



# Fattori ambientali e meccanismi epigenetici

**Lucia Migliore**

*Dipartimento di Ricerca Traslazionale e Nuove Tecnologie  
in Medicina e Chirurgia*

*Università di Pisa*

*e Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana*

lucia.migliore@med.unipi.it



**10e GIORNATE ITALIANE MEDICHE DELL'AMBIENTE**  
**"Ambiente come determinante della salute materno-infantile"**  
**Arezzo 29 e 30 Settembre 2017**

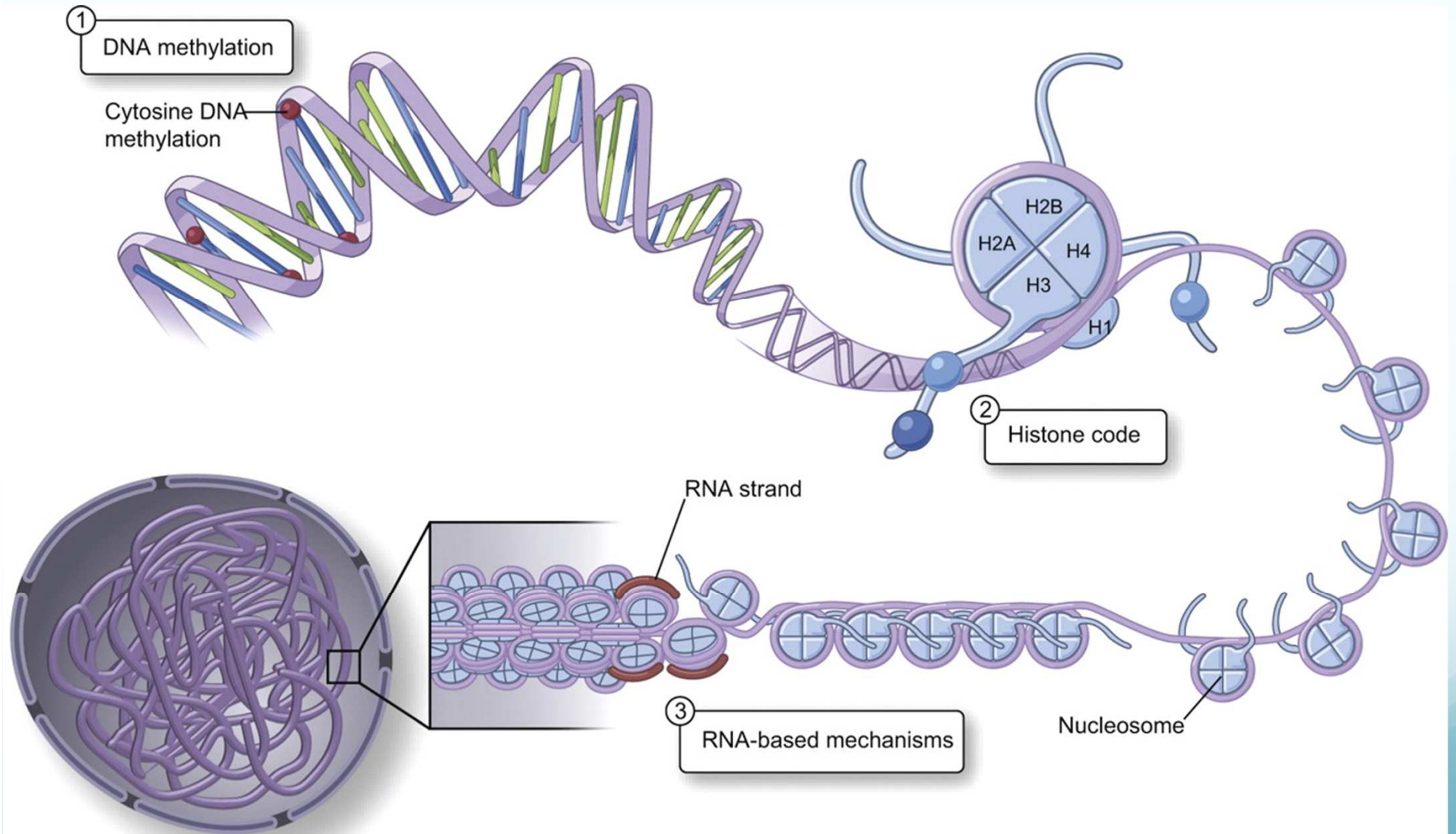
## Diapositiva 1

---

1

Lucia ; 11/03/2015

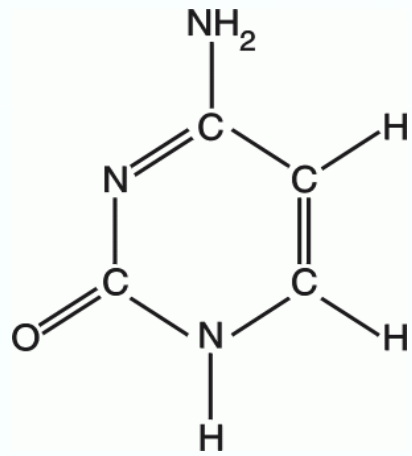
# DAL CODICE GENETICO A QUELLO EPIGENETICO



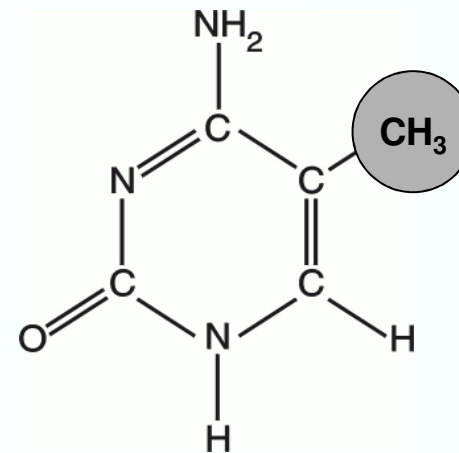
# MECCANISMI EPIGENETICI

- 3 meccanismi per regolare l'espressione genica:
  - ✓ metilazione del DNA
  - ✓ modificazioni delle code istoniche
  - ✓ interventi da parte dei ncRNA

