del DNA alla membrana di silice.

Il campione così trattato viene trasferito in una colonna QIAamp Mini, contenente una membrana di silice alla quale il DNA si lega grazie alle condizioni chimiche create dai reagenti. Durante la centrifugazione, parte dei contaminanti attraversa la membrana, mentre il DNA rimane trattenuto sulla colonna. Seguono due passaggi di lavaggio mediante i buffer AW1 e AW2, che consentono di rimuovere progressivamente proteine, sali e altre sostanze residue, migliorando la purezza del DNA estratto. Un'ulteriore centrifugazione permette di eliminare i residui dei tamponi di lavaggio, che potrebbero interferire con le successive analisi molecolari.

La fase finale consiste nell'eluizione del DNA mediante l'aggiunta di 50 µL di buffer AE, che favorisce il distacco del DNA dalla membrana di silice. Attraverso una successiva centrifugazione, il DNA purificato viene raccolto in soluzione, con un volume di eluizione di 50 µL, e successivamente sottoposto a quantificazione e valutazione della purezza mediante spettrofotometria, come descritto nel *paragrafo 3.4*.

La Figura 3.3 riassume schematicamente le principali fasi della procedura di estrazione.

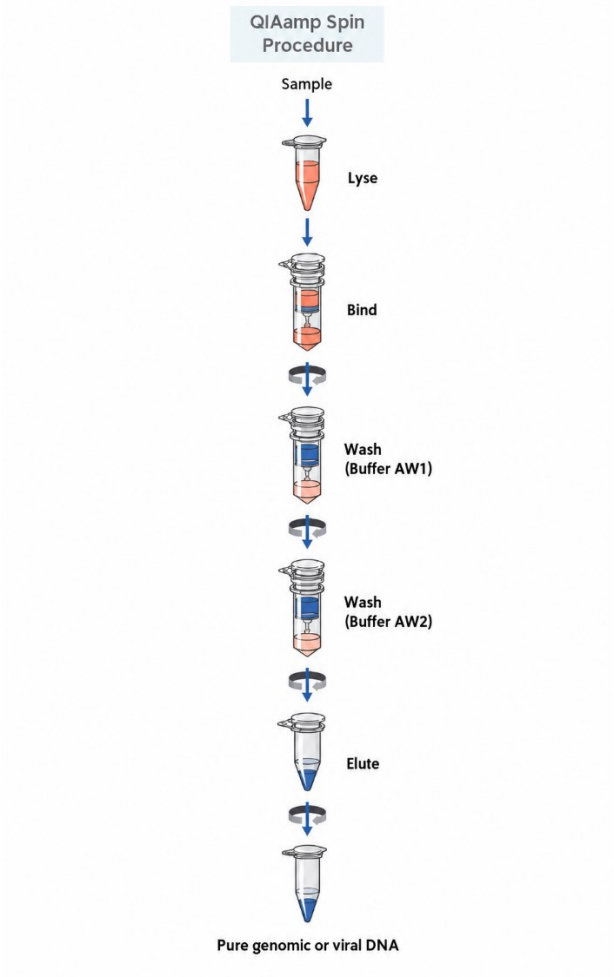


Figura 3.3 Schema illustrativo dell'isolamento del DNA mediante membrana di silice. Il kit utilizzato nello studio è il QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Immagine adattata da: https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiaamp-dsp-dna-blood-mini-kit

3.4 Quantificazione E Valutazione Della Purezza Del Dna

La concentrazione del DNA è stata determinata mediante spettrofotometria UV con NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti). La legge di Lambert–Beer esprime la relazione $A = \varepsilon \times l \times c$, dove A è l'assorbanza, ε il coefficiente di assorbimento molare, l il cammino ottico e c la concentrazione molare. Il coefficiente molare è espresso in L mol^{-1} cm^{-1}.

La lettura spettrofotometrica utilizza piccoli volumi di campione. L'assorbanza a 260 nm è impiegata per stimare la concentrazione degli acidi nucleici. Il rapporto A260/A280 e il rapporto A260/A230 forniscono indicazioni sulla possibile presenza di contaminanti, ma non verificano direttamente l'integrità del DNA. La quantificazione ha consentito la preparazione delle aliquote necessarie alla successiva conversione con bisolfito.

La Figura 3.4 mostra un esempio di spettro di assorbimento utilizzato per illustrare la quantificazione degli acidi nucleici.

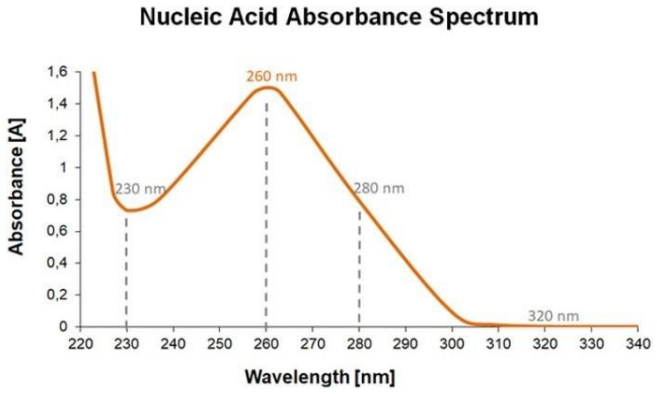


Figura 3.4 Esempio di spettro di assorbimento degli acidi nucleici. Immagine illustrativa; fonte: "Eppendorf, UV-Vis Spectrophotometry - Easy and Quick Quantification of Nucleic Acids".
La fonte non costituisce un risultato sperimentale della coorte. (https://www.eppendorf.com/kr-en/lab-academy/life-science/cell-biology/uv-vis-spectrophotometry-easy-and-quick-quantification-of-nucleic-acids/)

3.5 Preparazione Delle Aliquote E Conversione Con Bisolfito

Per ciascun campione è stata preparata un'aliquota contenente 1 µg (1.000 ng) di DNA genomico, precedentemente estratto e quantificato. La conversione con bisolfito è stata eseguita mediante EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research), seguendo le istruzioni del produttore (https://files.zymoresearch.com/protocols/_d5005_d5006_ez_dna_methylation-goldga_o_kit.pdf).

Questa procedura permette di distinguere le citosine metilate da quelle non metilate, rendendo possibile la successiva analisi del profilo di metilazione del DNA.

La prima fase prevede l'aggiunta del CT Conversion Reagent, contenente il reagente necessario alla conversione con bisolfito. Il campione viene successivamente sottoposto a un trattamento termico che consente la denaturazione del DNA, separandone i due filamenti e facilitando l'azione del reagente sulle citosine. Durante questa fase, le citosine non metilate vengono convertite in uracile, mentre le 5-metilcitosine rimangono prevalentemente inalterate. Nelle successive fasi di amplificazione, l'uracile viene copiato come timina, permettendo di distinguere le sequenze originariamente metilate da quelle non metilate.

Al termine della conversione, il DNA viene sottoposto a una fase di purificazione mediante colonne Zymo-Spin, utilizzando il buffer M-Binding per favorirne il legame alla membrana. Successivamente, il buffer M-Desulphonation permette di completare la reazione chimica attraverso la rimozione dei gruppi solfonici introdotti durante il trattamento con bisolfito. Seguono i lavaggi con M-Wash Buffer, necessari per eliminare i reagenti residui e le altre sostanze che potrebbero interferire con le successive analisi. Infine, il DNA convertito viene recuperato mediante eluizione con M-Elution Buffer.

Il DNA così ottenuto è stato utilizzato per l'analisi della metilazione mediante Illumina Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip, descritta nel *paragrafo 3.6*.

3.6 Analisi Della Metilazione Mediante Array EPIC v1.0

L'analisi della metilazione del DNA è stata effettuata mediante la piattaforma Illumina Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip, che consente di valutare lo stato di metilazione di circa 850.000 siti CpG distribuiti nel genoma umano (19), (20). La metodica si basa sull'utilizzo di sonde oligonucleotidiche specifiche, che permettono di riconoscere le sequenze di DNA precedentemente sottoposte a conversione con bisolfito. Il procedimento comprende diverse fasi, illustrate nella Figura 3.5.

La prima fase consiste nella conversione del DNA con bisolfito, descritta nel *paragrafo 3.5*, necessaria per distinguere le citosine metilate da quelle non metilate. Il DNA convertito viene successivamente sottoposto ad amplificazione genomica (Whole-Genome Amplification, WGA), che permette di aumentare la quantità di materiale genetico disponibile per le successive analisi. A differenza della PCR convenzionale, questa procedura non utilizza coppie di primer specifiche per amplificare singole regioni del DNA, ma consente un'amplificazione estesa del materiale genomico.

Terminata l'amplificazione, il DNA viene sottoposto a frammentazione enzimatica, attraverso la quale si ottengono frammenti di dimensioni più ridotte, adatti alla successiva fase di ibridazione. Il DNA frammentato viene quindi applicato al BeadChip, un supporto costituito da numerose microsfere alle quali sono associate sonde oligonucleotidiche specifiche. Durante l'ibridazione, i frammenti di DNA si legano alle sonde complementari, permettendo il riconoscimento delle sequenze contenenti i siti CpG di interesse.

