

B. Ficociello¹, E. Sturchio¹, C. Minoia², L. Casorri¹, P. Imbriani³, S. Signorini⁴

Epigenetica ed esposizione ambientale a xenobiotici

¹ Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro - Dipartimento Installazioni di Produzione e Insediamenti Antropici, Roma

² Laboratorio di Misure Ambientali e Tossicologiche "Fondazione Salvatore Maugeri", Pavia

³ Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Pavia - U.O. di Neuroriabilitazione, IRCCS Fondazione C. Mondino, Pavia

⁴ Direttore Scientifico Centro di Ricerca ISPESL "Fondazione Salvatore Maugeri", Pavia

RIASSUNTO. L'inquinamento ambientale, unitamente a fattori genetici predisponenti, svolge un ruolo importante nel determinare effetti avversi sulla salute umana, sia a breve sia a lungo termine. L'identificazione dell'eziologia delle patologie di origine ambientale è quindi divenuta, nei paesi industrializzati, una tematica di ricerca di interesse prioritario. A tal riguardo è stato ampiamente dimostrato che diversi composti chimici come gli interferenti endocrini sono in grado di modificare le caratteristiche epigenetiche di un individuo. Studi recenti stanno modificando il paradigma "a un genotipo è strettamente correlato un fenotipo" a favore del concetto che un fenotipo è definito "da un genotipo e da un epigenoma". Esiste quindi un genotipo identico per tutte le cellule al quale si associa l'epigenoma che determina cambiamenti nell'espressione genica senza modificazioni della sequenza nucleotidica del genoma, attraverso alterazioni della metilazione del DNA, modificazioni degli istoni e del pathway dei piccoli RNA non codificanti. L'epigenoma è suscettibile all'azione di diversi fattori, in particolare le aberrazioni dei normali processi epigenetici possono essere indotte da fattori ambientali (esposizione a xenobiotici, comportamenti sociali e carenze nutrizionali). I cambiamenti epigenetici rappresentano quindi una risposta biologica a fattori di stress ambientale e possono essere trasmessi alla prole. Poiché l'eliminazione del fattore ambientale induttore determina la possibile reversione della modifica epigenetica, non sembra quindi svolgere un ruolo nel processo di selezione naturale. Tuttavia le aberrazioni epigenetiche agiscono sull'espressione genica interferendo con la stabilità e la sopravvivenza cellulare e con l'inattivazione di geni oncosoppressori. Risulta quindi di notevole interesse indagare sui possibili elementi di induzione dei processi epigenetici per attivare adeguati protocolli di prevenzione. Inoltre, l'analisi di espressione genica attraverso metodi di *high-throughput* tipo *microarray* può permettere una migliore comprensione dei meccanismi d'azione degli xenobiotici e rappresentare un nuovo approccio per l'individuazione di nuovi indicatori epigenetici (monitoraggio di effetti biologici precoci sulla popolazione esposta a xenobiotici).

Parole chiave: epigenetica, xenobiotici, espressione genica, metilazione, modificazioni degli istoni, microRNA.

ABSTRACT. *Environmental pollution, together with predisposing genetic factors, plays a key role in determining short and long-term adverse effects on human health. In the industrialized countries the identification of etiology related to diseases of environmental origin has then become a research of priority interest. With regard to this, it has been widely*

demonstrated that different chemical compounds, such as endocrine disruptors, are able to modify the epigenetic characteristics of a human being. According to recent studies, the paradigm "genotype is strongly correlated with a phenotype" is changing in favor of the concept that a phenotype is defined by a "genotype and by an epigenome". Thus, there is a genotype identical for all cells associated to the epigenome that causes changes in gene expression without modifying the nucleotide sequence of the genome, through alterations in DNA methylation, histone modifications and the pathway of small non-coding RNAs. The epigenome is easily affected by different factors, such as aberrations of normal epigenetic processes that can be caused by environmental factors as exposure to xenobiotics, social behavior and nutritional deficiencies. Epigenetic changes are thus a biological response to environmental stress factors and may be transmitted to the offspring. As the elimination of the environmental factor determines the possible reversion of epigenetic modifications, it seems not to play a role in the natural selection process. However, epigenetic aberrations affect gene expression by interfering with the stability and survival of cells and with the inactivation of onco-suppressor genes. Thus, it is of considerable interest to investigate about the possible elements of induction of epigenetic processes in order to implement prevention protocols. Moreover, the gene expression screening through high through-put techniques like microarray, represent a new tool for the identification of new epigenetic indicators in order to monitor the early biological effects on the population exposed to xenobiotics.

Key words: *epigenetics, xenobiotics, gene expression, methylation, histone modifications, microRNA.*

Introduzione

L'utilizzo crescente e sempre più diffuso di diverse classi di composti chimici, in ambito industriale e in agricoltura, ha senza dubbio favorito l'esposizione umana a un elevato numero di xenobiotici, con conseguenze negative sulla qualità dell'aria, delle acque e degli alimenti. Ciò ha contribuito, attraverso studi mirati, ad accrescere la consapevolezza che l'inquinamento ambientale, unitamente a fattori genetici predisponenti, svolge un ruolo importante nel determinare effetti avversi sulla salute umana, sia a breve, sia a lungo termine. L'identificazione

dell'eziologia delle patologie di origine ambientale è quindi divenuta, nei paesi industrializzati, una tematica di ricerca di interesse prioritario, facilitando, tra l'altro, lo sviluppo di nuove strategie e criteri nella valutazione del rischio espositivo, sia in termini di sicurezza alimentare (nutrigenomica), sia attraverso la limitazione o il divieto di impiego di specifiche sostanze chimiche, per individuare le priorità di intervento ed introdurre adeguati strumenti di prevenzione.

È stato ampiamente dimostrato che diversi composti chimici, presenti in ambiente, sono in grado di modificare le caratteristiche epigenetiche di un individuo. Ci si riferisce ad esempio agli Interferenti Endocrini (IE) (bifenolo A, diossine, alchilfenoli, ftalati, ecc), ai microinquinanti presenti nell'aria (carbone, benzene), agli elementi in traccia (arsenico, nichel, cadmio, cromo) e a un gruppo di sostanze meglio note come proliferatori dei perossisomi (ad esempio tricloroetilene e acido dicloroacetico).

In funzione della loro eterogeneità chimica, gli IE sono presenti in diverse matrici (alimentari e ambientali) e possono interagire con diversi organi. Il sistema endocrino è il *target* di elezione, poiché gli IE sono in grado di interferire in modo sinergico o antagonista con il metabolismo di ormoni endogeni, sulla loro sintesi e nella regolazione dei processi riproduttivi e dello sviluppo pre e postnatale.

Gli *endpoints* di tossicità degli IE risultano correlabili con la suscettibilità individuale, con fattori e variabili come il sesso, i consumi alimentari, gli stili di vita, il tipo di esposizione (precoce, acuta o cronica) e la fase del ciclo vitale. Nel soggetto adulto l'esposizione può avere effetti transitori a causa dei meccanismi di omeostasi dell'organismo, mentre durante lo sviluppo pre e postnatale può indurre effetti anche permanenti.

Recenti studi hanno evidenziato che il meccanismo di tossicità degli IE può coinvolgere processi epigenetici (metilazione del DNA, modificazione degli istoni e microRNA), in particolare nello sviluppo embrionale e nelle prime fasi della vita neonatale. Le aberrazioni epigenetiche sono in grado di determinare alterazioni della funzionalità genica: ciò può manifestarsi nel singolo individuo ed essere trasmesso a livello transgenerazionale se l'azione tossica coinvolge la linea germinale.