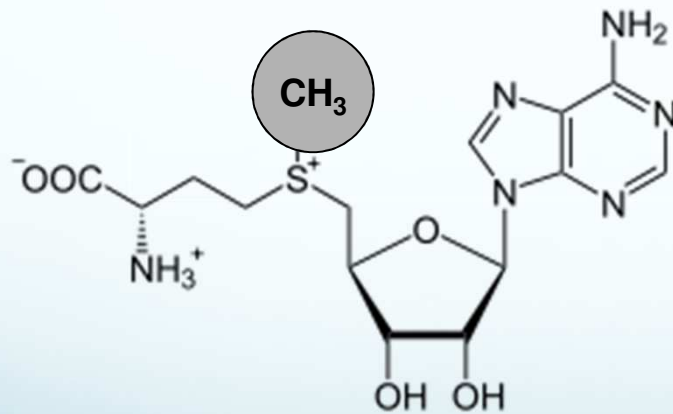
CYTOSINE



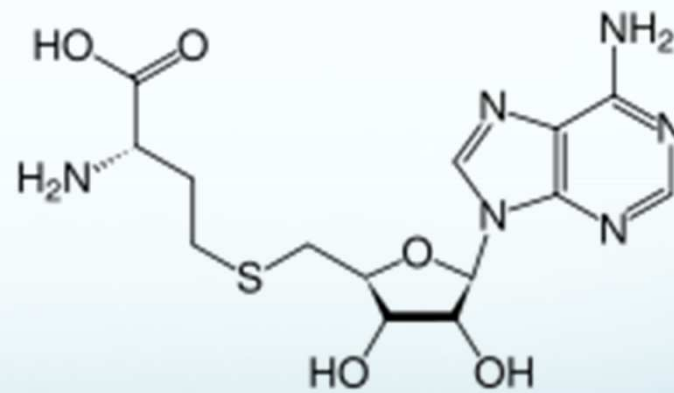
5-METHYLCYTOSINE



DNMT



SAM



SAH

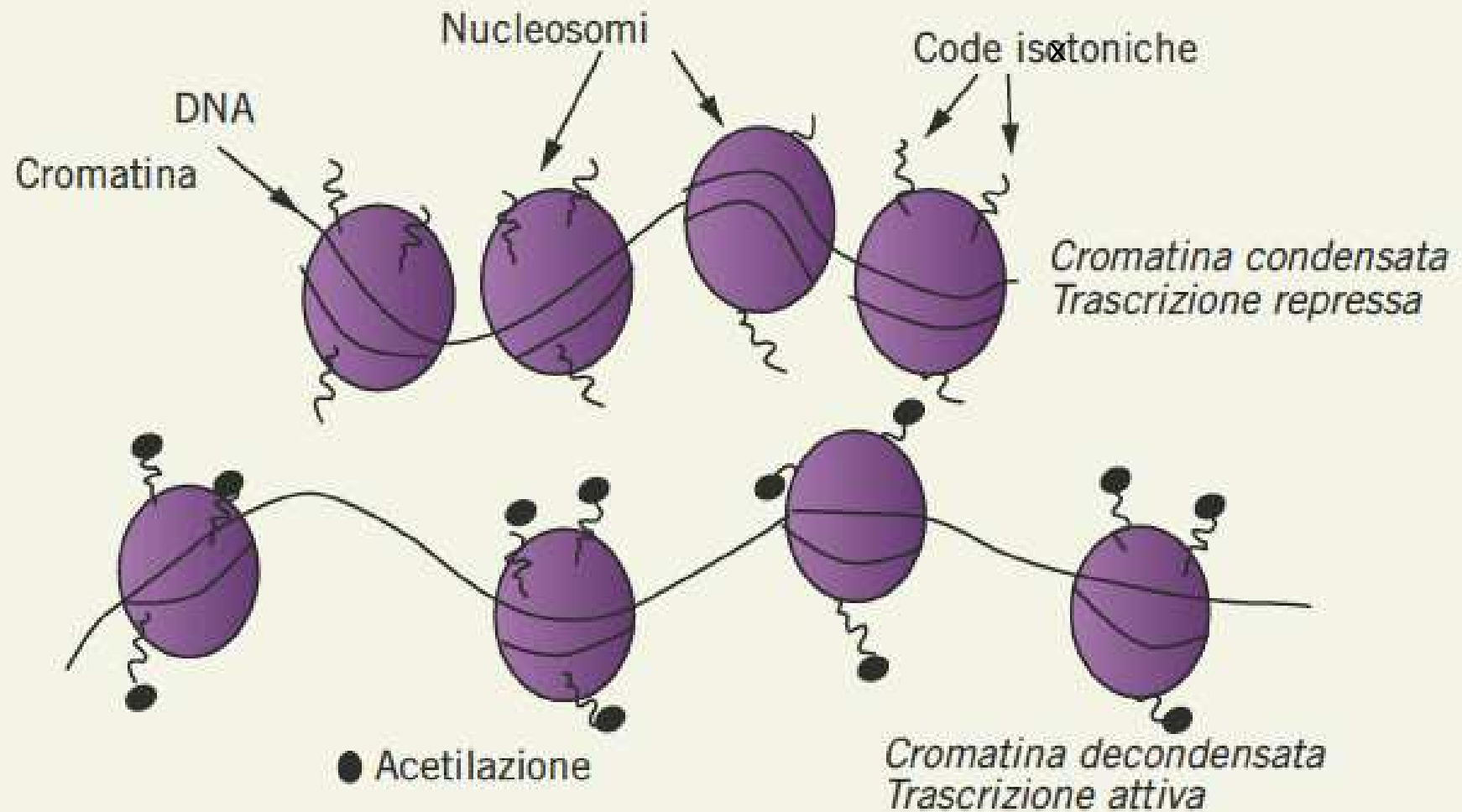
## Metilazione del DNA



NO Trascrizione

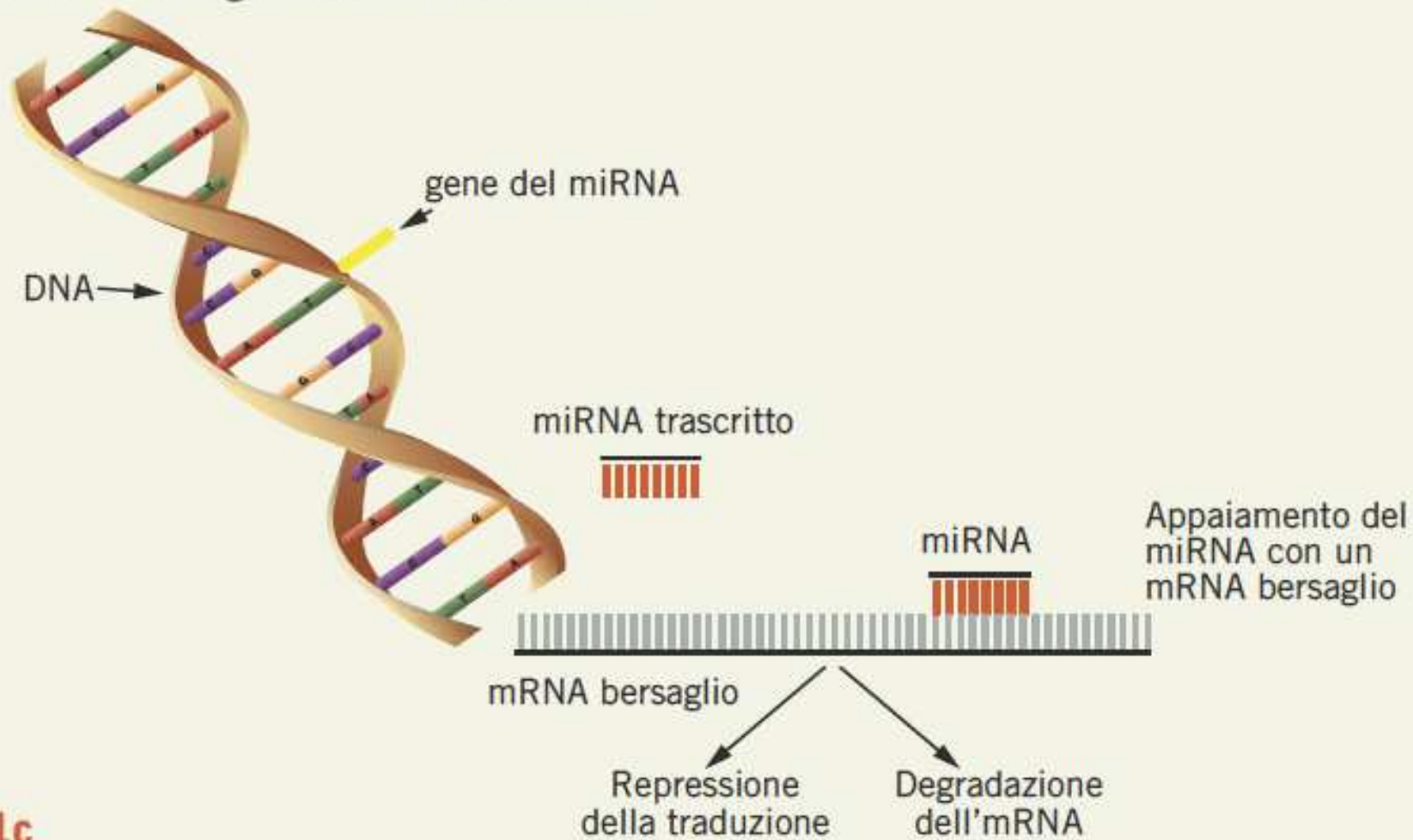


## Modificazioni delle code istoniche





## Interventi degli RNA non codificanti

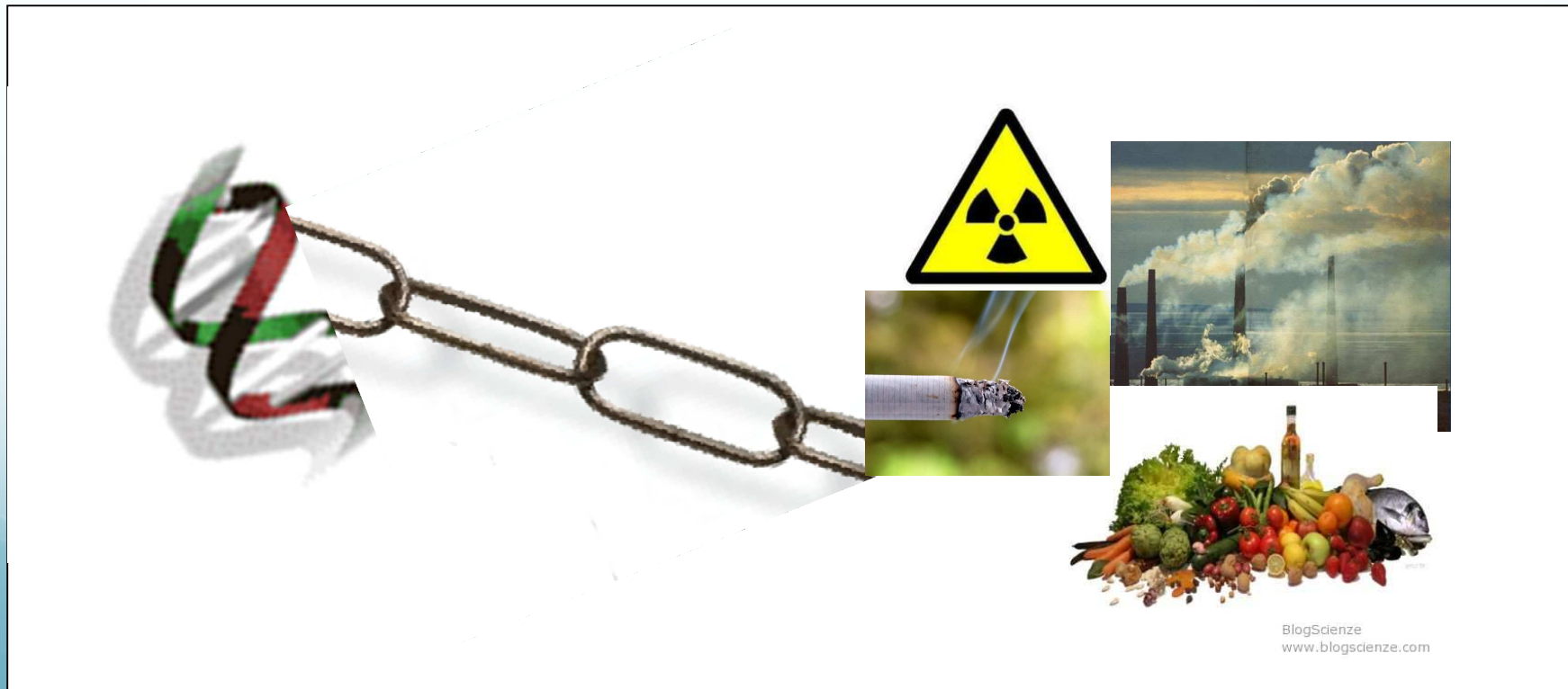


1c

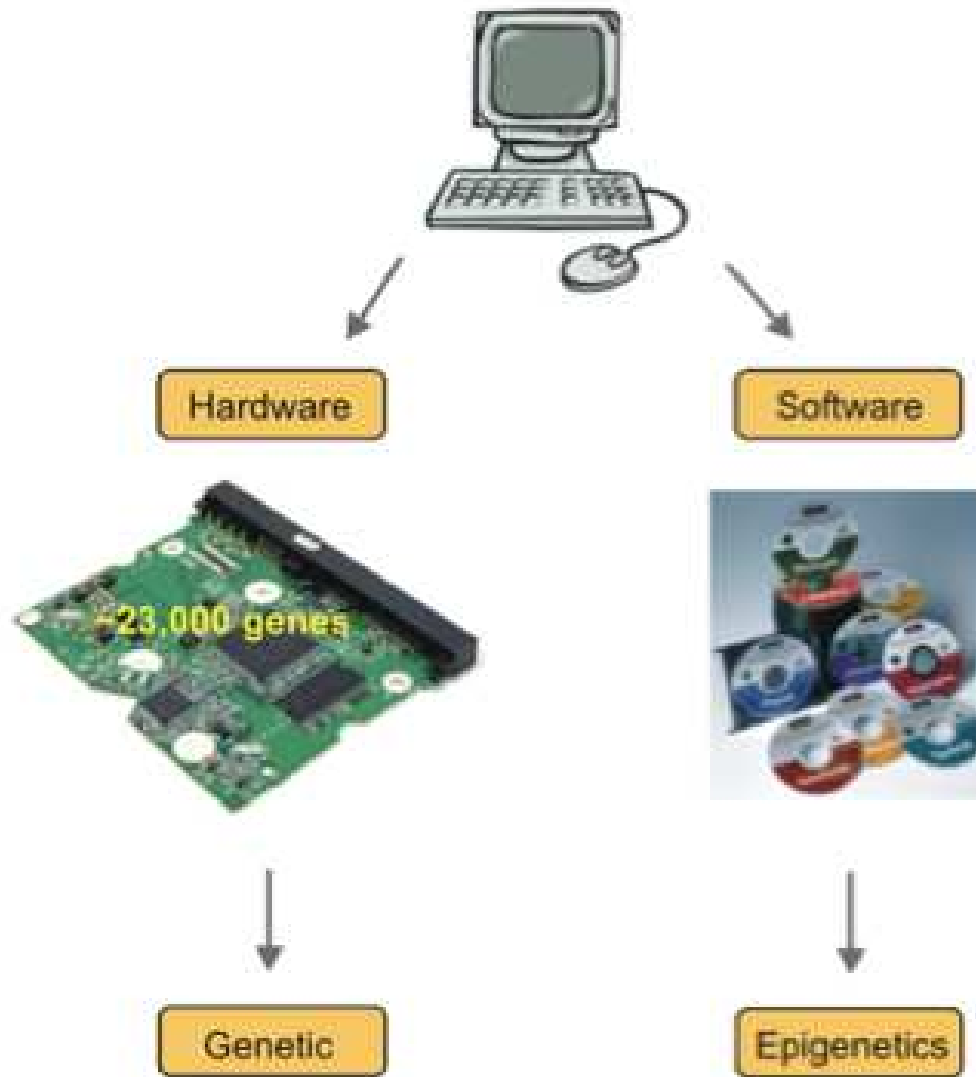


# Epigenetica

## L'anello mancante tra la genetica e l'ambiente



# Genetica/Epigenetica



A. Hoffmann, D. Spengler /  
Neuroscience 264 (2014)  
64–75

**“Although the data are still sparse, early epigenetic studies have provided a proof of principle that experiences and the environment leave marks on genes, and thus suggest molecular and physical mechanisms for the epidemiological concept of gene-environment interaction”**

(M. Szyf et al., *Epigenetics* 2016)

- ✓ **Si stanno accumulando sempre più prove in favore del principio che le esperienze e l'ambiente lasciano segni sui geni**
- ✓ **e questo suggerisce meccanismi molecolari e fisici per spiegare il concetto epidemiologico dell'interazione geni-ambiente**