Successivamente avviene la fase di estensione e marcatura delle sonde, necessaria per rilevare lo stato di metilazione dei singoli siti CpG. La tecnologia Infinium utilizza due differenti tipologie di sonde, denominate Infinium I e Infinium II. Le sonde di tipo I distinguono lo stato metilato e non metilato mediante due sonde specifiche, mentre quelle di tipo II utilizzano una singola sonda e distinguono i due stati attraverso l'incorporazione di nucleotidi differenti durante l'estensione di una singola base. I prodotti vengono successivamente marcati attraverso reazioni che consentono la rilevazione mediante fluorescenza.

(https://support-docs.illumina.com/ARR/Inf_HD_Methylation/Content/ARR/Methylation/Overview_mMeth.htm?searchText=breadchip).

L'ultima fase consiste nella scansione del BeadChip, durante la quale vengono rilevate le intensità dei segnali fluorescenti associati ai diversi siti analizzati. Questi segnali permettono di distinguere la componente metilata (M) da quella non metilata (U). A partire dalle rispettive intensità, attraverso le successive elaborazioni dei dati, viene calcolato per ciascun sito CpG un β-value, compreso tra 0 e 1. I valori prossimi a 0 indicano una bassa proporzione di metilazione, mentre quelli prossimi a 1 indicano una proporzione elevata.

I dati ottenuti dalla scansione sono stati successivamente sottoposti alle procedure di controllo qualità e normalizzazione descritte nei *paragrafi 3.7 e 3.8*, necessarie per ridurre la variabilità tecnica e ottenere dati affidabili per il successivo calcolo degli orologi epigenetici.

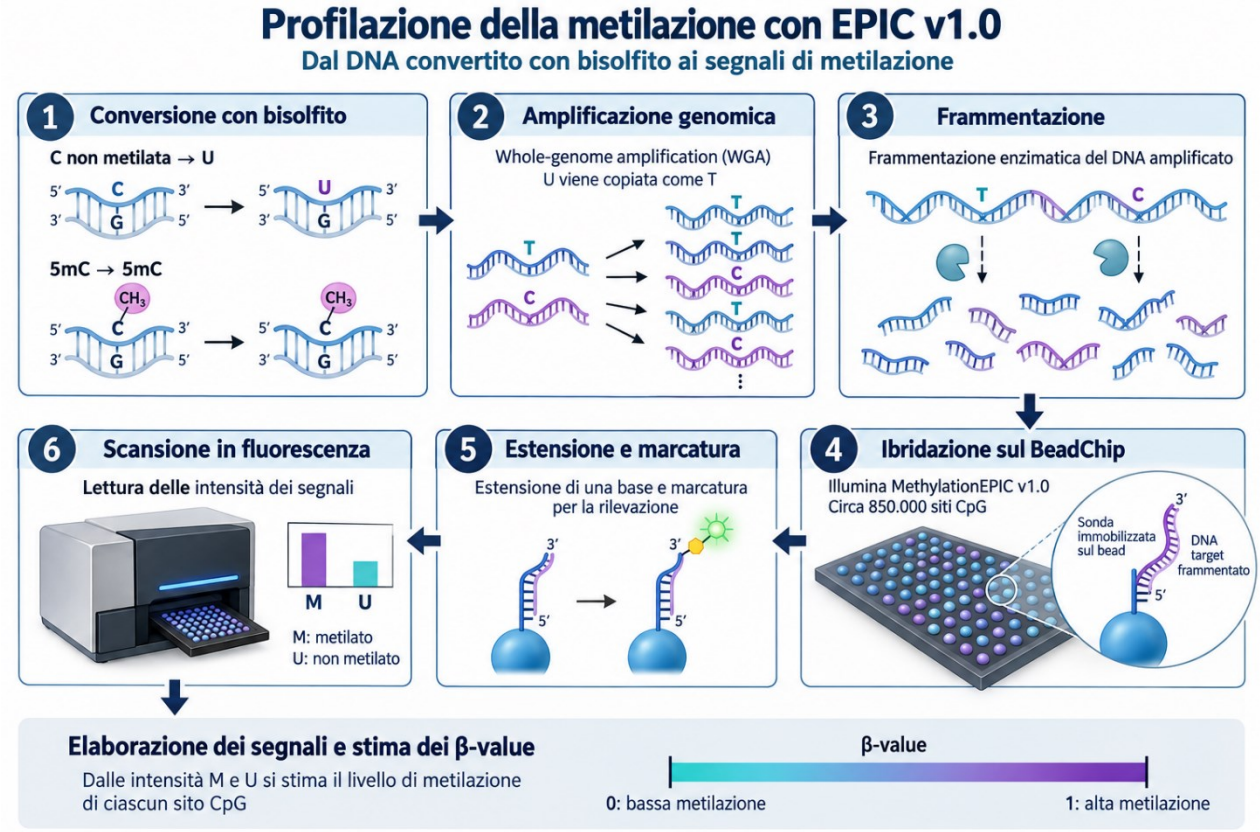


Figura 3.5 Workflow della profilazione della metilazione mediante Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip v1.0: conversione con bisolfito, amplificazione genomica, frammentazione, ibridazione, estensione e marcatura delle sonde, scansione in fluorescenza. L'elaborazione delle intensità dei segnali metilati (M) e non metilati (U) consente di stimare i β-value per ciascun sito CpG.

3.7 Pre-Processing E Controllo Qualità Dei Dati

I dati grezzi di fluorescenza del saggio Infinium MethylationEPIC v1.0 (file IDAT) sono stati elaborati in ambiente R (*v.4.5.2*) mediante il pacchetto Bioconductor minfi (*v.1.56.0*). Il pre-processing bioinformatico è distinto dai controlli strumentali dell'acquisizione: minfi legge le intensità delle sonde e permette controlli automatici a livello di campione e di singolo sito CpG, secondo criteri impostati dall'analista.

La qualità del segnale è stata valutata utilizzando il *detection P-value*, che verifica se l'intensità osservata è distinguibile dal rumore di fondo. Sono state rimosse le sonde con *detection P* > 0,01 in oltre il 5% dei campioni, nonché le sonde non-CpG, cross-reattive, influenzate da polimorfismi (SNP) e localizzate sui cromosomi sessuali. (21), (22), (23), (24)

3.8 Normalizzazione Dei Dati

La procedura bioinformatica dei dati comprende la correzione del fondo mediante Noob (Normal-exponential Out-Of-Band), seguita dalla normalizzazione BMIQ (Beta-Mixture Quantile normalization), impiegata per attenuare le differenze sistematiche tra sonde di tipo I e II. Si tratta di passaggi bioinformatici eseguiti in R e non di correzioni operate autonomamente dallo scanner.

Per ciascun CpG la metilazione può essere espressa come β-value, cioè la quota relativa del segnale metilato rispetto al segnale totale metilato e non metilato, compresa approssimativamente tra 0 e 1 (0: prevalentemente non metilato; 1: prevalentemente metilato). Gli M-value esprimono invece il logaritmo in base 2 del rapporto tra intensità metilata e non metilata, equivalente alla trasformazione logit dei β-value (con gli accorgimenti necessari ai valori estremi). Gli M-value sono stati utilizzati nelle analisi di metilazione differenziale descritte nel protocollo PROMOTERA; per gli orologi epigenetici vengono forniti gli input e le trasformazioni richiesti dai singoli algoritmi. La normalizzazione delle sonde va distinta dalla PCA delle proporzioni leucocitarie utilizzata successivamente come covariata. (10), (25), (26)

3.9 Valutazione Degli Effetti Di Batch

Per effetto di batch si intende una variazione sistematica della metilazione attribuibile a fattori tecnici, ad esempio alla diversa BeadChip (chiamata anche slide) utilizzata per l'analisi, anziché alle caratteristiche biologiche dei soggetti. Nella procedura PROMOTERA il batch è stato definito a livello di slide EPIC v1; i campioni sono stati distribuiti cercando di bilanciare età, sesso e caratteristiche cliniche. La correzione è stata eseguita sugli M-value mediante ComBat (pacchetto sva), preservando nel modello età, sesso e gruppo clinico, per ridurre la possibilità di eliminare variazione biologica di interesse. Dopo la correzione, una *principal component analysis* (PCA) è stata utilizzata per verificare eventuali strutture residue riconducibili alla slide.

La PCA è una rappresentazione esplorativa che permette di valutare la separazione tecnica tra i campioni, ma non costituisce da sola una prova dell'assenza di tutti gli

effetti di batch. La correzione ComBat descritta per PROMOTERA deve essere distinta dall'aggiustamento per composizione leucocitaria nei modelli di mortalità.