La prevenzione di patologie correlate con i fattori ambientali (esposizione a xenobiotici) richiede quindi una capacità d'indagine in grado di identificare eventi associati a una specifica patologia, ponendo come obiettivi lo studio a livello molecolare gene-ambiente, l'identificazione dei *pathways* coinvolti nella risposta biologica, ma anche dei *networks* delle interazioni prodotte da specifici agenti tossici.

A tale approccio multidisciplinare è richiesto altresì di integrare gli aspetti clinici con i parametri di laboratorio, i dati provenienti da biomarcatori di esposizione e di effetto con le analisi di espressione genica o di suscettibilità, al fine di caratterizzare i meccanismi di azione e di risposta agli xenobiotici a livello trascrizionale e post-trascrizionale, aumentandone la specificità e la sensibilità e definendo nuovi indicatori predittivi.

Effetti epigenetici

Le modificazioni epigenetiche, ereditate per *via* mitotica, introducono cambiamenti nell'espressione genica senza modificare la sequenza nucleotidica del genoma. Ciò si verifica attraverso alterazioni della metilazione del DNA, con la modificazione degli istoni e il *pathway* dei piccoli RNA non codificanti. Si tratta, quindi, di processi dinamici in grado di rispondere ai segnali estrinseci di natura xenobiotica e sociale (es. abitudini alimentari, stili di vita) e a quelli intrinseci dell'organismo.

Le aberrazioni epigenetiche, così come si verifica per i polimorfismi genetici, possono alterare l'espressione genica, come nel caso dell'enzima P450 o di enzimi coinvolti nella riparazione del DNA che notoriamente presentano diversi livelli di attività per entrambe le modifiche genetiche sopraccitate.

Gli studi di epigenetica hanno contribuito a evidenziare come tali aberrazioni genetiche si riflettano in modo significativo sullo sviluppo di alcune patologie e di diverse forme di cancro. L'esposizione a contaminanti ambientali nella fase pre e postnatale può infatti alterare la programmazione epigenetica, determinando differenze fenotipiche interindividuali e modificando la suscettibilità individuale a specifiche patologie. A loro volta differenze interindividuali dello stato epigenetico potrebbero influenzare la suscettibilità agli xenobiotici (figura 1).

A titolo esemplificativo si ritiene opportuno richiamare uno studio comparativo condotto su un gruppo di gemelli monozigoti di diversa età vissuti in differenti ambienti per i quali è stata condotta una caratterizzazione del profilo epigenetico di ogni soggetto (metilazione globale CpG e acetilazione degli istoni H3 e H4). La ricerca ha dimostrato che nei primi anni di vita i gemelli sono epigeneticamente non distinguibili. Al contrario, i gemelli di età adulta mostravano notevoli differenze nel contenuto e nella distribuzione globale della metilazione del DNA genomico e dell'acetilazione degli istoni. Inoltre, una differenza più evidente dell'epigenoma era presente nel gruppo di gemelli di maggiore età che avevano vissuto separati per più del 50% della loro vita (1).

I risultati ottenuti confermano che i fenomeni epigenetici non hanno un ruolo esclusivo nell'ontogenesi embrionale, anche se in tale stadio è stata evidenziata una particolare sensibilità e suscettibilità agli stimoli esterni, con conseguenti effetti transgenerazionali e manifestazioni fenotipiche nell'età adulta.

Un'ulteriore conferma al riguardo è stata dimostrata anche negli animali: sui topi si è osservato che le cure parentali possano esercitare una significativa influenza sul comportamento della prole. Animali non accuditi in modo adeguato mostravano infatti un livello ematico di ormoni dello stress maggiore rispetto agli individui adulti.

Ciò è stato attribuito a variazioni nell'acetilazione degli istoni e della metilazione del DNA del promotore del gene per il recettore dei glucocorticoidi presente nell'ipocampo. Gli animali che avevano ricevuto adeguate cure parentali nei primi giorni di vita presentavano livelli di metilazione notevolmente inferiori rispetto agli animali

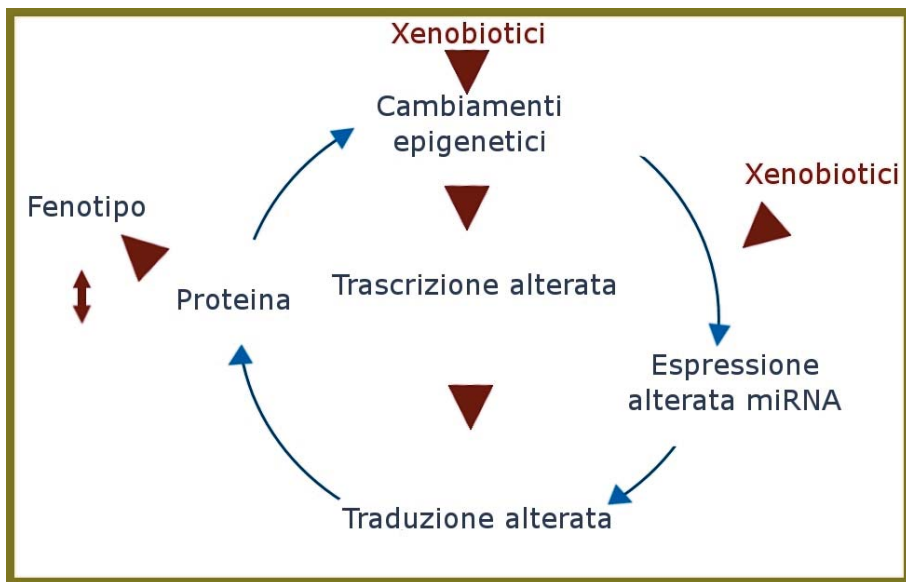


Figura 1. L'epigenoma è suscettibile all'azione di fattori ambientali (esposizione a xenobiotici, comportamenti sociali e carenze nutrizionali), che possono modificare le caratteristiche epigenetiche di un individuo. Modifiche epigenetiche determinano cambiamenti nell'espressione genica senza modificazioni della sequenza nucleotidica del genoma, attraverso alterazioni della metilazione del DNA, modificazioni degli istoni e del pathway dei microRNA. I miRNA regolano i livelli di espressione di geni coinvolti nella risposta agli xenobiotici, hanno un ruolo importante nel controllo della metilazione del DNA e delle modificazioni a livello degli istoni. I profili di espressione dei miRNA possono essere alterati direttamente in seguito ad esposizione a xenobiotici

che le avevano ricevute in modo insufficiente. Il minor grado di metilazione indicava un'attiva espressione genica dovuta ad un'elevata acetilazione degli istoni che aumentava l'interazione del DNA con il fattore di trascrizione NGFI-A. Quindi una maggiore espressione del gene per il recettore dei glucocorticoidi determinava un *feedback* per il cortisolo più sensibile con una più adeguata risposta allo stress. È stato posto in evidenza come tali effetti fossero reversibili in seguito a somministrazione di tricostatina, un inibitore delle deacetilasi istoniche, ristabilendo una normale risposta allo stress negli animali che non avevano ricevuto cure parentali inadeguate (2).

Metilazione del DNA

La metilazione del DNA è un meccanismo di regolazione finalizzato al mantenimento di uno schema di espressione genica. Tale processo si verifica quasi esclusivamente attraverso il legame di un gruppo metile in posizione 5 dell'anello della citosina presente in sequenze dinucleotidiche CpG del DNA, ad opera della famiglia di enzimi DNA metiltransferasi. I siti CpG sono distribuiti in modo disomogeneo nel genoma, con regioni povere e altre ricche in isole CpG generalmente localizzate nelle regioni promotore dei geni *housekeeping* (3).