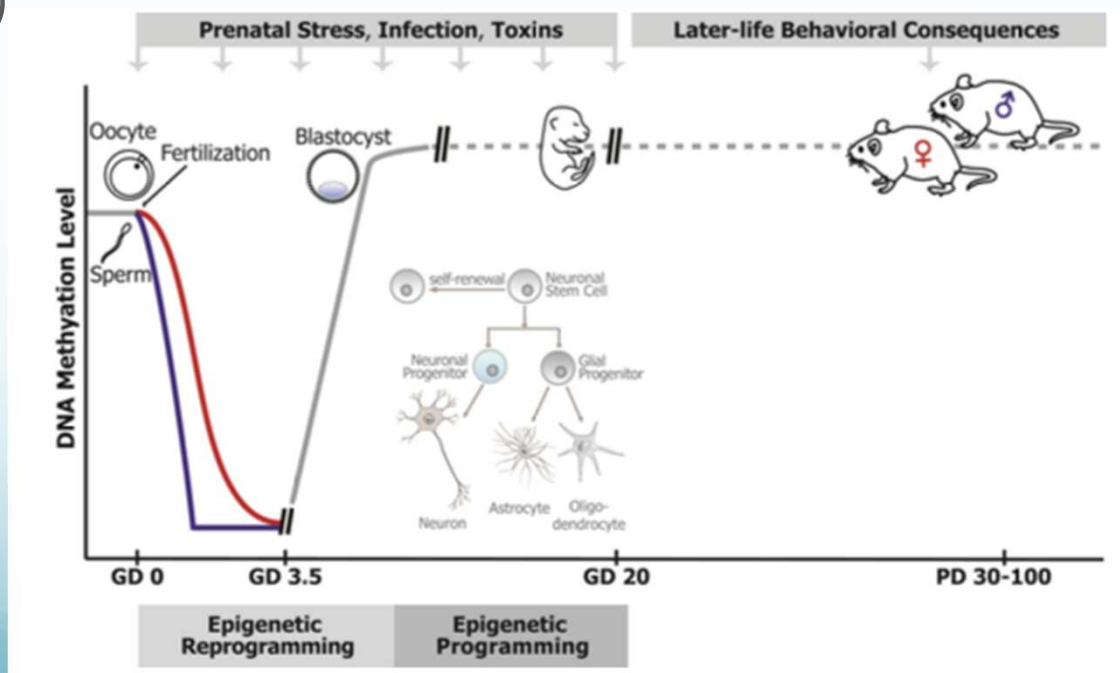
# Epigenetica e ambiente

**L'epigenoma è un importante bersaglio per le  
modificazioni indotte dall'ambiente**



# Periodi critici per le modificazioni epigenetiche

- Esiste una serie di “finestre” cruciali nel corso delle prime fasi dello sviluppo embrionale durante le **quali i meccanismi epigenetici** responsabili della differenziazione risultano particolarmente **sensibili a influenze da parte di fattori ambientali**.
- Subito **dopo la fecondazione** si verifica una rapida sequenza di **cambiamenti epigenetici**. Questi includono variazioni del tipo di istoni e delle loro modificazioni, in particolare quelli della linea germinale paterna (le protamine spermatiche vengono sostituite dagli istoni presenti nell'ovocita)



# Epigenetica: effetti transgenerazionali

**L'esposizione ad agenti ambientali nel corso dello sviluppo embrionale influenza la suscettibilità alle malattie nella generazione successiva**

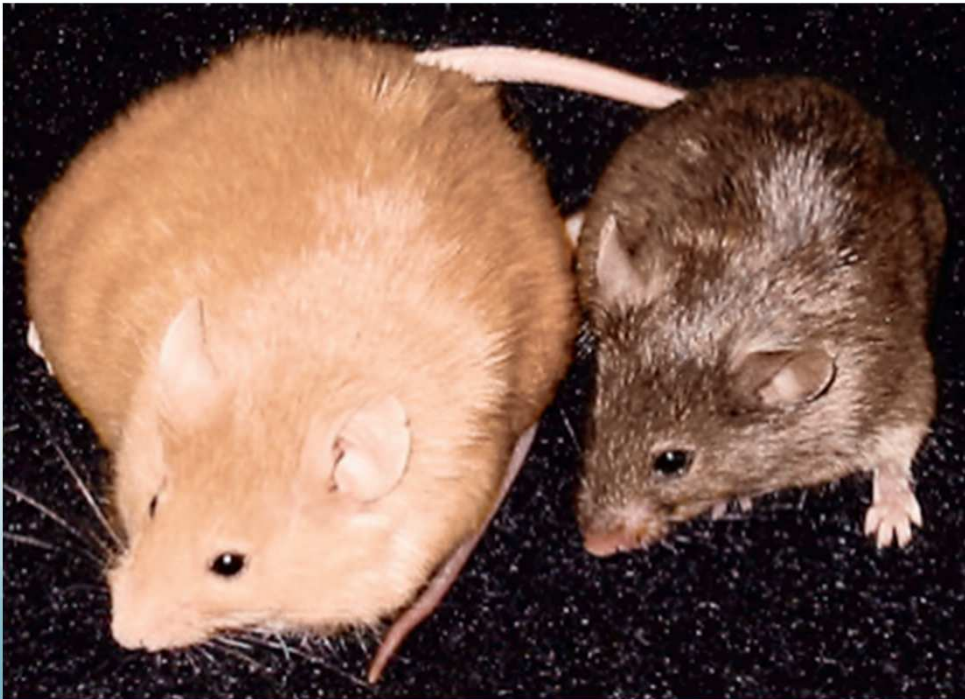
- metalli pesanti (cancro)
- alterazioni della dieta (diabete & difetti utero)
- esposizione chimica B(a)P (difetti neurologici ed endocrini)
- esposizione a interferenti endocrini (difetti riproduttivi ed endocrini)

**Jirtle & Skinner NatRevGenetics, 2007**



# Effetti transgenerazionali

## Influenza della dieta prenatale

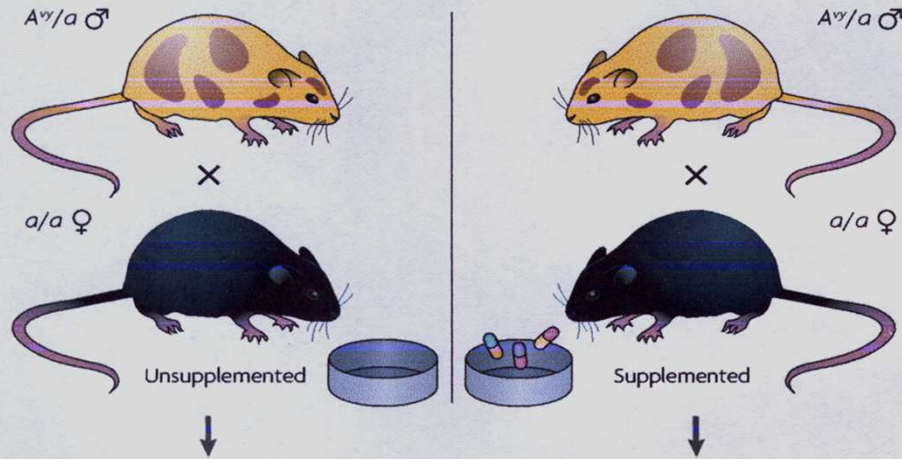


La supplementazione materna di donatori di gruppi metilici durante la gravidanza può alterare il fenotipo della progenie mediante metilazione dell'epigenoma

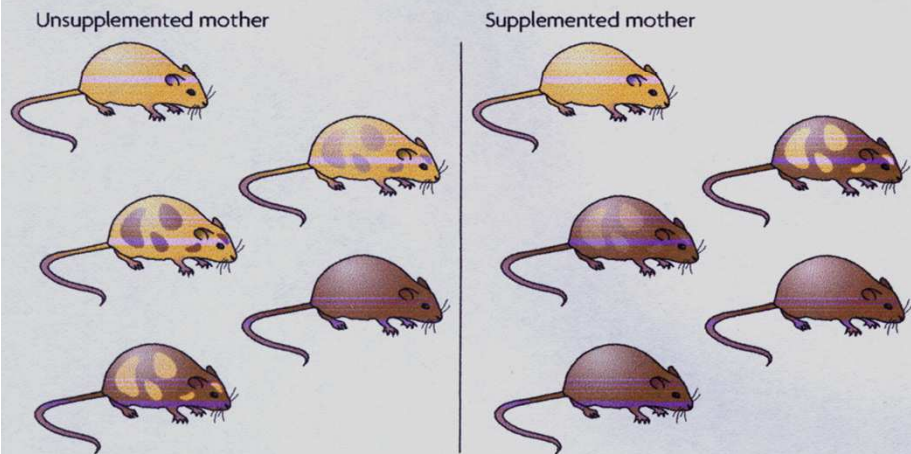
Jirtle & Skinner NatRevGenetics, 2007



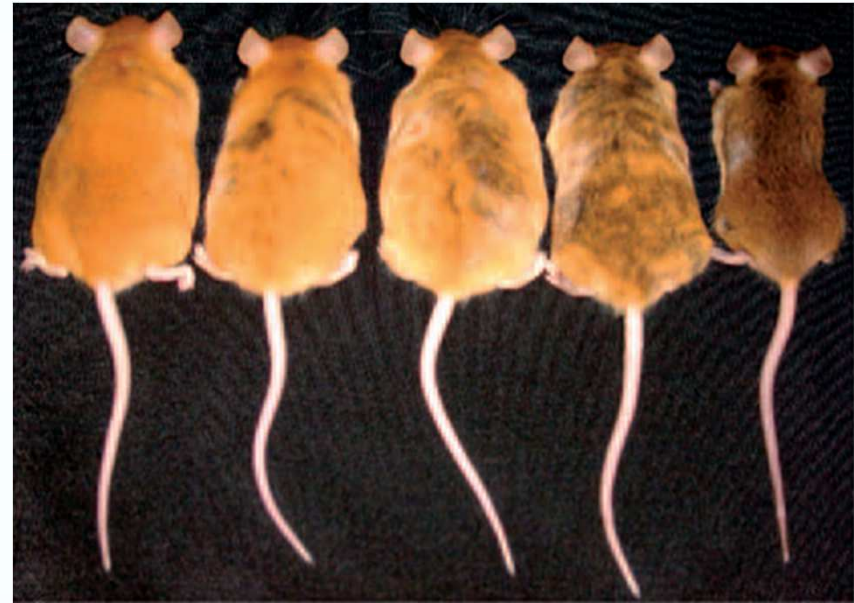
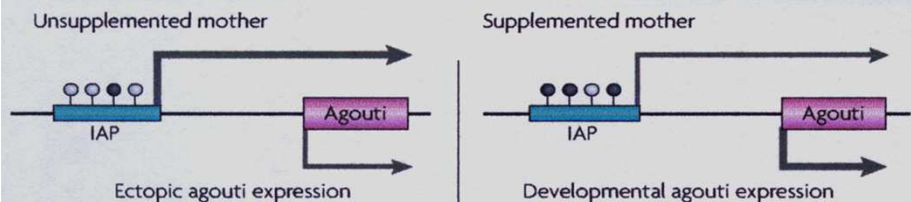
**a Dietary supplementation during pregnancy**