3.10 Composizione Cellulare Del Campione Studiato

Il profilo di metilazione misurato nel sangue intero riflette la miscela di tipi leucocitari, caratterizzati da livelli di metilazione differenti.
Di conseguenza, variazioni nella loro frequenza possono introdurre differenze apparenti nei profili epigenetici anche in assenza di modificazioni specifiche in una singola popolazione cellulare. È quindi opportuno stimare la composizione immunitaria e controllarne il contributo nelle analisi statistiche. (https://bioconductor.posit.co/packages/3.23/bioc/html/minfi.html), (27), (28)
Le proporzioni cellulari sono state stimate dai dati di metilazione con il metodo di deconvoluzione *reference-based* di Houseman, implementato in minfi. Sono state considerate sei popolazioni: linfociti T CD4+, linfociti T CD8+, linfociti B, cellule natural killer, monociti e granulociti. Queste stime non equivalgono a una conta cellulare effettuata direttamente con citofluorimetria. Poiché le sei proporzioni sono tra loro correlate e la loro somma è vincolata, è stata eseguita una *principal component analysis* (PCA) sulle proporzioni stimate; le prime due componenti principali (CellPC1 e CellPC2) sono state utilizzate come covariate per descrivere in modo parsimonioso la variabilità della composizione leucocitaria. Questa PCA ha una finalità diversa da quella effettuata sui profili di metilazione per esplorare gli effetti di batch (argomento trattato nel paragrafo precedente 3.9)

3.11 Calcolo Degli Orologi Epigenetici E Standardizzazione

Otto orologi espressi come stime di età (Horvath, Hannum, PhenoAge, GrimAge, GrimAge2, Ying DamAge, Ying AdaptAge e Ying CausAge) sono stati ottenuti mediante il DNA Methylation Age Calculator, utilizzando l'opzione «Advanced Analysis in Blood». Per GrimAge è stata utilizzata la formulazione «BasedOnRealAge». (29)
Questi otto orologi devono essere distinti da DunedinPACE, che misura il ritmo di

invecchiamento anziché stimare un'età in anni. DunedinPACE è stato calcolato separatamente mediante il pacchetto R *dunedinpace* dopo normalizzazione PoAm45, secondo il metodo pubblicato da Belsky et al. (16)
Nel complesso gli orologi considerati nella presente tesi sono quindi nove: otto età epigenetiche e una misura del ritmo di invecchiamento.
Le stime dell'età epigenetica non sono direttamente intercambiabili, perché gli algoritmi sono stati addestrati su differenti obiettivi e set di CpG. In particolare, la formulazione *BasedOnRealAge* di GrimAge deve essere identificata con precisione nella denominazione della variabile analizzata. I valori di DunedinPACE sono invece riportati nella propria scala di ritmo e non in anni. Per ogni algoritmo, la successiva analisi statistica utilizza la forma appropriata del suo output.

Per gli otto clock espressi in anni, l'AAR è stato ricalcolato all'interno del campione analitico come residuo della regressione lineare del valore del clock sull'età cronologica: AAR = valore del clock − (α + β × età). DunedinPACE è stato utilizzato direttamente, senza residualizzazione.
Gli otto AAR e DunedinPACE sono stati successivamente standardizzati mediante il calcolo dello *z-score*, ottenuto sottraendo a ciascun valore la media dell'indicatore nella coorte e dividendo il risultato per la sua deviazione standard (DS). Questa trasformazione permette di ottenere variabili con media zero e deviazione standard unitaria, rendendo confrontabili indicatori originariamente espressi su scale differenti.
Uno *z-score* positivo indica un valore superiore alla media della coorte, mentre uno negativo indica un valore inferiore. Il valore zero corrisponde quindi alla media dell'indicatore nel campione analizzato. La standardizzazione consente inoltre di esprimere le associazioni con la mortalità in relazione all'incremento di una deviazione standard, facilitando il confronto tra i diversi orologi epigenetici.

3.12 Pattern Di Multimorbidità

I pattern sono stati identificati mediante analisi delle classi latenti (*Latent Class Analysis*, LCA) dei 24 indicatori binari di patologia, senza standardizzazione in z-score (30), (31). Per classe latente si intende una caratteristica che non viene

osservata direttamente, ma che può essere ricavata dall'analisi di variabili misurabili. Attraverso il metodo statistico LCA, è stato possibile identificare gruppi di pazienti che presentavano combinazioni ricorrenti di queste patologie. La soluzione a due classi è stata scelta sulla base della minimizzazione del *Bayesian Information Criterion* (BIC) e dell'interpretabilità clinica. La classe 1, di riferimento, comprende 161 partecipanti (55,9%) e presenta un profilo cardio-renale e cardiorespiratorio; la classe 2 comprende 127 partecipanti (44,1%) e presenta un profilo neurovascolare, neurologico e muscoloscheletrico. Il numero medio di diagnosi è rispettivamente 4,9 e 3,7 ($p < 0,001$). La classe è inserita come covariata binaria nei modelli Cox e AUC.

3.13 Analisi Statistica

Le variabili continue sono state descritte mediante media e deviazione standard (DS), mentre quelle categoriche mediante frequenze e percentuali. Il confronto tra pazienti vivi e deceduti è stato effettuato con il test di Mann–Whitney a due code, utilizzando gli Age Acceleration Residuals (AAR) per gli otto orologi espressi in anni e il valore originale per DunedinPACE. Questi confronti, di tipo descrittivo, non considerano la diversa durata del follow-up e non sostituiscono le analisi di sopravvivenza.
Per tenere conto della composizione leucocitaria, le proporzioni stimate delle sei popolazioni cellulari sono state analizzate mediante analisi delle componenti principali (PCA). Il numero di componenti da mantenere è stato determinato attraverso l'analisi parallela di Horn, utilizzando 2.000 permutazioni indipendenti e il 95° percentile degli autovalori ottenuti sotto l'ipotesi nulla come soglia di riferimento. (32)

L'analisi della sopravvivenza è stata effettuata mediante curve Kaplan–Meier, suddividendo i partecipanti in due gruppi per ciascun indicatore standardizzato: $z \geq 0$ e $z < 0$. Per gli orologi espressi in anni sono stati utilizzati gli AAR standardizzati, mentre per DunedinPACE il valore standardizzato del ritmo di invecchiamento. La soglia zero corrisponde alla media dell'indicatore nella coorte. Le curve sono state confrontate mediante il test log-rank a due code sull'intero periodo di osservazione,

riportando p-value nominali.

Per valutare l'associazione tra gli orologi epigenetici e la mortalità a 1, 5 e 10 anni sono stati utilizzati modelli di regressione di Cox. Sono stati confrontati un modello di riferimento (Base), comprendente età, sesso, le prime due componenti della composizione leucocitaria (CellPC1 e CellPC2) e classe latente di multimorbidità, e un modello Base+Clock, ottenuto aggiungendo un singolo indicatore epigenetico standardizzato. Le analisi sono state eseguite separatamente per ciascun orizzonte temporale, considerando come evento il decesso entro 1, 5 o 10 anni e limitando il tempo di osservazione al rispettivo orizzonte. Gli Hazard Ratio (HR) esprimono l'associazione con la mortalità per un incremento di una DS dell'indicatore e sono riportati con intervalli di confidenza al 95% (IC95%). Gli intervalli e i p-value sono stati calcolati mediante le statistiche di Wald. Ciascun modello Base+Clock comprende cinque covariate di aggiustamento e un indicatore epigenetico, senza penalizzazione.

Per valutare se l'aggiunta degli orologi migliorasse la capacità del modello clinico di distinguere i pazienti a diverso rischio di mortalità, sono state calcolate le aree sotto la curva ROC (AUC) dipendenti dal tempo a 1, 5 e 10 anni. È stato utilizzato il metodo *cumulative/dynamic*, con ponderazione per la probabilità inversa di censura (IPCW), che permette di considerare i differenti tempi di osservazione. (33) Le AUC sono state calcolate utilizzando i predittori lineari dei modelli Cox stimati sull'intero follow-up. A ciascun orizzonte, sono stati considerati casi i pazienti deceduti entro il tempo stabilito e controlli quelli sopravvissuti oltre tale limite. Tutte le analisi hanno incluso gli stessi 288 partecipanti.

Il contributo aggiuntivo degli orologi è stato valutato mediante la differenza ΔAUC = AUC(Base+Clock) − AUC(Base). Gli IC95% delle AUC e delle rispettive differenze sono stati ottenuti mediante bootstrap appaiato a livello di partecipante, con 1.200 ricampionamenti (seed 2025). Per ciascun orizzonte sono stati effettuati 15 confronti: nove tra singoli orologi e modello Base, tre tra GrimAge, GrimAge2 e DunedinPACE, due tra GrimAge2 e gli orologi di prima generazione e uno tra DunedinPACE e Horvath. I p-value nominali sono stati stimati mediante approssimazione normale a due code, utilizzando la differenza osservata e il relativo errore standard bootstrap. Per controllare i confronti multipli è stata

applicata la correzione del *False Discovery Rate* (FDR) secondo Benjamini–Hochberg, separatamente per ciascun orizzonte temporale.
Per i modelli Base e Base+DunedinPACE è stata inoltre applicata una correzione dell'ottimismo mediante 1.200 ricampionamenti bootstrap. A ogni ricampionamento, i coefficienti del modello sono stati nuovamente stimati e l'ottimismo è stato calcolato come differenza tra l'AUC ottenuta nel campione bootstrap e quella valutata nel campione originale, utilizzando lo stesso modello e metodo IPCW. L'ottimismo medio è stato quindi sottratto dall'AUC apparente, per ridurre la sovrastima delle prestazioni dovuta alla valutazione del modello sui dati utilizzati per svilupparlo. Questa procedura è distinta dal bootstrap impiegato per calcolare gli intervalli di confidenza.