La maggior parte del genoma è piuttosto povero di regioni CpG in quanto, se le citosine vengono metilate spontaneamente, subiscono una successiva deaminazione e si modificano in guanina (4). La metilazione delle regioni CpG presenta significative differenze, in particolare nello sviluppo embriogenetico, e in quello cellulo-specifica che risulta correlato alla struttura della cromatina. Un'alterazione dello stato di metilazione delle regioni CpG com-

porta quindi una modifica strutturale della cromatina, con conseguente repressione dell'espressione genica, associata a instabilità genomica nel caso di un'ipermetilazione. L'espressione genica è invece alterata nel caso di un'ipometilazione (5, 6).

La struttura della cromatina nelle regioni CpG è particolarmente "aperta" e ciò è da ricondurre all'assenza dell'istone H1 mentre gli altri istoni presenti sono acetilati in modo estensivo.

La metilazione può portare, a livello del singolo gene, al "silenzamento genico" tramite due meccanismi principali. Il primo, di tipo diretto, consiste nella metilazione della sequenza di DNA che rappresenta il sito di riconoscimento per un fattore di trascrizione (7, 8). Il secondo meccanismo è di tipo indiretto e determina una configurazione della cromatina più "chiusa" rispetto a quanto de-

scritto in precedenza. Il meccanismo si esplicita attraverso il riconoscimento di specifiche regioni del DNA metilate, di particolare densità da parte di proteine di *binding* quali la MeCP1 (*methyl CpG binding protein 1*) e la MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*), il regolatore trascrizionale SIN3A e gli enzimi che modificano gli istoni (9).

Alterazioni della metilazione del DNA sono state associate a diverse patologie quali autismo, infertilità maschile, sindromi di Rett, Prader-Willi, Angelman e BeckWith-Wiedemann e ad alcune forme di cancro (10, 11, 12, 13).

In particolare, nella cancerogenesi è presente un'ipometilazione generalizzata del DNA e un'ipermetilazione localizzata dei geni oncosoppressori presenti nei diversi siti del genoma (14, 15, 16). L'ipometilazione potrebbe agire attivando i geni pro-metastatici e i promotori tumorali, mentre l'ipermetilazione potrebbe silenziare i geni onco-soppressori (17, 18, 19, 20, 21, 22).

Citando ad esempio un cancerogeno come l'arsenico (As), si ritiene che la sua azione tossica possa essere giustificata da aberrazioni epigenetiche indotte nelle fasi pre e post-natale, grazie al sequestro, da parte del metalloide, di gruppi metilici, con la limitazione quindi delle reazioni catalizzate dalle metiltransferasi cellulari e conseguente ipometilazione di alcune regioni CpG. In varie ricerche è stata evidenziata la capacità di As di indurre fenomeni di ipometilazione e di ipermetilazione a carico di diversi geni *target* come l'oncogene *K-ras* ipometilato in cellule umane epiteliali di prostata, e il gene p16, anch'esso ipometilato, nei casi di arseniosi (23, 24).

La metilazione dei siti CpG assume inoltre un ruolo fondamentale nella fase di sviluppo, attraverso l'inattiva-

zione del cromosoma X e il controllo dell'*imprinting* genomico. Diversi studi suggeriscono che il grado di metilazione delle isole CpG del genoma di cellule germinali potrebbe aumentare la percentuale di variazione morfologica e quindi il tasso di evoluzione (25, 26, 27).

Alcuni autori sono arrivati a ipotizzare che fattori nutrizionali, quali un ridotto apporto di vitamina B₁₂ e di acido folico come donatori di gruppi metile nel metabolismo di unità monocarboniose, ma anche fattori ambientali come l'esposizione a xenobiotici durante la gestazione, possano alterare in modo irreversibile l'equilibrio dei processi di metilazione e demetilazione. Ci si riferisce in questo caso alle fasi di sviluppo dell'embrione con conseguenti interferenze metaboliche e malattie croniche (ad esempio diabete di tipo 2 nell'adulto) (Figura 2) (28).

Si ritiene quindi che i meccanismi epigenetici potrebbero mediare la tossicità indotta dagli IE e gli eventuali effetti transgenerazionali che taluni composti chimici sono in grado di determinare a seguito dell'alterazione del *pattern* di metilazione del DNA a livello embrionale (29, 30, 31). Infatti, l'esposizione embrionale a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), al dietilstilbestrolo (DES) o a 2,2',4,4',5,5'-esaclorobifenile (PCB153) è in grado di modificare l'attività delle DNA metiltransferasi, sino a indurre un cambiamento dello stato di metilazione genica, con conseguenti effetti sul processo di sviluppo.

Gli IE potrebbero agire sull'ontogenesi embrionale prima dell'impianto attraverso due modalità: a) per via transplacentare; b) modificando "l'ambiente ormonale" intrauterino attraverso l'alterazione della secrezione degli steroidi (catecolestrogeni) da parte dell'epitelio uterino. I catecolestrogeni a loro volta potrebbero modificare il *pattern* di metilazione nell'embrione dei geni di *imprinting* e di quelli non *imprinting* noti per possedere un *pattern* di metilazione invariato nelle successive generazioni.

Nell'ontogenesi embrionale i *patterns* specifici di metilazione del DNA avvengono in due momenti, il primo durante la gastrulazione nella fase di sviluppo delle cellule somatiche. Ciò ha la funzione di determinare una "riprogrammazione" epigenetica del DNA proveniente dall'oocita e dallo spermatozoo. Tale stadio dell'ontogenesi embrionale è particolarmente critico per il corretto sviluppo e la sopravvivenza dell'embrione (13, 32, 29). Il secondo meccanismo risulta "sesso-specifico" e si verifica durante lo sviluppo delle gonadi (33, 34, 35).

Studi nei ratti hanno dimostrato che durante lo sviluppo delle gonadi, nella fase di determinazione del sesso, le cellule germinali sono sottoposte a processi di demetilazione e rimetilazione. Quest'ultima sembra inoltre dipendere da un'associazione con le cellule somatiche presenti nelle gonadi. È possibile che uno xenobiotico possa agire direttamente attraverso meccanismi epigenetici sulla linea germinale o indirettamente sulla rimetilazione attraverso un'alterazione funzionale di cellule somatiche associate (36, 37, 38, 39).