**b  $A^y/a$  offspring**



**c Agouti expression**



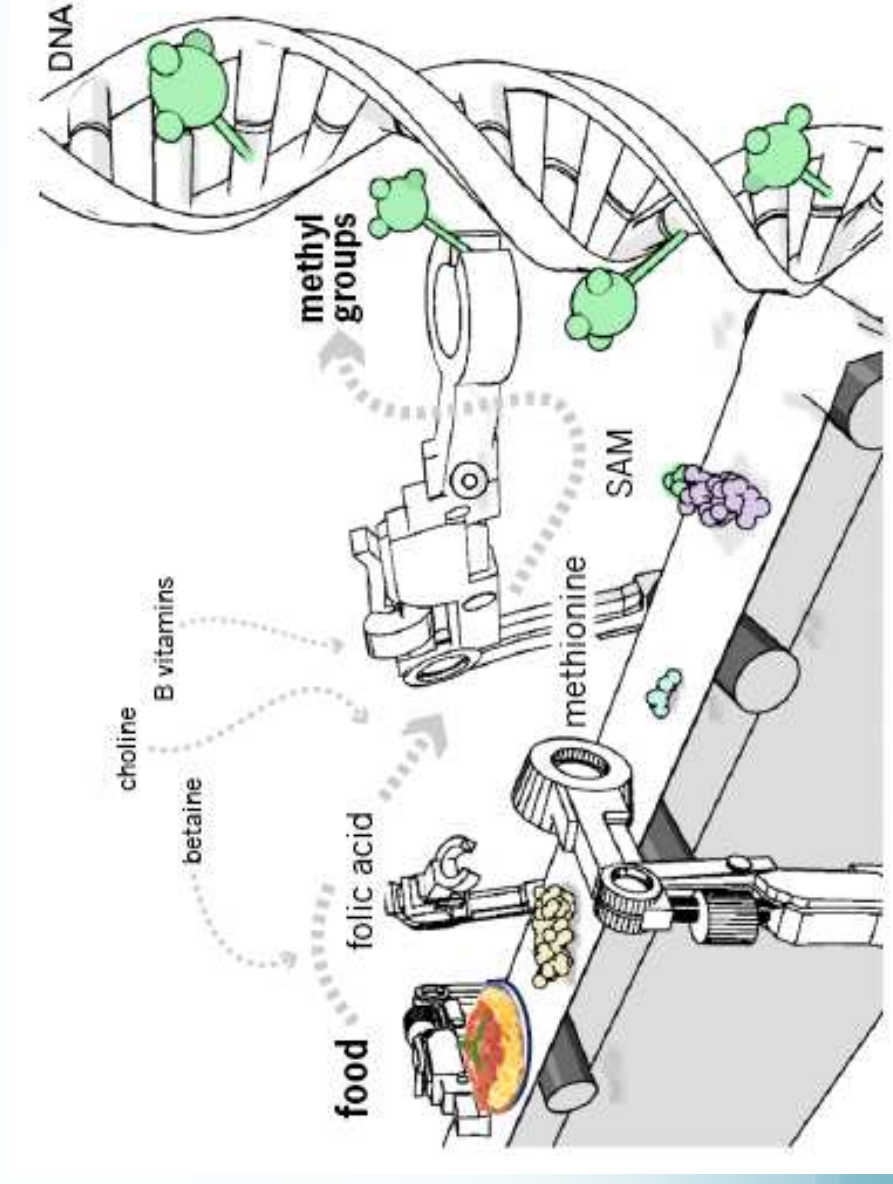
**La supplementazione materna durante la gravidanza con donatori di gruppi metilici può modificare il fenotipo della progenie interferendo con l'espressione di un gene responsabile del colore del mantello (e di altri tratti fenotipici)**

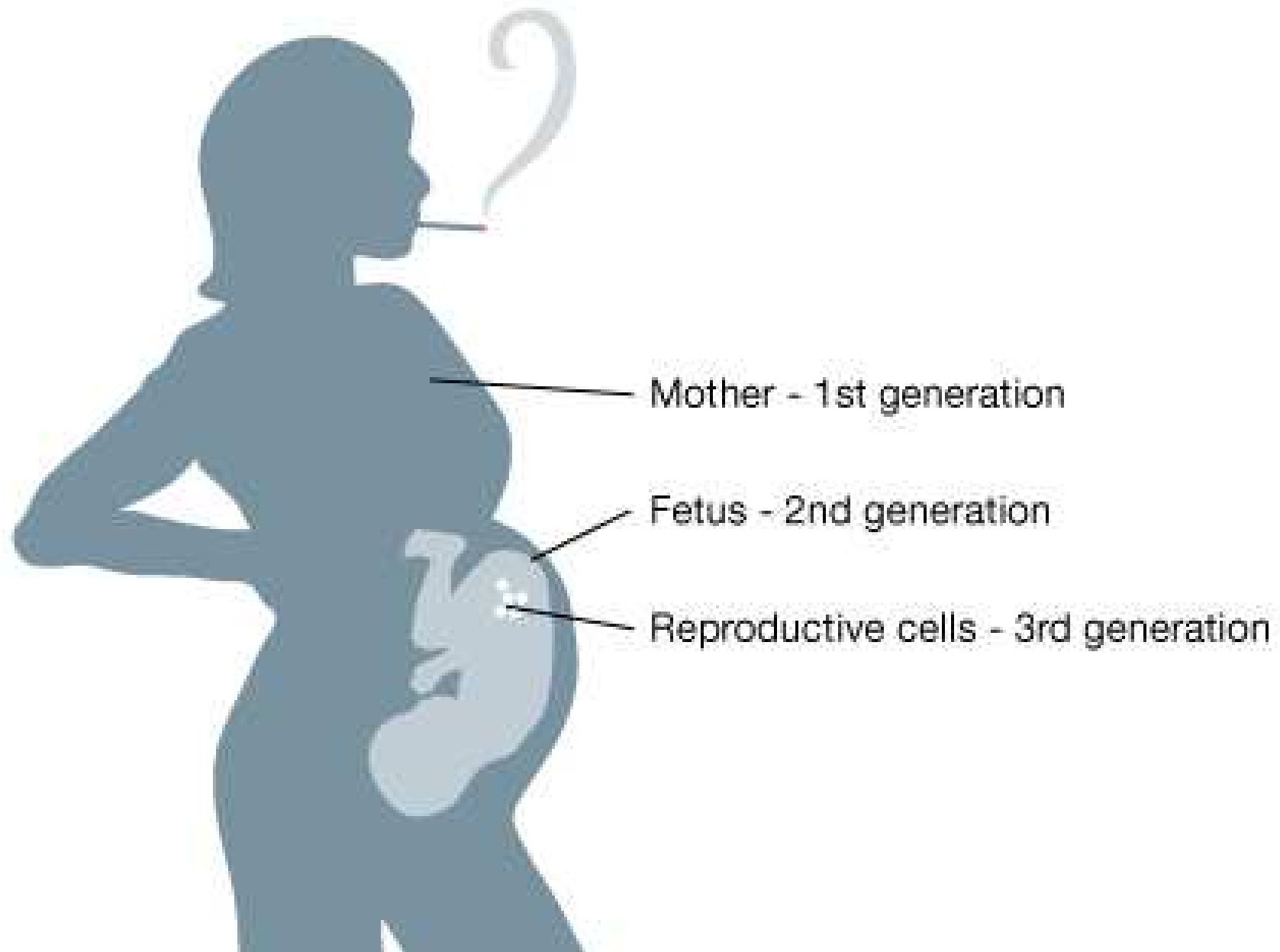
**Waterland, R. A. & Jirtle, R. L.  
*Mol. Cell. Biol.* 23, 5293–5300 (2003).**

# EPIGENOMA ED ALIMENTAZIONE



**Nutrienti provenienti dagli alimenti sono trasformati in gruppi metilici nell'ambito della via metabolica dei folati**





Tre generazioni esposte contemporaneamente alle stesse condizioni ambientali (dieta, tossine, ormoni, etc.).