Le analisi di sensibilità hanno inoltre considerato i sette decessi verificatisi entro 30 giorni dal ricovero e un modello alternativo di aggiustamento per la composizione leucocitaria, nel quale le due componenti principali sono state sostituite da cinque proporzioni cellulari, escludendo i granulociti.
Le analisi di mortalità sono state eseguite in Python 3 mediante statsmodels, scikit-learn, SciPy e un'implementazione diretta dell'AUC IPCW. Per l'analisi parallela è stato utilizzato il seed 20250923. La soglia di significatività nominale è stata fissata a $p < 0,05$ e, per i confronti AUC corretti per test multipli, a $q < 0,05$.

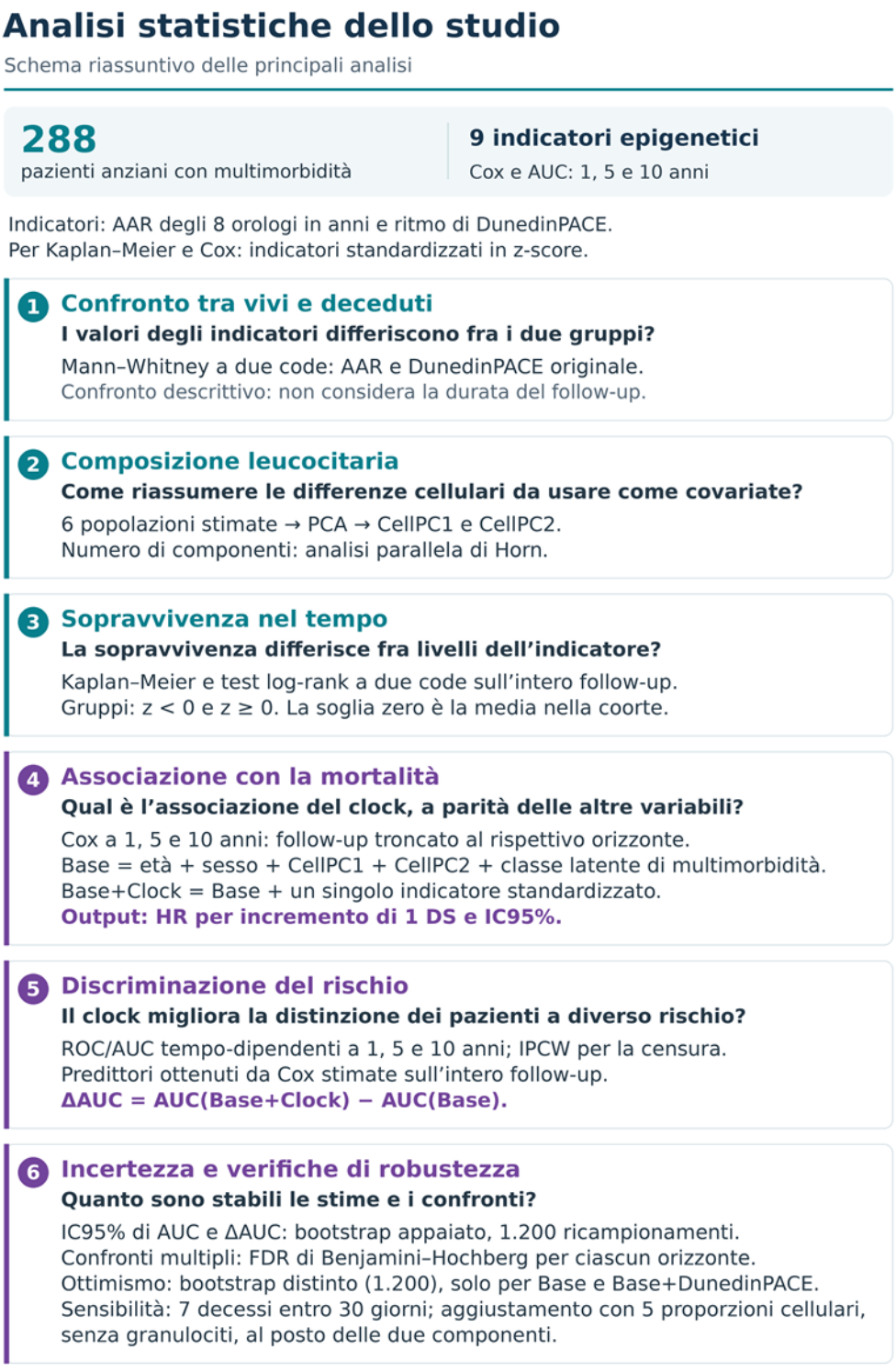


Figura 3.6 Schema riassuntivo delle principali analisi statistiche dello studio. Elaborazione originale basata sulla metodologia descritta nel paragrafo 3.13. AAR:residui di accelerazione dell'età epigenetica; DS: deviazione standard;HR: hazard ratio; IC95%: intervallo di confidenza al 95%; AUC: area sotto la curva ROC.

4 RISULTATI

4.1 Idoneità Dei Campioni Di Dna

Tutti i 288 campioni di DNA preparati sono risultati idonei alla metilazione, mediante Illumina Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip, in seguito ai controlli qualità.

4.2 Valutazione Della Qualità Del Saggio EPIC v1.0

La valutazione di qualità è stata effettuata su 96 campioni per i quali era disponibile il report dei controlli interni del saggio Infinium, distribuiti su 12 BeadChip. L'analisi ha considerato 20 indicatori relativi alle principali fasi del processo analitico, comprendenti colorazione, estensione, ibridazione, rimozione del target, conversione con bisolfito, specificità e controlli non polimorfici.

Nei 96 campioni esaminati, tutti gli indicatori presentavano valori superiori alle soglie standard di riferimento Illumina, senza dati mancanti. Complessivamente, le 1.920 valutazioni effettuate (20 indicatori per ciascuno dei 96 campioni) hanno quindi mostrato un esito favorevole, documentando la buona qualità tecnica delle fasi sperimentali monitorate.

I controlli di colorazione mostravano valori mediani di 188,50 nel canale verde e 125,80 nel canale rosso. I canali verde e rosso corrispondono ai due canali di fluorescenza acquisiti dallo scanner Illumina per rilevare i segnali generati dalle sonde; non indicano due campioni diversi né, da soli, due popolazioni biologiche. Le intensità dei canali sono combinate secondo il disegno delle sonde Infinium e il sistema di lettura per ricostruire il segnale di metilazione.

Inoltre i canali di estensione presentavano mediane rispettivamente di 36,05 e 19,00. Anche i valori minimi risultavano superiori alla soglia di riferimento di 5. I rapporti di ibridazione tra segnali ad alta e media concentrazione e tra segnali a media e bassa concentrazione mostravano mediane di 1,90 e 2,10, superiori alla soglia di 1 in tutti i campioni. I due controlli di rimozione del target presentavano mediane di 10,55 e 8,60, anch'esse compatibili con un'adeguata esecuzione della procedura.

I controlli di conversione con bisolfito hanno fornito risultati coerenti con un'adeguata conversione del DNA. Gli indicatori di tipo I presentavano mediane di 18,85 nel canale verde e 5,90 nel canale rosso, mentre l'indicatore di tipo II mostrava una mediana di 7,20. Tutti i valori, inclusi quelli degli indicatori associati al background, superavano le rispettive soglie di riferimento.

Anche i controlli di specificità hanno mostrato risultati favorevoli, con mediane di 16,20 e 6,10 per gli indicatori di tipo I nei canali verde e rosso e di 39,20 per l'indicatore di tipo II. Infine, i controlli non polimorfici presentavano mediane di 8,00 nel canale verde e 19,30 nel canale rosso, con valori superiori alla soglia di 5 in tutti i campioni.

Dopo il filtraggio delle sonde, la matrice finale comprendeva 756.341 siti CpG, utilizzati per le successive elaborazioni. Il numero descrive la matrice filtrata per l'analisi e non implicava, da solo, la disponibilità di ogni CpG richiesto da ciascun orologio.

4.3 Valutazione Degli Effetti Di Batch

L'analisi esplorativa delle componenti principali (PCA) non ha mostrato una separazione sistematica dei campioni in relazione alle due piastre impiegate. Questo risultato non suggerisce effetti di batch rilevanti associati alla piastra nella valutazione effettuata.

La valutazione esplorativa della PCA viene effettuata dopo la correzione del batch con ComBat; pertanto l'interpretazione corretta è l'assenza di una marcata struttura residua dopo la procedura di correzione.

4.4 Relazione Tra Orologi Epigenetici Ed Età Cronologica

Per valutare la relazione tra gli orologi epigenetici e l'età cronologica dei partecipanti, sono stati confrontati i valori originali dei nove indicatori con l'età anagrafica dei 288 pazienti inclusi nello studio. La Figura 4.1 mostra la distribuzione dei valori e le rispettive rette di regressione lineare, mentre i coefficienti di correlazione di Pearson (r) indicano l'intensità dell'associazione lineare tra ciascun indicatore e l'età cronologica.