La "riprogrammazione" della linea germinale costituisce una fase critica per l'*imprinting*, infatti in questa fase le aberrazioni epigenetiche possono alterare le informazioni epigenetiche di tipo ereditario, con conseguente fenotipo transgenerazionale alterato (29, 40, 41, 42). Lo stu-

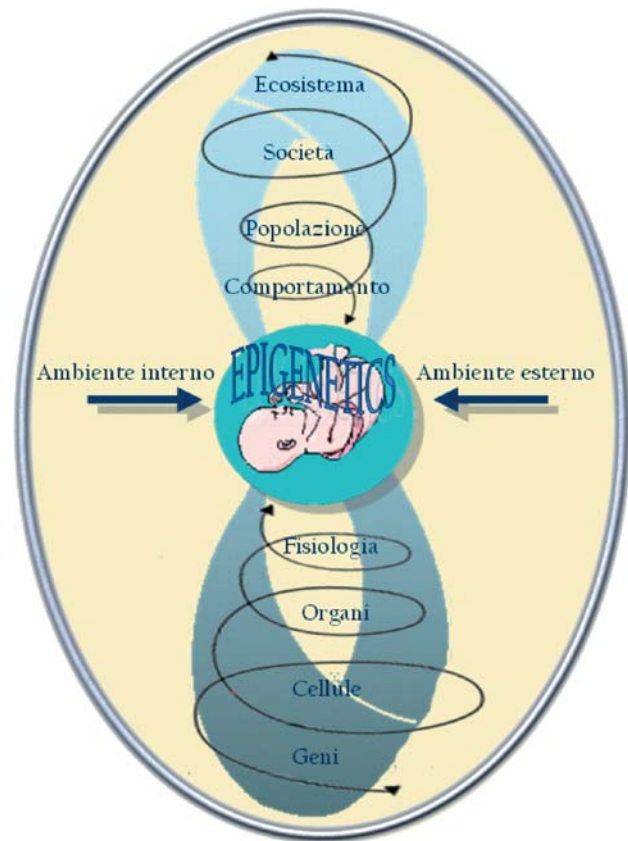


Figura 2. Il feto è particolarmente vulnerabile a modifiche che avvengono nell'ambiente interno ed esterno, che ne influenzano lo sviluppo fetale con conseguenze immediate e a lungo termine. Tali cambiamenti indotti dall'ambiente possono avvenire a tutti i livelli di organizzazione biologica. Di recente, si è evidenziato come tali influenze possono essere di tipo epigenetico che inducono alterazioni nell'espressione genica senza modificazioni del DNA

Modificata da: Crews D. and McLachlan J.A. Epigenetics, Evolution, Endocrine Disruption, Health, and Disease. *Endocrinology* 2006, 147(6) Supplement: S4-S10

dio di tali fenotipi trans generazionali potrebbero fornire informazioni sull'eziologia di alcune malattie in soggetti nello stadio adulto (43, 44).

Nel caso degli IE un possibile ruolo nell'induzione delle aberrazioni epigenetiche è legato alla loro capacità di imitare l'azione di estrogeni endogeni o di sottoporre l'embrione a una condizione di stress alterando la proteina *Heat Shock Protein 90 (Hsp90)* (45, 46). Studi di esposizione prenatale condotti su embrioni di ratto, all'antiparassitario metossicloro (caratterizzato da azione estrogenica) o al fungicida *vinclozolin* (con azione antiandrogenica), durante la fase della determinazione del sesso e della differenziazione delle gonadi, hanno evidenziato che la prole di sesso maschile presentava una ridotta fertilità (progressiva apoptosi delle cellule della spermatogenesi, riduzione del numero degli spermatozoi e della loro motilità). Tale fenomeno è da attribuire a un'alterazione del *pattern* di metilazione in seguito all'esposizione delle madri. In età adulta questi ratti hanno sviluppato forme di cancro, malattie della prostata e del rene, presentavano anomalie del sistema immunitario, ma anche effetti con esito transgenerazionale, che sono stati individuati nelle

successive quattro generazioni, associati in particolare nel caso del *vinclozolin*, a un alterato *pattern* di metilazione del DNA nella linea germinale (29, 47, 48).

Analogamente a quanto sopra riportato, studi di esposizione di blastocisti di topo nello stadio di reimpianto, alla TCDD, hanno evidenziato un'aberrazione nella metilazione del DNA dei geni H19 e IGF-2, coinvolti nell'*imprinting* dell'embrione (49, 50, 36). È inoltre possibile che la regolazione epigenetica del gene IGF-2 possa essere influenzata anche da un particolare tipo di alimentazione. Nel topo, in una fase post-natale precoce in normali condizioni ambientali, risulta espresso solo l'allele paterno del gene IGF-2 mentre quello materno viene silenziato. In seguito a somministrazione, per 60 giorni dopo lo svezzamento, di alimenti donatori di gruppi metilici, è stata evidenziata un'ipometilazione dell'allele paterno correlata a una significativa perdita di regolazione di *imprinting* del gene stesso (51).

Modificazione degli istoni

Un altro meccanismo epigenetico è rappresentato dalle modificazioni che possono intervenire a carico della struttura della cromatina.

Il DNA nucleare è costituito da cromatina organizzata in nucleosomi formati da complessi ottamericici di proteine istoniche, intorno ai quali si avvolge la doppia elica del DNA. Gli istoni, proteine basiche che nella struttura del *core* assumono una struttura discoidale, sono coinvolti nell'assemblare il DNA e conferire la struttura alla cromatina. L'istone H1 interagisce con il DNA *linker* e produce un maggior compattamento del DNA al nucleosoma. L'associazione dell'ottamero istonico con il DNA è necessariamente dinamica per permettere l'accesso al DNA ad altre proteine che devono mediare specifiche funzioni (regolazione della trascrizione). L'interazione tra il DNA e l'ottamero istonico è regolata da grossi complessi proteici denominati complessi di rimodellamento nucleosomico. Attività di rimodellamento dei nucleosomi e modificazioni a carico delle code N-terminali agiscono in modo combinato per modulare l'accessibilità al DNA. Le code N-terminali dei 4 istoni del *core* (H2A, H2B, H3, e H4) che sporgono all'esterno del nucleosoma, possono subire modificazioni attraverso i meccanismi di acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, mediati da enzimi (istone acetiltrasferasi HAT, istone deacetilasi HDAC, istone metiltrasferasi) e da molecole di RNA regolatrici (*small RNA*). Le modificazioni delle code N-terminali degli istoni alterano la funzione della cromatina. L'acetilazione e la fosforilazione determinano una riduzione delle cariche positive delle code istoniche. Generalmente, l'acetilazione rende la cromatina trascrizionalmente attiva, mentre i nucleosomi deacetilati sono caratteristici della cromatina condensata e trascrizionalmente inattiva. Inoltre, dal momento che diverse proteine di *binding* (ad es. *methyl CpG binding protein 1*) interagiscono con l'istone deacetilasi si ipotizza un meccanismo comune che leghi insieme la metilazione del DNA con la modificazione degli istoni. Inoltre, la metilazione del DNA di regioni ricche in CpG è stata recentemente collegata alla deacetilazione dell'istone, e la metilazione della lisina 9 dell'istone H3 è

probabilmente legata a meccanismi d'*interference* mediati da *small RNA*. Queste modificazioni alterano la struttura della cromatina e ne influenzano l'espressione genica. Un esempio di tale meccanismo di regolazione è il fenomeno dell'*imprinting*, nel quale uno dei due alleli di uno specifico gene viene silenziato mediante metilazione e acetilazione. Nelle cellule di carcinoma mammario che *over*-esprimono il recettore per gli estrogeni a esposte a bisfenolo A (BPA), quest'ultimo *up*-regola l'istone H2B e *down*-regola l'H1 sul quale l'estradiolo non ha effetti. L'istone H2B è un'unità fondamentale della cromatina in quanto è un componente strutturale del nucleosoma mentre l'H1 legato alla superficie del nucleosoma interagisce con il DNA del nucleosoma stesso determinando il compattamento della cromatina. Il BPA inoltre non ha effetti sull'enzima istoneacetilasi, contrariamente all'azione dell'estradiolo che invece *down*-regola questo enzima (52).

MicroRNA (miRNA)

Nelle cellule eucariotiche è presente un meccanismo evolutivamente conservato che permette la conversione di RNA a doppio filamento in corte molecole molto attive sia nel controllo di *pathways* cellulari per lo sviluppo e il differenziamento (microRNA) sia nella difesa da RNA a doppio filamento originante da situazioni aberranti o di pericolo quali retrotrasposoni, virus ad RNA e trascritti anomali (*small interference RNA*).