# Modificazioni epigenetiche in figli di madri esposte in gravidanza a restrizioni caloriche



“The Dutch famine study”

Individui esposti nel periodo prenatale (*Dutch Hunger Winter in 1944–45*) avevano, 6 decenni dopo, livelli inferiori di metilazione del gene imprintato *IGF2*, rispetto ai fratelli non esposti dello stesso sesso, ed un aumento di metilazione di *LEP*.

Heijmans et al., *Epigenetics* 4:8, 526-531; November 16, 2009

**LE CONSEGUENZE SONO COMPARSE DOPO DECADI  
E SPESSO SENZA UNA CORRELAZIONE CON IL PESO  
ALLA NASCITA**

**INOLTRE DIPENDEVANO DAL PERIODO DI  
ESPOSIZIONE DEL FETO ALLE GRAVI RESTRIZIONI  
CALORICHE**

- ❖ **Se la restrizione calorica era avvenuta nella **seconda parte** della gravidanza, le conseguenze erano consistite in intolleranza al glucosio e T2D**
- ❖ **Ma se la restrizione calorica era avvenuta in un **periodo più precoce dello sviluppo fetale**, come risultato si aveva obesità e sintomi più complessi, correlati con la sindrome metabolica, con alterazioni del profilo lipidico, ipertensione, aterosclerosi precoce e malattie cardiovascolari, inclusi disordini del comportamento affettivo e schizofrenia**

# Una teoria emergente: la DOHaD



## Developmental Origins of Health and Diseases

International Society for  
Developmental Origins of Health and Disease  
[www.dohadsoc.org](http://www.dohadsoc.org)

**Sostiene che il rischio di malattie ad insorgenza nell'età adulta ("non communicable diseases") è associato con condizioni ambientali avverse durante lo sviluppo embrio-fetale.**

**Ciò è stato dimostrato in diversi modelli animali, incluso l'uomo.**

**Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. Int J Epidemiol. 2002 Dec;31(6):1235-9.**

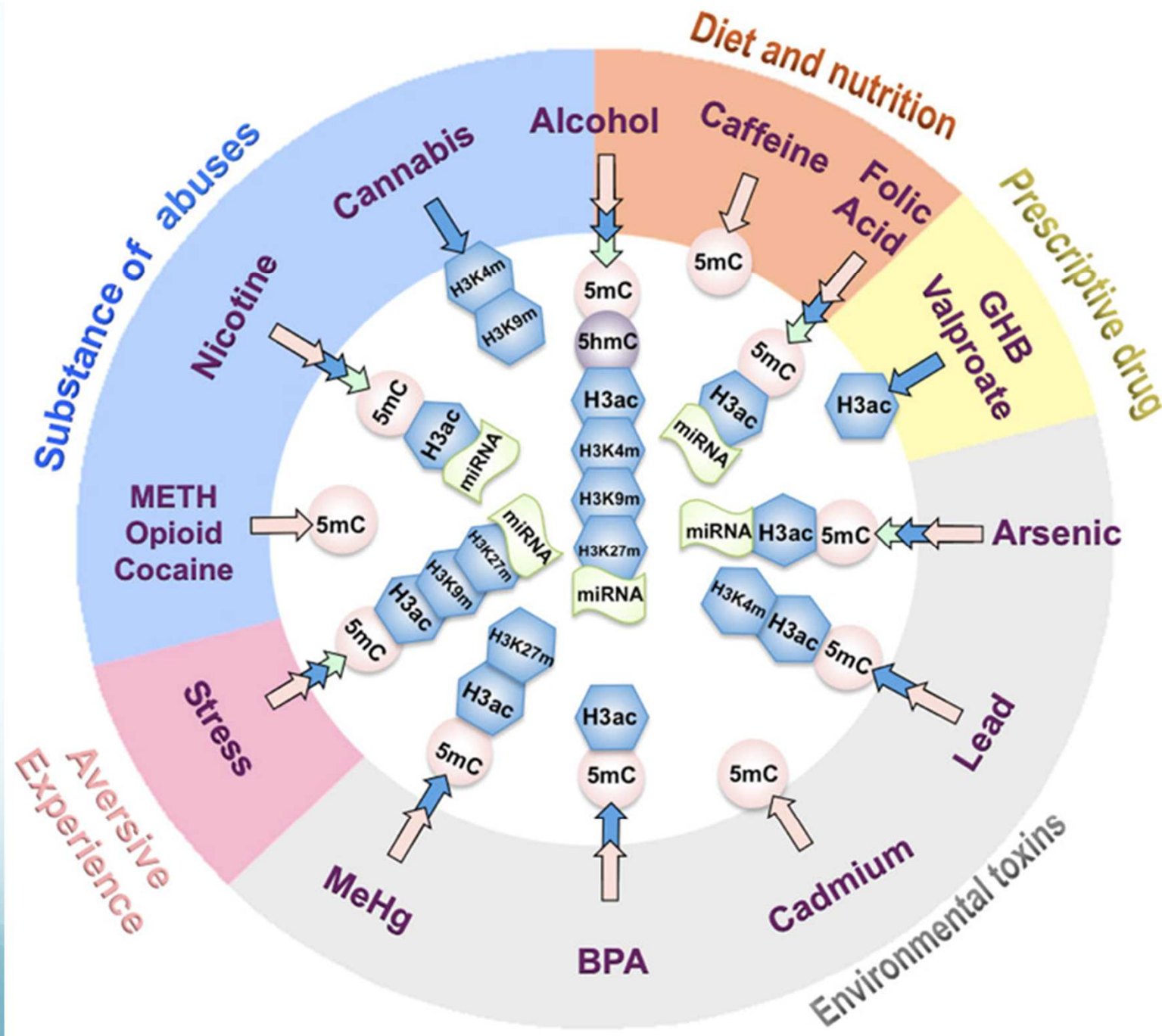
# DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease)

La maggior evidenza di interferenza con la 'programmazione' fetale è emersa dai **modelli di nutrizione materna**, ma anche altre condizioni, incluse **le tecniche di riproduzione assistita**, sono in grado di indurre, mediante modificazioni epigenetiche, cambiamenti del "fetal programming", con conseguenze patologiche anche a lungo termine.

Interventi tempestivi possono ridurre tali rischi negli individui e anche limitare la loro trasmissione alla generazione successiva.

E' stata istituita la **Società Internazionale della DOHaD** per promuovere ricerche sulle origini fetali delle malattie, che coinvolge un numero sempre crescente di scienziati di diversa estrazione (pediatri, neonatologi, ginecologi, genetisti, epidemiologi,..).





Lo and Zhou, Environmental Alterations of Epigenetics Prior to the Birth, *Int Rev Neurobiol*, 2014

# Alterazioni epigenetiche correlate a specifiche esposizioni ambientali

- Metalli pesanti (As, Cd, Pb..)
- Interferenti endocrini, *obesogeni*
- Dieta, alcol, farmaci (VPA, DES..)
- Stress



# **Interferenti endocrini (IE) (obesogeni)**

Ci sono  
sempre più  
evidenze che  
la attuale  
epidemia di  
obesità **sia**  
**causata**  
**dall'ambiente.**





Secondo le nuove prospettive l'obesità e le complicanze correlate sono associate **ad una componente ambientale**, multifattoriale, che include **farmaci, stress, nutrizione, microbioma, infezioni, i cicli di sonno-veglia, l'illuminazione notturna, composti chimici diffusi nell'ambiente (obesogeni)**, che possono far aumentare la suscettibilità ad acquistare peso ed alle altre conseguenze metaboliche, attraverso **modificazioni epigenetiche**.