Tutti gli orologi hanno mostrato una correlazione positiva con l'età, sebbene con intensità differenti. Le correlazioni più elevate sono state osservate per DNAmGrimAge (r = 0,728), DNAmAgeHannum (r = 0,718), DNAmGrimAge2 (r = 0,689) e YingCausAge (r = 0,660). Correlazioni positive di entità intermedia sono state rilevate per DNAmAge di Horvath (r = 0,616) e DNAmPhenoAge (r = 0,568), mentre YingDamAge (r = 0,437) e YingAdaptAge (r = 0,377) hanno mostrato associazioni più deboli.
DunedinPACE ha presentato la correlazione più bassa (r = 0,237), evidenziando una relazione lineare debole con l'età cronologica.

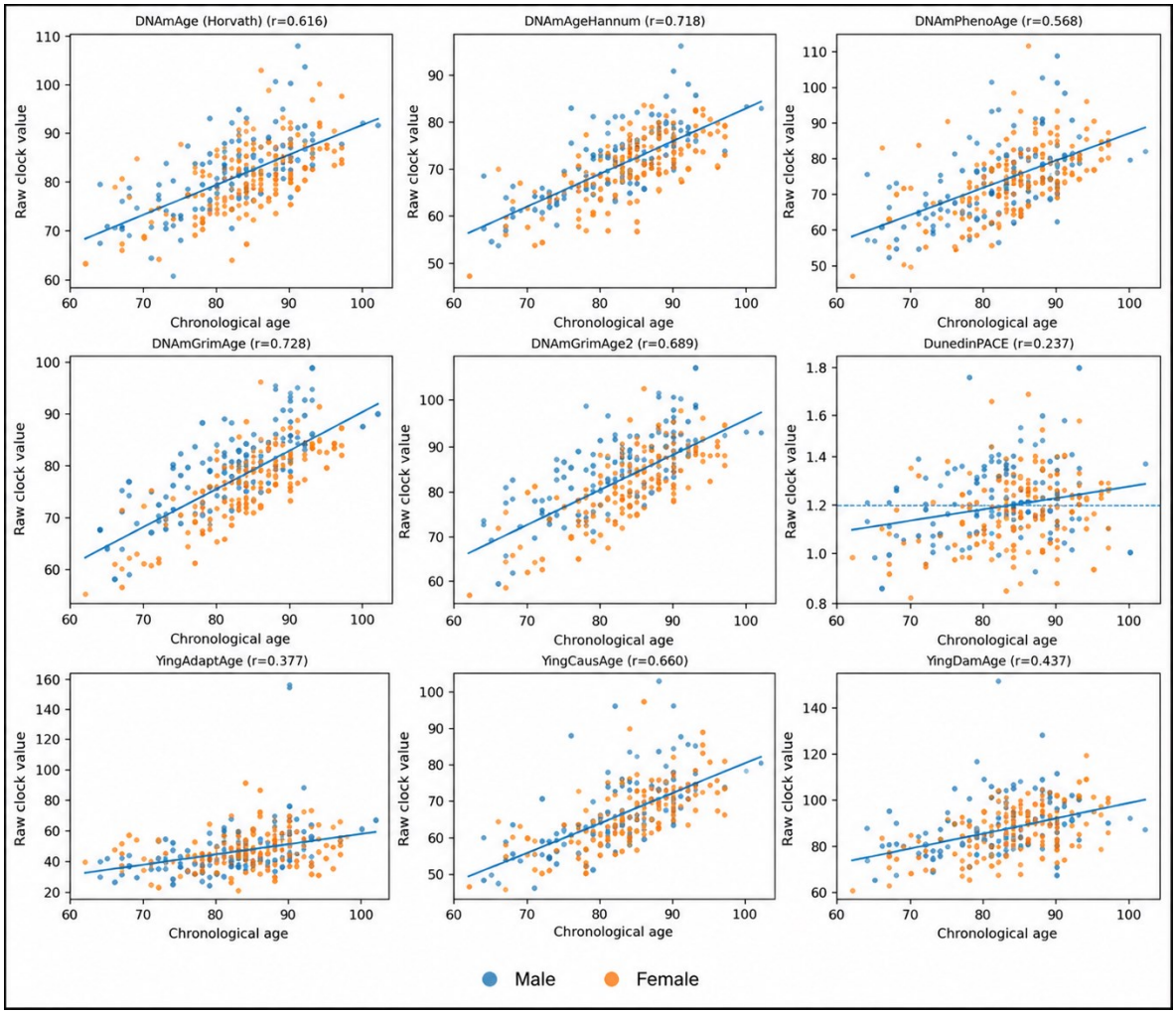


Figura 4.1 Relazione tra i valori originali dei nove orologi epigenetici e l'età cronologica dei partecipanti. Ogni punto rappresenta un paziente della coorte (N = 288), distinto per sesso: blu per i maschi e arancione per le femmine. Le linee continue rappresentano le rette di regressione lineare calcolate sull'intero campione. I coefficienti di Pearson (r) riportati nei singoli grafici indicano l'intensità di correlazione lineare tra il valore dell'orologio e l'età cronologica. Nel grafico relativo a DunedinPACE, la linea orizzontale tratteggiata indica il valore medio dell'indicatore della coorte (circa 1,23).

4.5 Confronto Degli AAR Tra Pazienti Vivi E Deceduti

Dopo aver esaminato la relazione tra gli orologi epigenetici e l'età cronologica, è stato effettuato un confronto dei nove indicatori tra i pazienti vivi e quelli deceduti al termine del periodo di osservazione. Dei 288 partecipanti inclusi nello studio, 56 risultavano vivi e 232 deceduti. Per gli orologi espressi in anni, il confronto è stato effettuato utilizzando i residui di accelerazione epigenetica (AAR), mentre DunedinPACE è stato analizzato attraverso il suo valore originale, essendo un indicatore del ritmo di invecchiamento.

Tra i nove indicatori considerati, GrimAge, GrimAge2 e DunedinPACE hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i due gruppi. In particolare, GrimAge e GrimAge2 presentavano valori medi di AAR più elevati nei pazienti deceduti rispetto ai sopravvissuti, indicando una maggiore accelerazione epigenetica media rispetto a quella attesa per l'età cronologica. Analogamente, DunedinPACE mostrava valori medi superiori nei pazienti deceduti, suggerendo un ritmo di invecchiamento più elevato in questo gruppo. Gli altri sei indicatori non hanno evidenziato differenze statisticamente significative.

La Tabella 4.1 riporta i valori medi, le deviazioni standard e i livelli di significatività statistica dei tre indicatori per i quali sono state osservate differenze significative.

Tabella 4.1 Indicatori con differenze significative nel confronto descrittivo tra vivi (n = 56) e deceduti (n = 232). I p-value derivano dal test di Mann–Whitney e non tengono conto della diversa durata del follow-up. La tabella completa degli indicatori (Tabella A.1) è in Appendice A.

OROLOGIO	VIVI	DECEDUTI	p
GrimAge (AAR, media ± DS)	−1,44 ± 5,75	0,35 ± 4,79	0,008
GrimAge2 (AAR, media ± DS)	−1,65 ± 6,32	0,40 ± 5,15	0,008
DunedinPACE (media ± DS)	1,16 ± 0,16	1,24 ± 0,14	<0,001

Questi risultati evidenziano differenze nei valori degli indicatori epigenetici in relazione allo stato vitale dei partecipanti. Tuttavia, il confronto è di tipo descrittivo e non considera la diversa durata del periodo di osservazione dei singoli pazienti, né l'influenza di altre caratteristiche cliniche. Non permette quindi, da solo, di stabilire il contributo prognostico indipendente dei singoli orologi. Per approfondire tale relazione sono state successivamente effettuate le analisi di sopravvivenza Kaplan–Meier e i modelli di regressione di Cox.

4.6 Analisi Di Sopravvivenza Kaplan–Meier

Per esaminare il rapporto tra orologi epigenetici e sopravvivenza, i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi per ciascun indicatore, in base al valore standardizzato superiore o inferiore alla media. Le curve Kaplan–Meier hanno mostrato differenze significative per GrimAge ($p = 0,002$), GrimAge2 ($p = 0,001$) e DunedinPACE ($p < 0,001$). Anche PhenoAge ha mostrato una differenza nominalmente significativa ($p = 0,029$), mentre per gli altri indicatori non sono emerse differenze significative (Figura 4.2).

Queste analisi descrivono la sopravvivenza dei gruppi, ma non considerano simultaneamente le altre caratteristiche cliniche dei pazienti. Per questo motivo sono state integrate con la regressione di Cox.