Recenti indagini hanno evidenziato come i miRNA possano regolare i livelli di espressione di geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci e nella risposta agli xenobiotici. Inoltre è emerso che differenze interindividuali nell'espressione di questi geni sono in grado di definire una risposta soggetto-specifica all'azione di un farmaco o di una tossina (53).

Gli *small interference* (siRNA) sono coinvolti nella metilazione del DNA e nella modificazione degli istoni. Poiché siRNA e miRNA condividono molti enzimi del *pathway* dell'RNA *interference* (RNAi), è lecito ipotizzare che anche i miRNA possano avere un ruolo importante nel controllo della metilazione del DNA e delle modificazioni a livello degli istoni (54, 55).

I miRNA hanno come potenziali *target* anche gli RNA messaggeri di enzimi deputati alla metilazione del DNA (DNMT1, 3a, 3b) e possono regolare la struttura della cromatina modificando un istone-chiave. Ad esempio miR-140, espresso nella cartilagine, nel topo può avere come *target* l'enzima istonedeaacetilasi 4 (56, 57). A sua volta l'espressione dei miRNA può essere regolata da fattori epigenetici in quanto è possibile che i miRNA presenti negli introni possano essere trascritti da promotori presenti in regioni CpG regolate dalla metilazione del DNA (58, 59).

È importante sottolineare come la relazione tra espressione dei miRNA e fattori epigenetici possa mediare l'impatto della riprogrammazione epigenetica in risposta a un'esposizione ambientale su un gruppo di altri geni, e come i miRNA stessi possano agire modificando a loro volta la struttura della cromatina al punto da essere considerati regolatori dei meccanismi di metilazione del DNA e delle modificazioni degli istoni (60).

Xenobiotici, come gli interferenti endocrini, possono avere un'azione multifunzionale e pleiotropica essendo associati alla regolazione dei miRNA coinvolti nei processi fisiologici e nelle malattie estrogeno-regolate. Si può pertanto presumere che le alterazioni osservate nei profili di espressione dei miRNA indotti da estrogeni potrebbe determinare cambiamenti in un ampio numero di geni *target* dei miRNA, contribuendo così agli effetti pleiotropici degli estrogeni indotti dagli IE sui processi fisiologici cellulari.

Diverse ricerche hanno confermato tali ipotesi per cui l'esposizione neonatale di *hamster* a un IE come il DES determina una forma neoplastica dell'utero correlata a un'alterazione dell'espressione genica per una *up*-regolazione di alcuni miRNA (miR-200b, 200a, 429, 29a, 141, 200c, 29b, 21) e una *down*-regolazione di altri (miR-181a) (61).

Anche le cellule progenitrici di quelle epiteliali sono sensibili agli xenoestrogeni e sono in grado di trasmettere mitoticamente le aberrazioni epigenetiche. L'analisi di espressione genica di cellule esposte al DES ha posto in evidenza una *down*-regolazione del gene miR-9-3, in associazione con un reclutamento della DNA metiltransferasi 1 che ha determinato un aumento aberrante nella metilazione del DNA nelle regioni CpG del suo promotore. Analisi funzionali suggeriscono che miR-9-3 abbia un ruolo nel *pathway* apoptotico della p53. Il silenziamento epigenetico di questo gene riduce perciò la normale funzione cellulare e promuove la proliferazione del carcinoma mammario. L'ipermetilazione del promotore di questo microRNA potrebbe risultare un marcatore molecolare per lo sviluppo precoce del tumore al seno, inoltre, il ripristino della sua espressione per *via* epigenetica e terapie basate sui microRNA, potrebbero diventare una procedura praticabile nel trattamento di questa patologia (62).

I risultati di uno studio condotto nel 2008 in individui adulti di *Zebrafish* (*Danio rerio*) hanno suggerito l'esistenza di un'associazione tra i recettori per gli estrogeni, i miRNA e i geni *Hox* durante le diverse fasi di sviluppo dell'animale (63, 64). È infatti emerso che il 17 β -estradiolo (E2) è in grado di modificare i profili di espressione di alcuni miRNA. Di questi, tra i più *up*-regolati sono presenti i miR-196b (regolatore del gene *Hoxb8a*) e *let-7h*, mentre tra quelli più *down*-regolati sono risultati miR-130c e miR-101 (65). Lo stesso miR-196b è stato associato nel topo alla regolazione di geni *Hox-like* durante lo sviluppo embrionale (66).

I geni *Hox* sono regolati nell'espressione, oltre che da E2, anche da altri ormoni. Nell'uomo questo *cluster* è regolato da regioni ipermetilate e non è presente l'acetilazione degli istoni H3 e H4. Questo tipo di regolazione risulta quindi di particolare interesse, in quanto, nei mammiferi, questi geni sono coinvolti nei processi di sviluppo embrionale e di differenziazione funzionale, e in particolare nello sviluppo dell'utero la cui espressione è inficiata dall'azione del metossicloro (67, 68).

Il meccanismo di regolazione dei miRNA da parte degli estrogeni deve ancora essere chiarito e si può, allo stato attuale delle conoscenze, ipotizzare una regolazione a livello della trascrizione e del processamento dei pri/pre-

miRNA. Nello *Zebrafish*, *patterns* simili di espressione di miR-196b maturo e del suo precursore, suggeriscono che la regolazione sia a livello trascrizionale.

Potrebbe inoltre essere interessante verificare se miR-196b sia regolato da E2 anche nelle cellule umane, dal momento che i geni miR-196 vengono indotti nel cancro del polmone, della prostata, del pancreas e della mammella (69, 70, 71). A supporto di tale ipotesi si rammenta che è noto come la variante genica del gene hsa-miR-196a-2 (rs11614913, C->T), o l'ipermetilazione di siti CpG a monte del precursore del miR-196a-2 siano significativamente associate a un decremento del rischio di cancro della mammella, suggerendo quindi un potenziale ruolo oncogenico di miR-196a-2 nella genesi del carcinoma mammario. La sopraccitata variante genica funzionale potrebbe essere verificata come un nuovo biomarcatore di suscettibilità per il cancro al seno (72).

Anche nel caso dell'As non si può escludere che il ruolo tossico sia anche l'esito di alterazioni dell'espressione genica dei miRNA in stadi critici dello sviluppo. I risultati di uno studio comparativo realizzato su fibroblasti esposti ad arsenito di sodio hanno evidenziato, rispetto ai controlli, l'alterazione di alcuni miRNA (hsa-miR-210, 22, 34a, 221, 222), gli stessi che venivano alterati dall'assenza di folati nel terreno di coltura. Tali dati trovano giustificazione nel fatto che l'As può agire alterando il metabolismo delle unità monocarboniose e quindi determinare una diminuzione della metilazione del genoma cellulare (73).