Heindel et al. Environmental Health (2015) 14:54

Studi recenti sottolineano il crescente aumento di “**obesogeni**” nell’ambiente e nelle catene alimentari, tra cui in particolare gli interferenti endocrini



# L'ipotesi degli "obesogeni"

- Nel 2006 Grün and Blumberg formularono "**the *obesogen hypothesis***", secondo cui la pandemia di obesità che si sta verificando in questi ultimi tempi sarebbe, almeno in parte, conseguenza della diffusione nell'ambiente (specialmente nelle catene alimentari), di **xenobiotici** capaci di agire come **interferenti endocrini**, principalmente **durante il *fetal programming***: promuovendo l'iperplasia degli adipociti; facilitando i pathway dell'adipogenesi; disturbando l'omeostasi lipidica; interferendo con i meccanismi feedback dell'appetito e della sazietà



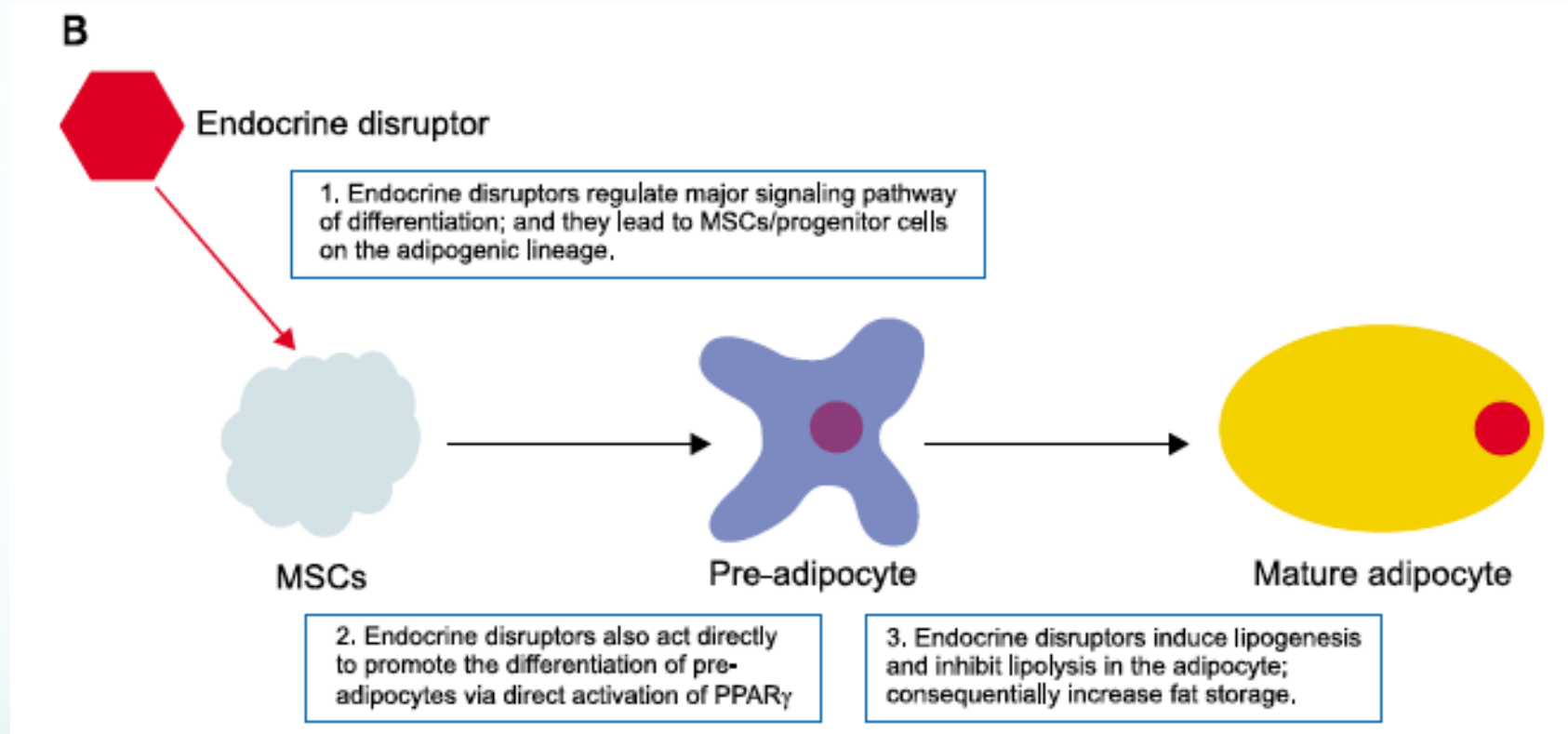
# Che cosa è un “obesogeno”?

Gli **obesogeni** possono essere definiti da un punto di vista funzionale come composti chimici che interferiscono impropriamente con **l'omeostasi dei lipidi** e promuovono **l'adipogenesi**.

Grün F, Blumberg B (2007) Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. Rev Endocr Metab Disord 8:161-71

**Gli obesogeni** (*interferenti  
endocrini*) agiscono  
mediante meccanismi  
**epigenetici**

# Interferenti Endocrini come Obesogeni



**Quando il target degli IE è l'adipocita, gli IE si comportano come obesogeni.**

In questo caso, gli obiettivi specifici sono il recettore gamma attivato dai proliferatori dei perossisomi (PPAR- $\gamma$ ) sulle cellule mesenchimali o cellule progenitrici

Table 2: “Obesogens” and “diabetogens” compounds

Compounds	Experimental evidence	Reference
EDC	Induce functional changes in murine adipocyte differentiation in vitro accompanied by decreased global DNA methylation	[188]
	Increases prevalence rates of metabolic disorders such as obesity and T2D.	[189, 190]
Bisphenol A	Induces hypomethylation and increased expression of Agouti gene in prenatally exposed mice at risk to develop obesity and diabetes	[106]
	Prenatal exposure during gestation results in premature accumulation of	[191]

## Obesogens

EDC: BPA\*, organochlorine pesticides (DDT, DDE..), PCB, brominated flame retardant, dioxins, phthalates, DES, heavy metals (Cd, Pb\*\*..)

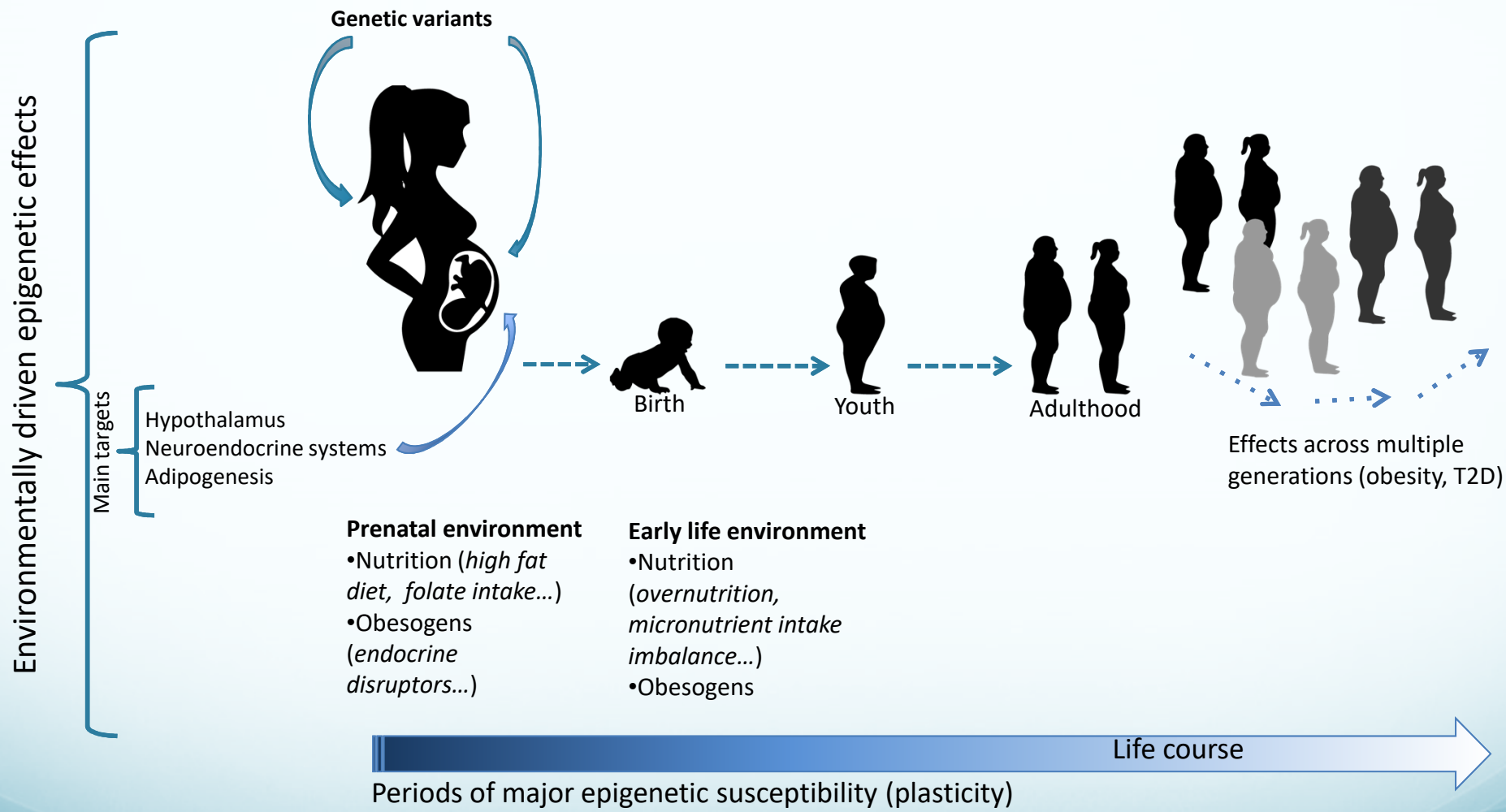
*\*Prenatal bisphenol A exposure was identified to have a 20% to 69% probability of causing 42 400 cases of childhood obesity, with associated lifetime costs of €1.54 billion (Legler J et al., 2015)*