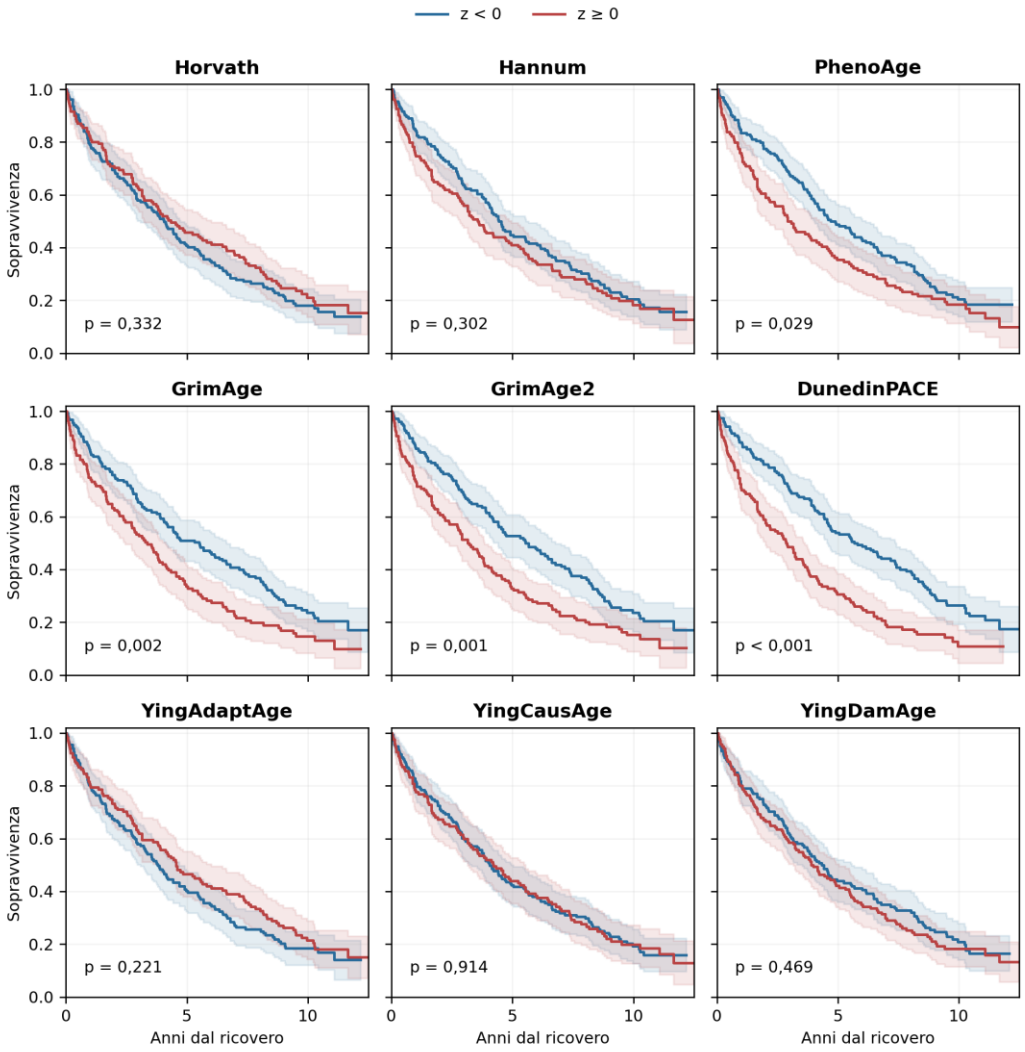


Figura 4.2 Curve di sopravvivenza Kaplan–Meier relative ai nove indicatori epigenetici, suddivisi in due gruppi in base al valore standardizzato: inferiore alla media (z < 0, blu) o uguale/superiore alla media (z ≥ 0, rosso). Per gli otto orologi espressi in anni sono stati utilizzati gli Age Acceleration Residuals (AAR) standardizzati, mentre DunedinPACE è stato standardizzato senza residualizzazione. Il tempo è espresso in anni dal ricovero. Le aree ombreggiate rappresentano gli intervalli di confidenza puntuali al 95%, calcolati mediante la varianza di Greenwood. I p-value riportati nei grafici derivano dal test log-rank e sono nominali.

4.7 Associazione Tra Orologi Epigenetici E Mortalità: Regressione Di Cox

La regressione di Cox è stata utilizzata per valutare l'associazione tra ciascun orologio epigenetico e la mortalità a 1, 5 e 10 anni, tenendo conto dell'età, del sesso, della composizione leucocitaria e dei pattern di multimorbidità.

Per considerare l'influenza della composizione leucocitaria, nei modelli sono state

utilizzate le componenti principali ottenute dall'analisi delle sei popolazioni cellulari precedentemente stimate. La selezione delle componenti è stata effettuata mediante l'analisi parallela di Horn, descritta nel paragrafo 3.13. Gli autovalori osservati per PC1 e PC2 erano rispettivamente 2,489 e 1,184, superiori alle soglie di riferimento di 1,283 e 1,158. Al contrario, PC3 presentava un autovalore di 1,027, inferiore alla soglia di 1,078. Sono state pertanto mantenute le prime due componenti, denominate CellPC1 e CellPC2, che spiegano complessivamente il 61,0% della variabilità della composizione leucocitaria considerata. La loro selezione è stata effettuata indipendentemente dall'esito di mortalità.

Nei modelli così aggiustati, GrimAge, GrimAge2 e DunedinPACE sono risultati significativamente associati alla mortalità in tutti e tre gli orizzonti temporali considerati. Al contrario, gli orologi di prima generazione Horvath e Hannum e i tre indicatori di Ying non hanno mostrato associazioni statisticamente significative nei modelli principali.

La Tabella 4.2 riporta gli hazard ratio (HR) e i relativi intervalli di confidenza al 95% dei tre orologi epigenetici risultati significativamente associati alla mortalità, mentre la Figura 4.3 presenta il confronto completo dei nove indicatori.

Gli HR si riferiscono all'incremento di una deviazione standard dell'indicatore epigenetico.

Tabella 4.2 Hazard ratio (HR) e intervalli di confidenza al 95% dei tre orologi associati significativamente alla mortalità nei modelli principali. Gli HR sono riferiti all'aumento di una deviazione standard dell'orologio. Un HR superiore a 1 indica un'associazione con un rischio istantaneo di decesso più elevato; non dimostra causalità. Le stime complete degli altri orologi (Tabella A.2) sono in Appendice A.

Indicatore	1 anno: HR (IC95%)	5 anni: HR (IC95%)	10 anni: HR (IC95%)
GrimAge	1,45 (1,06–1,98)	1,29 (1,08–1,54)	1,29 (1,10–1,51)
GrimAge2	1,68 (1,24–2,27)	1,35 (1,13–1,60)	1,33 (1,14–1,56)
DunedinPACE	1,52 (1,18–1,95)	1,25 (1,07–1,46)	1,27 (1,11–1,45)

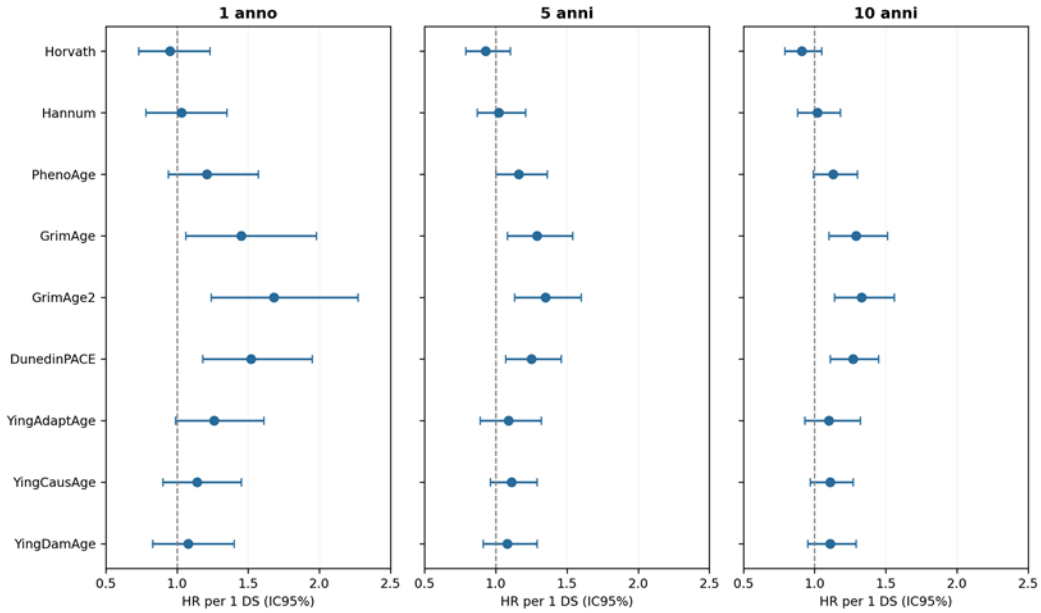


Figura 4.3 Hazard Ratio (HR) e relativi intervalli di confidenza al 95% dei nove orologi epigenetici, calcolati mediante regressione di Cox a 1, 5 e 10 anni. Le stime sono riferite all'incremento di una deviazione standard (DS) dell'indicatore e derivano da modelli aggiustati per età, sesso, composizione leucocitaria (CellPC1 e CellPC2) e classe latente di multimorbidità. La linea verticale tratteggiata indica HR = 1, corrispondente all'assenza di associazione. I punti rappresentano le stime degli HR, mentre le barre orizzontali indicano gli intervalli di confidenza al 95%.

4.8 Contributo Degli Orologi Alla Discriminazione Del Rischio

È stato infine valutato se aggiungere ciascun orologio a un modello basato sulle caratteristiche cliniche migliorasse la capacità di distinguere i pazienti con diverso esito di sopravvivenza. Tale capacità è stata espressa mediante l'area sotto la curva (AUC), calcolata a 1, 5 e 10 anni.