Alterazioni del comportamento sessuale, riproduttivo e sociale

Gli xenobiotici mediando i meccanismi epigenetici possono determinare alterazioni delle attività degli ormoni sessuali durante il differenziamento sessuale cerebrale, producendo cambiamenti persistenti nell'orientamento e nel comportamento, riproduttivo e sociale. L'evoluzione si basa sul successo riproduttivo che si realizza attraverso una scelta di un compagno/a che permetta un'ottimale complementarietà genica o una trasmissione dei geni "migliori" per la sopravvivenza. Studi sull'esposizione embrionale di topi a diversi tipi di xenobiotici hanno mostrato un comportamento socio-sessuale alterato o non funzionale o una ridotta attrazione di un individuo verso potenziali compagni senza la possibilità di evidenziare una giustificazione funzionale (46, 74). Un'analisi condotta sul comportamento sessuale di topi esposti al *vinclozolin*, rispetto ai controlli, ha rilevato l'influenza diretta della selezione sessuale sull'evoluzione epigenetica, e il coinvolgimento dell'*imprinting* transgenerazionale sull'attrazione verso l'individuo scelto e sulla percezione della selezione individuale. I meccanismi epigenetici intervengono in diversi e numerosi processi fisiologici tra cui quelli cerebrali e riproduttivi. Ne deriva che si potrebbe quindi proporre il fenotipo epigenetico transgenerazionale come principale meccanismo coinvolto nella preferenza alterata di un compagno (46, 47).

Tale ipotesi è suffragata da altri dati quali le differenze alleliche in geni altamente polimorfici all'interno del

maggior complesso di istocompatibilità (MHC), le quali svolgono un ruolo nella scelta del compagno nei vertebrati, inclusi gli esseri umani (75, 76, 77). I geni dell'MHC, ritenuti cruciali per l'immunità innata e adattativa contengono isole CpG molto metilate, gli individui eterozigoti per loci MHC sono in grado di rispondere meglio ai patogeni di quanto non si verifichi per individui omozigoti (78). Nei topi esposti a *vinclozolin* sono state osservate influenze nel comportamento per l'accoppiamento per tre generazioni attribuite a cambiamenti epigenetici transgenerazionali nei transcriptomi del cervello e del testicolo, nonché cambiamenti nell'espressione dei geni MHC (79).

La dieta e gli effetti epigenetici

Le variazioni genetiche presenti nella specie umana sono il risultato di adattamenti molecolari a pressioni evolutive ottenuti attraverso processi di mutazione genica e di selezione adattativa.

Diversi xenobiotici sono quotidianamente apportati con la dieta attraverso il consumo di acqua, latte, carne o pesce. Il Parlamento europeo ha recentemente adottato, con la Direttiva 2009/128/CE e il Regolamento (CE) n. 1107/2009, restrizioni molto severe nei confronti dell'utilizzo in agricoltura dei fitofarmaci considerati mutageni e interferenti endocrini o di quelli persistenti in ambiente con capacità di bioaccumulo nei tessuti adiposi dell'uomo e degli animali. Secondo i dati ufficiali, in Italia l'1,2% della frutta e della verdura presenta residui di antiparassitari superiori ai limiti di legge e il 30% contiene residui nei limiti consentiti. Il rapporto del 2008 dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (Ispra) ha evidenziato che nel nostro paese il 57,3% delle acque superficiali contiene tracce di antiparassitari e nel 36,6% dei casi i valori osservati eccedevano i limiti previsti per l'acqua destinata al consumo umano. Inoltre, nelle falde sotterranee, la contaminazione da parte delle stesse sostanze interessava il 31,5% dei siti esaminati. I limiti di potabilità erano superati nel 10,3% dei casi. Le sostanze rilevate erano in particolare erbicidi, come il bentazone, la terbutilazina e l'atrazina. Quest'ultimo, pur vietato da molti anni, è ancora presente nelle acque superficiali e sotterranee (17%), a conferma di un'elevata persistenza di alcuni pesticidi nell'ambiente.

In questo processo evolutivo la dieta risulta il fattore ambientale di maggiore esposizione persistente per la popolazione generale. Svolge infatti un ruolo importante nell'epigenetica, poiché il genoma umano è continuamente modificato in risposta a esposizioni di origine alimentare. Singoli componenti presenti nella dieta sono in grado di influenzare la velocità di mutazione genica, di modificare la penetranza di mutazioni deleterie e di interferire sulla vitalità del feto. Durante la gravidanza la dieta può influenzare lo sviluppo fetale attraverso una pressione selettiva che fornisce un contributo fondamentale nell'insorgenza di nuove mutazioni genomiche che possono determinare diverse caratteristiche e predisposizioni dell'organismo adulto.

Interazioni gene-nutriente non producono cambiamenti fenotipicamente rilevabili nello stato di salute dell'embrione o del feto, ma possono influenzare la salute del soggetto adulto predisponendolo di fatto a una serie di malattie e di risposte comportamentali. I dati epidemiologici hanno infatti confermato che durante le prime fasi dello sviluppo prenatale e postnatale l'alimentazione può influenzare la suscettibilità a varie malattie in età adulta tra le quali il diabete di tipo 2, forme di cancro, obesità e malattie cardiovascolari (80). D'altra parte i gruppi metilici derivano interamente dall'apporto nutrizionale (folato, metionina, vitamina B₁₂, selenio, zinco, vitamina A), mentre alcool e As hanno un effetto negativo su tale apporto.

Uno studio realizzato su femmine di topo portatrici del gene *agouti* ha permesso di stabilire che in gravidanza la dieta può determinare effetti epigenetici. Il gene *agouti* determina la pigmentazione della pelliccia che nella prole può variare dal giallo al marrone in relazione alla tipologia di dieta a cui la madre viene sottoposta durante la gestazione. I cambiamenti nella pigmentazione sono direttamente legati all'integrazione nella dieta di vitamina B₁₂, acido folico, colina e betaina. Secondo gli autori dello studio i cambiamenti di colore sono direttamente collegati ad alterazioni nella metilazione del DNA. Il gene *agouti* svolge un ruolo anche nel determinare la predisposizione all'obesità, al diabete e al cancro. Quando i topi sono alimentati in gravidanza con vitamine e integratori, gli integratori interagiscono silenziando il gene negli embrioni, si ottiene così, da madri obese di colore giallo, la genesi di prole di colore marrone, non obesa e sana (81).

A livello cellulare i nutrienti o loro metaboliti possono svolgere la loro azione direttamente come ligandi dei recettori nucleari per i fattori di trascrizione influenzando positivamente o negativamente le vie di trasduzione di segnali cellulari. I recettori nucleari coinvolti in questo processo di attivazione dell'espressione genica sono in particolare l'eterodimero PPAR/RXR azione (*Peroxisome Proliferator-Activated* (PPAR) e *Retinoid X Receptor*). Gli acidi grassi polinsaturi (palmitico oleico, linolenico, arachidonico, linoleico), possono legarsi direttamente al PPAR, mentre la vitamina A rappresenta il ligando del RXR. La vitamina A inoltre è in grado agire indirettamente attraverso i recettori nucleari per *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBP) che vengono attivati da proteasi a loro volta regolate da particolari condizioni, quali i bassi livelli di oxisteroli, le variazioni nel rapporto insulina/glucosio, la presenza di acidi grassi e di acidi grassi polinsaturi.

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha di recente redatto un documento dove viene posta una particolare attenzione verso l'assunzione di arsenico attraverso la dieta. Questo metallo è presente in concentrazioni elevate sotto forma di composti non tossici (ad esempio arsenobetaina) in molluschi, pesci, e crostacei. In altri alimenti, pur se a concentrazioni piuttosto basse, è presente in forme inorganiche e maggiormente tossiche. Nei cibi con un'alta percentuale di grassi (pesci grassi, olio di pesce) l'As è presente nella forma di arsenolipidi, attualmente in fase di studio per verificare la loro potenziale tossicità.