A 1 anno DunedinPACE e GrimAge2 hanno mostrato un miglioramento della discriminazione che è rimasto significativo dopo la correzione per confronti multipli. A 5 anni nessun incremento di AUC è risultato chiaramente supportato dagli intervalli di confidenza. A 10 anni soltanto DunedinPACE ha mostrato un miglioramento statisticamente supportato rispetto al modello clinico di riferimento.

Tabella 4.3 Sintesi delle AUC a 10 anni. Il modello clinico comprende età, sesso, due componenti della composizione leucocitaria e classe di multimorbidità. Le AUC sono stime apparenti; il risultato di DunedinPACE è supportato anche dopo correzione FDR (q = 0,028).

Modello a 10 anni	AUC	Incremento rispetto al modello base
Modello clinico di riferimento	0,833	—
Modello clinico + GrimAge	0,835	+0,002
Modello clinico + GrimAge2	0,842	+0,008
Modello clinico + DunedinPACE	0,864	+0,031 (IC95% +0,011–+0,053)

Nel complesso, le analisi indicano che un'associazione con la mortalità non comporta necessariamente un miglioramento apprezzabile della capacità predittiva. Tra i nove indicatori considerati, DunedinPACE ha fornito il contributo aggiuntivo più persistente, sebbene di entità contenuta.

5 DISCUSSIONE

5.1 Significato Dei Risultati Nella Popolazione Studiata

Questo studio ha confrontato nove indicatori epigenetici in una coorte di pazienti anziani ospedalizzati con multimorbidità. I risultati mostrano che GrimAge, GrimAge2 e DunedinPACE sono associati alla mortalità anche dopo aver considerato alcune importanti caratteristiche cliniche. L'osservazione suggerisce che la metilazione del DNA possa fornire informazioni complementari sull'eterogeneità dell'invecchiamento in questa popolazione, senza dimostrare che le modificazioni epigenetiche siano direttamente responsabili del decesso.

5.2 Differenze Tra Gli Orologi Epigenetici

Le differenze osservate tra gli orologi epigenetici possono essere interpretate considerando i diversi obiettivi per cui sono stati sviluppati. Gli orologi di prima generazione, come Horvath e Hannum, sono stati progettati principalmente per stimare l'età cronologica, mentre GrimAge e GrimAge2 incorporano informazioni epigenetiche associate alle condizioni di salute e alla mortalità. DunedinPACE, invece, è stato sviluppato per stimare il ritmo dell'invecchiamento biologico e non un'età espressa in anni. (9), (11), (12-14), (16)

Queste differenze contribuiscono a interpretare le correlazioni osservate con l'età cronologica. In particolare, DunedinPACE ha mostrato la correlazione più debole ($r = 0,237$), coerentemente con la sua diversa finalità. Una correlazione meno elevata con l'età anagrafica non indica necessariamente una minore capacità di descrivere i processi di invecchiamento. Allo stesso modo, una correlazione più forte non implica automaticamente una maggiore capacità di predire la mortalità.

Nella coorte analizzata, GrimAge, GrimAge2 e DunedinPACE sono risultati significativamente associati alla mortalità nei modelli aggiustati, mentre gli orologi di prima generazione e quelli sviluppati da Ying et al. non hanno mostrato associazioni significative. Questi risultati evidenziano che la capacità di stimare l'età cronologica e quella di fornire informazioni sul rischio di mortalità rappresentano caratteristiche differenti degli orologi epigenetici. La mancanza di

un'associazione significativa con la mortalità non esclude quindi il valore biologico degli altri indicatori, che possono descrivere aspetti differenti dell'invecchiamento.

5.3 Contributo Aggiuntivo E Possibili Implicazioni

Il risultato più rilevante riguarda DunedinPACE. La sua aggiunta al modello clinico ha migliorato la discriminazione della mortalità a 1 e 10 anni. A 10 anni l'AUC è passata da 0,833 a 0,864, con un incremento di 0,031. Il miglioramento è statisticamente supportato, ma modesto: non permette quindi di proporre l'impiego dell'indicatore per decisioni cliniche individuali sulla base di questi soli dati.

L'osservazione che GrimAge e GrimAge2 siano associati alla mortalità, pur senza migliorare stabilmente l'AUC ai diversi orizzonti temporali, evidenzia la differenza tra identificare un'associazione e ottenere un effettivo guadagno nella previsione. Ulteriori studi potranno chiarire se tali marcatori siano utili in combinazione con strumenti clinici più completi.

5.4 Ruolo Delle Condizioni Cliniche E Limiti Dello Studio

La multimorbidità e la composizione delle cellule del sangue possono influenzare il rapporto tra metilazione e mortalità. Le analisi hanno tenuto conto dei due gruppi di multimorbidità e di stime della composizione leucocitaria, ma non possono eliminare tutte le possibili influenze delle condizioni cliniche. In particolare, non sono state incluse direttamente nei modelli tutte le misure della gravità della malattia acuta e dell'infiammazione.

Tra i principali limiti rientrano la numerosità di 288 pazienti, la provenienza da un unico centro, la misurazione della metilazione in un solo momento e la valutazione della mortalità per tutte le cause. Le stime a lungo termine richiedono inoltre cautela per il numero limitato di pazienti osservati oltre i 10 anni. I risultati necessitano quindi di conferma in coorti indipendenti.

5.5 Rilevanza Delle Procedure Di Laboratorio

L'affidabilità degli indicatori epigenetici dipende dalla qualità dei campioni biologici e dalla corretta esecuzione delle procedure preanalitiche, analitiche e delle successive elaborazioni dei dati. In questo studio, la preparazione dei campioni, l'estrazione del DNA e la verifica della sua idoneità hanno rappresentato passaggi fondamentali per la successiva analisi della metilazione.

Durante l'estrazione, la presenza di campioni con coaguli visibili o con volumi di sangue ridotti ha richiesto alcuni adattamenti al protocollo standard, tra cui l'aumento della quantità di proteinasi K nella fase di lisi. Questi interventi sono stati effettuati per favorire il processamento di campioni con caratteristiche non ottimali.

Tutti i campioni di DNA ottenuti sono risultati idonei per la profilazione della metilazione con l'EPIC v1.0, confermando la possibilità di utilizzare il materiale biologico disponibile per le successive analisi. Tuttavia, non è possibile attribuire questo risultato a una specifica modifica della procedura.

La qualità del DNA estratto rappresenta soltanto una delle condizioni necessarie per ottenere dati di metilazione affidabili. Alla standardizzazione delle procedure di laboratorio devono infatti seguire il controllo bioinformatico dei dati grezzi contenuti nei file IDAT, la correzione del segnale di fondo e la valutazione di eventuali differenze tecniche tra le piastre di analisi. Questi passaggi consentono di individuare possibili fonti di variabilità tecnica e di ridurne l'influenza sulle successive stime degli orologi epigenetici.

A supporto della qualità analitica, i controlli strumentali effettuati su un sottoinsieme di 96 campioni hanno mostrato risultati favorevoli rispetto ai parametri valutati. Tale risultato fornisce un'ulteriore evidenza della qualità tecnica del saggio nei campioni esaminati, senza estendere automaticamente questa valutazione specifica all'intera coorte.

CONCLUSIONI

Il lavoro svolto in laboratorio ha consentito di ottenere campioni di DNA idonei alla profilazione della metilazione e di esaminare, nell'ambito di uno studio più ampio, il rapporto tra nove indicatori epigenetici e mortalità in pazienti anziani ospedalizzati con multimorbidità.

Il lavoro di analisi ha permesso di concludere che tra i nove orologi biologici, GrimAge, GrimAge2 e DunedinPACE sono risultati associati alla mortalità a 1, 5 e 10 anni nei modelli aggiustati. DunedinPACE ha mostrato il contributo aggiuntivo più persistente alla discriminazione del rischio, pur con miglioramenti contenuti. Questi risultati sostengono l'interesse degli orologi epigenetici come strumenti di ricerca sull'invecchiamento, ma non ne dimostrano ancora l'utilità per decisioni cliniche individuali.

Dal punto di vista tecnico-laboratoristico, lo studio evidenzia l'importanza delle procedure di preparazione e controllo di qualità del DNA come presupposto per analisi molecolari complesse e per la successiva interpretazione dei dati.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Bochtler K, Houta S. eHealth Approaches to Multimorbidity Management: Scoping Review of Interventions and Multidisease Strategies. Online J Public Health Inform. 2026; 18(1): e88021.

2. Zhang Y, Ebeling M, Schmidt-Mende K, Drefahl S, Modig K. Slowing disease accumulation but persistent complexity: population-level multimorbidity dynamics in old age. Age and Ageing. 2026; 55(9): afag268.

3. Piacenza F, Di Rosa M, Fedecostante M, Madotto F, Montesanto A, Corsonello A, et al. Improving the prognostic value of multimorbidity through the integration of selected biomarkers to the comprehensive geriatric assessment: An observational retrospective monocentric study. Frontiers in Medicine. 2022; 9: 999767.

4. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. Genes and Development. 2011; 25(10): 1010-1022.

5. Sergeeva A, Davydova K, Perenkov A, Vedunova M. Mechanisms of human DNA methylation, alteration of methylation patterns in physiological processes and oncology. Gene. 2023; 875: 147487.

6. Jones M, Goodman S, Kobor M. DNA methylation and healthy human aging. Aging Cells. 2015; 14(6): 924-932.

7. Kalyakulina A, Yusipov I, Trukhanov A, Franceschini C, Moskalev A, Ivanchenko M. EpInflammAge: Epigenetic-Inflammatory Clock for Disease-Associated Biological Aging Based on Deep Learning. Int. J. of Molecular Sciences. 2025; 26(13): 6284.

8. Lim U, Song M. DNA Methylation as a Biomarker of Aging in Epidemiologic Studies. Methods in Molecular Biology. 2018; 1856: 219-231.

9. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biology. 2013; 14(10): R115.

10. Du P, Zhang X, Huang CC, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. BMC Bioinformatics. 2010; 11: 587.

11. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. Molecular Cell. 2013; 49(2): 359-367.

12. Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assismes TL, Bandinelli S, et al. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. Aging. 2018; 10(4): 573-591.

13. Lu AT, Quach A, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Raj K, et al. DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. Aging. 2019; 11(2): 303-327.

14. Lu AT, Binder AM, Zhang J, Yan Q, Reiner AP, Cox SR, et al. DNA methylation GrimAge version 2. Aging. 2022; 14(23): 9484-9549.

15. Chen BH, Marioni RE, Colicino E, Peters MJ, Ward-Caviness CK, Tsai PC, et al. DNA methylation-based measures of biological age: meta-analysis predicting time to death. Aging. 2016; 8(9): 1844-1865.

16. Belsky DW, Caspi A, Corcoran DL, Sugden K, Poulton R, Arseneault L, et al. DunedinPACE, a DNA methylation biomarker of the pace of aging. e.Life. 2022; 11: e73420.

17. Ying K, Liu H, Tarkhov AE, Sadler MC, Lu AT, Moqri M, et al. Causality-enriched epigenetic age uncouples damage and adaptation. nature aging. 2024; 4: 231-246.

18. Bustacchini S, Abbatecola AM, Bonfigli AR, Chiatti C, Corsonello A, Di Stefano G, et al. The Report-AGE project: a permanent epidemiological observatory to identify clinical and biological markers of health outcomes in

elderly hospitalized patients in Italy. Aging Clin Exp Res. 2015; 27(6): 893-901.

19. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. Epigenomics. 2016; 8(3): 389-99.

20. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence GM, Risbridger GP, Molloy P, et al. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. Genome Biol. 2016; 17(1): 208.

21. Fortin JP, Triche Jr TJ, Hansen KD. Preprocessing, normalization and integration of the Illumina HumanMethylationEPIC array with minfi. Bioinformatics. 2017; 33(4): 558-560.

22. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. Bioinformatics. 2014; 30(10): 1363-9.

23. Chen Ya, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. Epigenetics. 2013; 8(2): 203-9.

24. McCartney DL, Walker RM, Morris SW, McIntosh AM, Porteous DJ, Evans KL. Identification of polymorphic and off-target probe binding sites on the Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip. Genom Data. 2016; 9: 22-4.

25. Triche Jr TJ, Weisenberger DJ, Berg DVD, Laird PW, Siegmund KD. Low-level processing of Illumina Infinium DNA Methylation BeadArrays. Nucleic Acids Res. 2013; 41(7): e90.

26. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, et al. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. Genome Biol. 2014; 15(12): 503.

27. Houseman EA, Accomando P, Koestler C, Christensen BC, Marsit CJ, Nelson HH, et al. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. BMC Bioinformatics. 2012; 13: 86.

28. Reinius LE, Greco D, Acevedo N, Joerink M, Pershagen G, Dahlén SE, et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. PLoS One. 2012; 7(7): e41361.

29. Pelegí-Sisó D, de Prado P, Ronkainen J, Bustamante M, González JR. methylclock: a Bioconductor package to estimate DNA methylation age. Bioinformatics. 2021; 37(12): 1759-1760.

30. Formann AK, Kohlmann T. Latent class analysis in medical research. Stat Methods Med Res. 1996; 5(2): 179-211.

31. Linzer DA, Lewis JB. poLCA: An R Package for Polytomous Variable Latent Class Analysis. Journal of Statistical Software. 2011; 42(10).

32. Horn JL. A RATIONALE AND TEST FOR THE NUMBER OF FACTORS IN FACTOR ANALYSIS. Psychometrika. 1965; 30: 179-85.

33. Blanche P, Dartigues JF, Jacqmin-Gadda H. Estimating and comparing time-dependent areas under receiver operating characteristic curves for censored event times with competing risks. Stat Med. 2013; 32(30): 5381-97.

SITOGRAFIA

- https://dnamage.clockfoundation.org
- https://www.illumina.com
- https://www.illumina.com/search.html?q=Automated%20bisulfite%20conversion%20for%20Infinium%20Methylation%20BeadChips.&filter=all&p=1
- https://www.qiagen.com/it/resources/kithandbook/hb-0329-007-hb-qiaamp-dna-mini-blood-mini-0725-ww
- https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiaamp-dsp-dna-blood-mini-kit
- https://www.eppendorf.com/kr-en/lab-academy/life-science/cell-biology/uv-vis-spectrophotometry-easy-and-quick-quantification-of-nucleic-acids/
- https://files.zymoresearch.com/protocols/_d5005_d5006_ez_dna_methylation-goldga_o_kit.pdf
- https://support-docs.illumina.com/ARR/Inf_HD_Methylation/Content/ARR/Methylation/Overview_mMeth.htm?searchText=breadchip
- https://bioconductor.posit.co/packages/3.23/bioc/html/minfi.html

APPENDICE A

Tabella A.1 Output grezzi degli orologi e AAR ricalcolati nella coorte, per stato vitale all'ultima osservazione.

INDICATORE	GREZZO TOTALE	GREZZO VIVI	GREZZO DECEDUTI	AAR totale	AAR vivi	AAR deceduti	p
Horvath	81,56 ± 7,44	78,42 ± 6,74	82,31 ± 7,41	0,00 ± 5,86	0,30 ± 5,02	-0,07 ± 6,05	0,433
Hannum	71,31 ± 7,22	66,72 ± 7,64	72,41 ± 6,68	0,00 ± 5,04	-0,70 ± 5,26	0,17 ± 4,98	0,471
PhenoAge	74,40 ± 10,02	68,52 ± 9,08	75,82 ± 9,72	0,00 ± 8,25	-1,61 ± 8,08	0,39 ± 8,26	0,101
GrimAge	78,34 ± 7,34	72,88 ± 7,97	79,65 ± 6,55	0,00 ± 5,03	-1,44 ± 5,75	0,35 ± 4,79	0,008
GrimAge2	84,38 ± 7,53	78,83 ± 8,29	85,72 ± 6,69	0,00 ± 5,44	-1,65 ± 6,32	0,40 ± 5,15	0,008
DunedinPACE	1,23 ± 0,15	1,16 ± 0,16	1,24 ± 0,14	—	—	—	<0,001
YingAdaptAge	53,10 ± 13,54	48,53 ± 9,33	54,20 ± 14,17	0,00 ± 12,54	-0,74 ± 7,89	0,18 ± 13,43	0,944
YingCausAge	67,53 ± 8,98	62,33 ± 8,12	68,79 ± 8,73	0,00 ± 6,74	-0,75 ± 5,95	0,18 ± 6,92	0,643
YingDamAge	88,66 ± 10,87	83,43 ± 8,83	89,93 ± 10,95	0,00 ± 9,77	-1,67 ± 7,57	0,40 ± 10,21	0,256

Tabella A.2 HR per incremento di una DS dell'indicatore epigenetico nelle Cox aggiustate.

Indicatore	N	1 anno: HR (IC95%)	5 anni: HR (IC95%)	10 anni: HR (IC95%)
DNAmAge (Horvath)	288	0,95 (0,73–1,23)	0,93 (0,79–1,10)	0,91 (0,79–1,05)
DNAmAgeHannum	288	1,03 (0,78–1,35)	1,02 (0,87–1,21)	1,02 (0,88–1,18)
DNAmPhenoAge	288	1,21 (0,94–1,57)	1,16 (1,00–1,36)	1,13 (0,99–1,30)
DNAmGrimAge	288	1,45 (1,06–1,98)	1,29 (1,08–1,54)	1,29 (1,10–1,51)
DNAmGrimAge2	288	1,68 (1,24–2,27)	1,35 (1,13–1,60)	1,33 (1,14–1,56)
DunedinPACE	288	1,52 (1,18–1,95)	1,25 (1,07–1,46)	1,27 (1,11–1,45)
YingAdaptAge	288	1,26 (0,99–1,61)	1,09 (0,89–1,32)	1,10 (0,93–1,32)
YingCausAge	288	1,14 (0,90–1,45)	1,11 (0,96–1,29)	1,11 (0,97–1,27)
YingDamAge	288	1,08 (0,83–1,40)	1,08 (0,91–1,29)	1,11 (0,95–1,29)