In particolare riso, latte e acque potabili sono gli alimenti sui quali si stanno concentrando diversi studi di *intake*. Il riso rappresenta un problema emergente per quanto concerne l'*intake* alimentare di As, essendo un alimento consumato diffusamente, soprattutto in popolazioni in via di sviluppo, ed è ampiamente utilizzato per il suo ridotto potere allergenico e l'alto valore nutrizionale nelle diete di svezzamento dei bambini. Tuttavia il riso fornisce il contributo prevalente di As attraverso la dieta, poiché ne contiene concentrazioni più elevate rispetto ad altri cereali quali frumento e orzo, grazie alla sua capacità di accumulare l'As presente nel suolo nei suoi chicchi. L'As svolge la sua azione tossica interagendo in modo particolare con composti intracellulari che presentano gruppi tiolici (glutazione, cisteina) inibendo alcuni enzimi quali la piruvato deidrogenasi. Anche l'acido monometilarsinico, un prodotto del metabolismo di As, è un potente inibitore enzimatico (piruvato deidrogenasi, glutazione riduttasi, tiorossina riduttasi) la cui azione determina un conseguente aumento dello stress ossidativo a livello cellulare. L'As è anche in grado di competere con il *pathway* dell'E2 interferendo sulla regolazione genica correlata ai recettori per i glucocorticoidi, i mineralocorticoidi, il progesterone e gli androgeni (82, 83, 84, 85). È stato ipotizzato che una dieta a base di alimenti contaminati da As inorganico, anche a basso dosaggio, possa portare a trasformazioni neoplastiche (86, 87, 88).

Sembra ormai accertato quindi il ruolo che l'As può svolgere nelle aberrazioni epigenetiche, essendo peraltro stato dimostrato che la somministrazione ai topi di acqua contaminata con questo elemento, induce un'ipometilazione generalizzata del tessuto epatico. Questo dato è stato rilevato *in vitro* in cellule epiteliali di fegato di ratto, dove l'esposizione cronica ad As ha comportato, oltre all'ipometilazione generalizzata, anche una riduzione dei livelli di S-adenosilmetionina e una ridotta attività della DNA metiltransferasi (89). Il fenomeno dell'ipermetilazione è stato invece evidenziato *in vitro* su cellule umane di adenocarcinoma polmonare esposte ad arsenico a carico del promotore del gene p53. Quanto evidenziato è stato confermato da una significativa ipermetilazione dello stesso promotore in soggetti esposti ad As, rispetto ai controlli, con una significativa relazione dose-risposta. La medesima aberrazione a carico dello stesso gene è stata osservata in pazienti affetti da cancro della pelle indotto da As (90, 91, 92). Nel cancro della vescica l'As induce ipermetilazione dei geni onco-soppressori RASSF1A e PRSS3 (73).

Conclusioni

La definizione di epigenetica "un tratto epigenetico è una fenotipo stabilmente ereditabile, risultante da cambiamenti del cromosoma senza alterazioni nella sequenza del DNA" considera la possibilità dell'ereditabilità di un fenotipo, attraverso mitosi o meiosi.

L'ipotesi di epigenoma dinamico implica che variazioni nella funzionalità genica e nel fenotipo possono essere modulate non solo dai polimorfismi genici ma anche da cambiamenti epigenetici molto stabili.

L'epigenoma è in equilibrio dinamico e quindi suscettibile a continui cambiamenti nella risposta a xenobiotici ambientali e a esposizioni fisiologiche non solo durante periodi critici dello sviluppo ma anche nel corso della vita.

Infatti, xenobiotici, fattori fisiologici e comportamentali possono agire a diversi livelli nell'attivare o bloccare i diversi *pathways* di *signaling*, che possono provocare alterazioni nella struttura della cromatina, oppure possono agire direttamente sulla "macchina enzimatica epigenetica". La sua modulazione può avere effetti a lungo termine sulla salute dell'uomo e condurre a malattie come il cancro o a disturbi comportamentali poiché un'esposizione anche transiente a tossici ambientali può avere effetti fenotipici persistenti nel corso della vita.

Un aspetto particolarmente critico è la comprensione dei meccanismi in grado di modificare i programmi epigenetici in modo da identificare l'esposizione a fattori di origine ambientale, che modulano variazioni interindividuali nella risposta a farmaci e/o tossine. Risulta quindi di notevole interesse indagare gli elementi di induzione dei processi epigenetici per realizzare adeguati protocolli di prevenzione. L'analisi di espressione genica attraverso metodi di *high-throughput* tipo *microarray* potrà permettere una migliore comprensione dei meccanismi d'azione degli xenobiotici e rappresentare un nuovo approccio per l'individuazione di nuovi indicatori epigenetici nel monitoraggio di effetti biologici precoci sulla popolazione esposta.

Le modificazioni epigenetiche che regolano il destino e l'identità cellulare sono un processo plastico e dinamico e la comprensione degli intricati meccanismi epigenetici, in una prospettiva a lungo termine, potrebbe costituire un promettente *target* per la riprogrammazione delle cellule differenziate e lo sviluppo di terapie antineoplastiche che possono contrastare le aberrazioni del differenziamento che sono alla base della tumorigenesi.

Bibliografia

- 1) Fraga MF. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10604-10609.
- 2) Meaney MJ. Maternal programming of glucocorticoid receptor expression and HPA responses to stress through DNA methylation in the rat. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology*. Springer US. 2007; 595-617. ISBN 978-0-387-30405-2 (Online).
- 3) Takai D. The CpG island searcher: a new WWW resource. *Silico Biol* 2003; 3: 235-240.
- 4) Gardiner-Garden M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196: 261-282.
- 5) Jones PA. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428.
- 6) Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21, 5400-13.
- 7) Comb M. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 3975-3982.
- 8) Inamdar NM. CpG methylation inhibits binding of several sequence-specific DNA-binding proteins from pea, wheat, soybean and cauliflower. *Plant Mol Biol*. 1991, 17: 111-123.
- 9) Nan X. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389.

- 10) Lund AH. Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 2004; 18: 2315-2335.
- 11) Esteller M. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002; 196: 1-7.
- 12) Muhle R. The genetics of autism. *Pediatrics* 2004; 113: e472-e486.
- 13) Jiang YH. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 479-510.
- 14) Feinberg AP. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988; 48: 1159-61.
- 15) Narayan A. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1998; 77: 833-8.
- 16) Baylin SB. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72: 141-96.
- 17) Pakneshan P. Methylation and inhibition of uPA expression by RAS oncogene: divergence of growth control and invasion in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 557-564.
- 18) Pakneshan, P. Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis. *J Biol Chem* 2004; 279: 31735-44.
- 19) Shukeir N. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2006; 66: 9202-10.
- 20) Bachman AN. Altered methylation in gene-specific and GC-rich regions of DNA is progressive and nonrandom during promotion of skin tumorigenesis. *Toxicol Sci* 2006a; 91: 406-18.
- 21) Bachman AN. Phenobarbital induces progressive patterns of GC-rich and gene-specific altered DNA methylation in the liver of tumor-prone B6C3F1 mice. *Toxicol Sci* 2006b; 91: 393-405.
- 22) Counts JL. Hypomethylation of DNA: a nongenotoxic mechanism involved in tumor promotion. *Toxicol Lett* 1995; 82-83: 663-72.
- 23) Salnikow K. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium. *Chem. Res. Toxicol* 2008; 2: 28-44.
- 24) Benbrahim-Tallaa L. Molecular events associated with arsenic-induced malignant transformation of human prostatic epithelial cells: aberrant genomic DNA methylation and K-ras oncogene activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 288-298.
- 25) Newbold RR. Increased tumors but uncompromised fertility in the female descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1655-1663.
- 26) Newbold RR. Proliferative lesions and reproductive tract tumors in male descendants of mice exposed developmentally to diethylstilbestrol. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1355-1363.
- 27) Ruden DM. Epigenetic regulation of trinucleotide repeat expansions and contractions and the "biased embryos" hypothesis for rapid morphological evolution. *Curr Genom* 2005; 6: 145-155.
- 28) Feil R. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutat Res* 2006; 600: 46-57.
- 29) Anway MD. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005; 308: 1466-1469.
- 30) Crews D. Epigenetics, Evolution, Endocrine Disruption, Health, and Disease. *Endocrinology* 2006; 147: S4-S10.
- 31) Holliday R. The inheritance of epigenetic defects. *Science* 1987; 238: 163-170.
- 32) Cisneros FJ. DNA methylation and male infertility. *Front Biosci* 2004; 9: 1189-1200.
- 33) Reik W. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293: 1089-1093.
- 34) Allegrucci C. Epigenetics and the germline. *Reproduction* 2005; 129: 137-149.
- 35) Kelly TL. Reproductive epigenetics. *Clin Genet* 2004; 65: 247-260.
- 36) Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 662-673.
- 37) Sandovici I. Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/ H19 and IGF2R differentially methylated regions. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1569-1578.
- 38) Lucifero D. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 839-849.
- 39) Yamazaki Y. Reprogramming of primordial germ cells begins before migration into the genital ridge, making these cells inadequate donors for reproductive cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12207-12212.
- 40) Roemer I. Epigenetic inheritance in the mouse. *Curr Biol* 1997; 7: 277-280.
- 41) Lane N. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 2003; 35: 88-93.
- 42) Rakyan VK. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2538-2543.
- 43) Heindel JJ. The fetal basis of adult disease: role of environmental exposures- introduction. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73: 131-132.
- 44) Basha MR. The fetal basis of amyloidogenesis: exposure to lead and latent overexpression of amyloid precursor protein and amyloid in the aging brain. *J Neurosci* 2005; 25: 823-829.
- 45) Holliday R. The possibility of epigenetic transmission of defects induced by teratogens. *Mutat Res* 1998; 422: 203-205.
- 46) Guerrero-Bosagna C. Environmental signaling and evolutionary change: can exposure of pregnant mammals to environmental estrogens lead to epigenetically induced evolutionary changes in embryos? *Evol Dev* 2005; 7: 341-350.
- 47) Anway MD. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 2006; 147: 5524-5541.
- 48) Chang HS. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology* 2006; 147: 5515- 5523.
- 49) Sato S. Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ-cell development. *Mol Reprod Dev* 2003; 65: 41-50.
- 50) Hajkova P. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002; 117: 15-23.
- 51) Waterland RA. Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (Igf2) locus. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 705-716.
- 52) Singleton DW. Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol-A in estrogen receptor-a-positive human cells. *Environ. Res.* 2006; 100: 86-92.
- 53) Saito Y. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* 2006; 5: 2220-2.
- 54) Maison C. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 2002; 30: 329-334.
- 55) Fukagawa T. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 784-791.
- 56) Rajewsky N. MicroRNA target predictions in animals. *Nat Genet* 2006; 38: S8-S13.
- 57) Tuddenham L. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS Lett* 2006; 580: 4214-4217.
- 58) Lyle R. The imprinted antisense RNA at the Igf2r locus overlaps but does not imprint Mas1. *Nat Genet* 2000; 25: 19-21.
- 59) Ying SY. Intronic microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 515-520.
- 60) Chuang JC. Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatr Res.* 2007; 61: 24R-29R
- 61) Padmanabhan R. Altered MicroRNA Expression Patterns During the Initiation and Promotion Stages of Neonatal Diethylstilbestrol-Induced Dysplasia/Neoplasia in the Hamster Uterus. *Biology of Reproduction* 2009; 81: 101.
- 62) Hsu PY. Xenoestrogen-Induced Epigenetic Repression of microRNA-9-3 in Breast Epithelial. *Cells Cancer Res.* 2009 69: 5936-45.
- 63) Bardet PL. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol* 2002; 28: 153-163.
- 64) Pearson JC. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* 2006; 6: 893-904.
- 65) Cohen A. Alterations in Micro-Ribonucleic Acid Expression Profiles Reveal a Novel Pathway for Estrogen Regulation. *Endocrinology* 2008; 149: 1687-1696.
- 66) Mansfield JH. MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hoxlike and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 2004; 36: 1079-1083.
- 67) Hayashi H. High-resolution mapping of DNA methylation in human genome using oligonucleotide tiling array. *Hum Genet* 2007; 120: 701-11.

- 68) Fei X. Methoxychlor disrupts uterine Hoxa10 gene expression. *Endocrinology* 2005; 146: 3445-3451.
- 69) Volinia S. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2257-2261.
- 70) Bloomston M. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901-1908.
- 71) Iorio MV. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070.
- 72) Hoffman AE. MicroRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res* 2009; 69: 5970-7.
- 73) Marsit CJ. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 112-116.
- 74) Zala MS. Abnormal Behaviours Induced by Chemical Pollution: A Review of the Evidence and New Challenges *Anim Behav* 2004; 68: 649-664.
- 75) Boehm T. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype *Trends Neurosci* 2006; 29: 100-107.
- 76) Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC). *Front Zool* 2005; 2: 16.
- 77) Ziegler A. Female choice and the MHC. *Trends Immunol* 2005; 26: 496-502.
- 78) Spies T. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 1989; 243: 214-217.
- 79) Crews D. Transgenerational epigenetic imprints on mate preference *PNAS* 2007; 104: 5942-5946.
- 80) Waterland RA. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 179-197.
- 81) Waterland RA. and Randy L. Jirtle *Transposable Elements: Targets for Early Nutritional Effects on Epigenetic Gene Regulation Molec and cell biology* 2003: 5293-5300.
- 82) Bodwell JE. Arsenic disruption of steroid receptor gene activation: Complex dose response effects are shared by several steroid receptors. *Chem. Res. Toxicol* 2006; 19: 1619-1629.
- 83) Bodwell JE. Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR) mediated gene activation but not GR mediated gene repression: complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. *Chem Res Toxicol* 2004; 17: 1064-1076.
- 84) Kaltreider RC. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environ Health Perspect* 2001; 109, 245-251.
- 85) Watson WH. Arsenic: Extension of its Endocrine Disruption Potential to Interference with Estrogen Receptor-Mediated Signaling. *Toxicological Sciences* 2007; 98: 1-4.
- 86) Masotti A. Risk assessment of inorganic arsenic pollution on human. *Environ. Pollution* 2009; 157: 1771-1772.
- 87) Stone R. Arsenic and paddy rice: a neglected cancer risk? *Science* 2008; 321,184-185.
- 88) Meharg AA. Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. *Environ Pollut* 2008; 152: 746-749.
- 89) Chen H. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1779-1786.
- 90) Mass MJ. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat Res* 1997; 386: 263-277.
- 91) Zhao CQ. Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proc Natl Acad USA* 1997; 94: 10907-10912.
- 92) Chanda S. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci* 2006; 89: 431-437.

Richiesta estratti: *Dott.ssa Elena Sturchio - ISPESL-DIPIA, Via Urbana, 167 - 00184 Roma, Italy - Tel. 0697893322, E-mail: elena.sturchio@ispe.sl.it*