*\*\*Park SS, et al., 2017 (prenatal exposure)*

EDC: endocrine-disrupting compounds; TBT: organotin tributyltin; DEHP: bis(2-ethylhexyl)phthalate; BPA: bisphenol A; DBP: dibutyl phthalate; DDT: 1-chloro-4-[2,2,2-trichloro-1-(4-chlorophenyl)ethyl]benzene; HCB: hexachlorobenzene; PBDEs: polybrominated diphenylethers; HBCD: hexabromocyclododecane; PFNA: perfluorononanoic acid; STZ: streptozotocin; ALX: alloxan; GLUT2: glucose transporter 2; GK: glucokinase; POP: persistent organic pollutant.

**Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics. Burgio E, Lopomo A, Migliore L. Mol Biol Rep. 2015 Apr;42(4):799-818.**

# Importanza degli effetti epigenetici determinati dall'ambiente durante il corso della vita e conseguenze transgenerazionali.



Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics.  
 Burgio E, Lopomo A, Migliore L.  
 Mol Biol Rep. 2015 Apr;42(4):799-818

# L'alcol: la sindrome alcolica fetale (FAS)



▲ Figura 18.12 Facies nella sindrome alcolica fetale.

**Difficoltà di apprendimento, microcefalia, difetti cardiaci congeniti, anomalie renali, ritardo di crescita, palatoschisi, facies caratteristica (rime palpebrali corte e filtro piatto)**

- I **disordini dello spettro feto-alcologico** (FASD), che comprendono un'ampia varietà di possibili manifestazioni, sono il risultato di **esposizione prenatale all'alcol**.
- Includono lievi disturbi comportamentali e di apprendimento, per arrivare alla forma più grave: la **sindrome alcolica fetale** (FAS). La FAS può includere DI e difetti dalla nascita. I deficit intellettuali FAS e FASD sono molto variabili ed eterogenei. Questi sintomi sono considerati cronici, spesso concomitanti con altri disturbi mentali, e si manifestano durante lo sviluppo. FASD rappresenta una delle cause più comuni di difficoltà dell'apprendimento, deficit cognitivi e DI.



*FASD si può configurare come un contrassegno nuovo e permanente dell'espressione genica con implicazioni in funzioni cellulari correlate con l'alcol.*

- Esisterebbe un continuum di cambiamenti che coinvolgerebbe l'**espressione genica**, la **fisiologia cellulare**, il **neurosviluppo** e i **comportamenti** correlati con FASD. In effetti si è capito di recente che **questi cambiamenti** sono **mediati da meccanismi epigenetici**

- Diversi fattori contribuiscono alla variabilità fenotipica osservata nella FAS /FASD, inclusa la **quantità**, la **frequenza** e la **durata dell'esposizione** ad alcol (Coles, 1993; Abel, 1995; Maier and West, 2001; May et al., 2013), lo **stadio** di sviluppo al momento del consumo e fattori materni quali il **background genetico**.
- In effetti solo il **5-10%** delle donne che assumono alcol in gravidanza dà alla luce bambini che mostrano caratteristiche di FASD

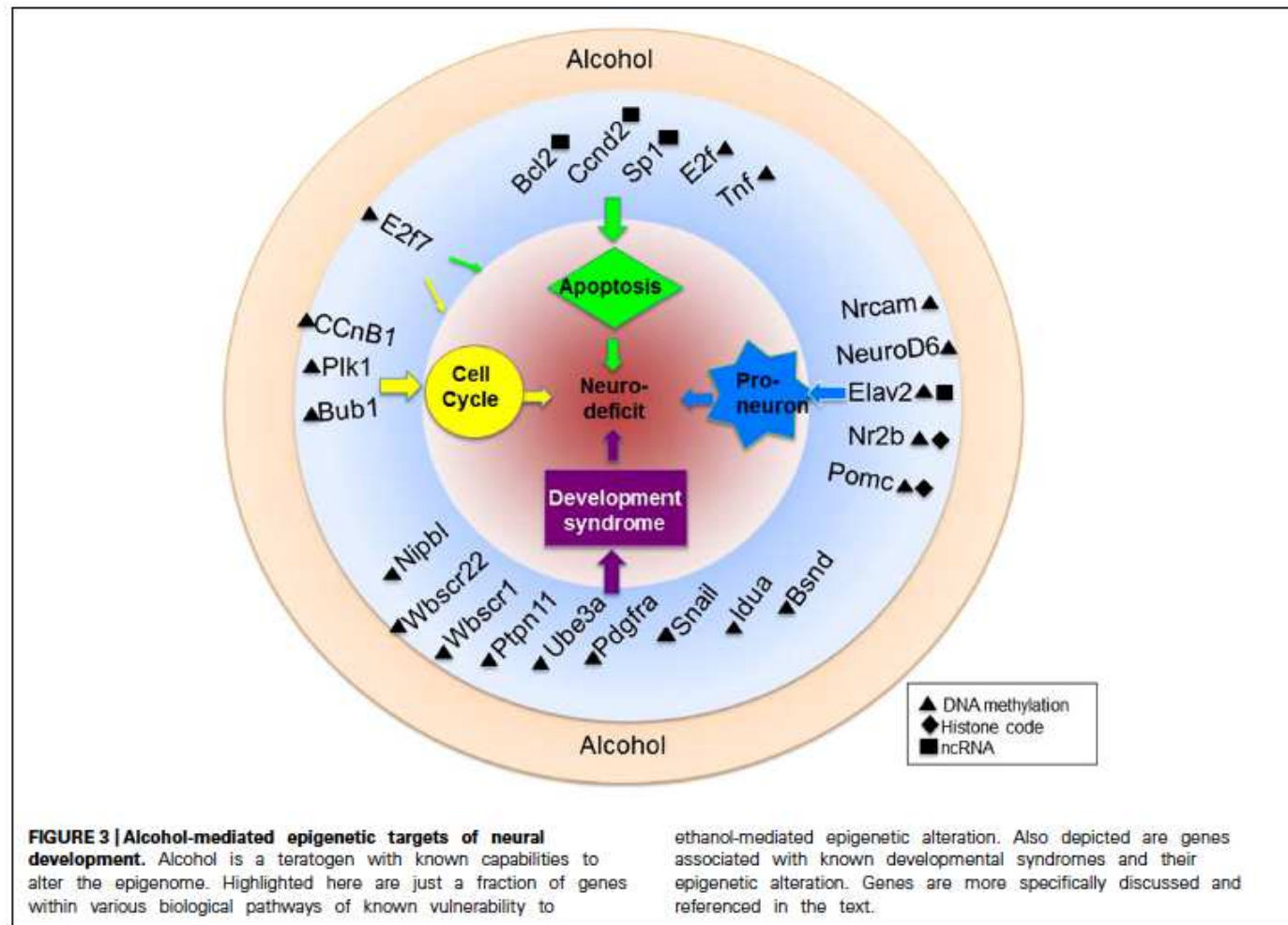
# Geni coinvolti nel neurosviluppo, target dell'alcol, mediante meccanismi epigenetici

Resendiz et al.

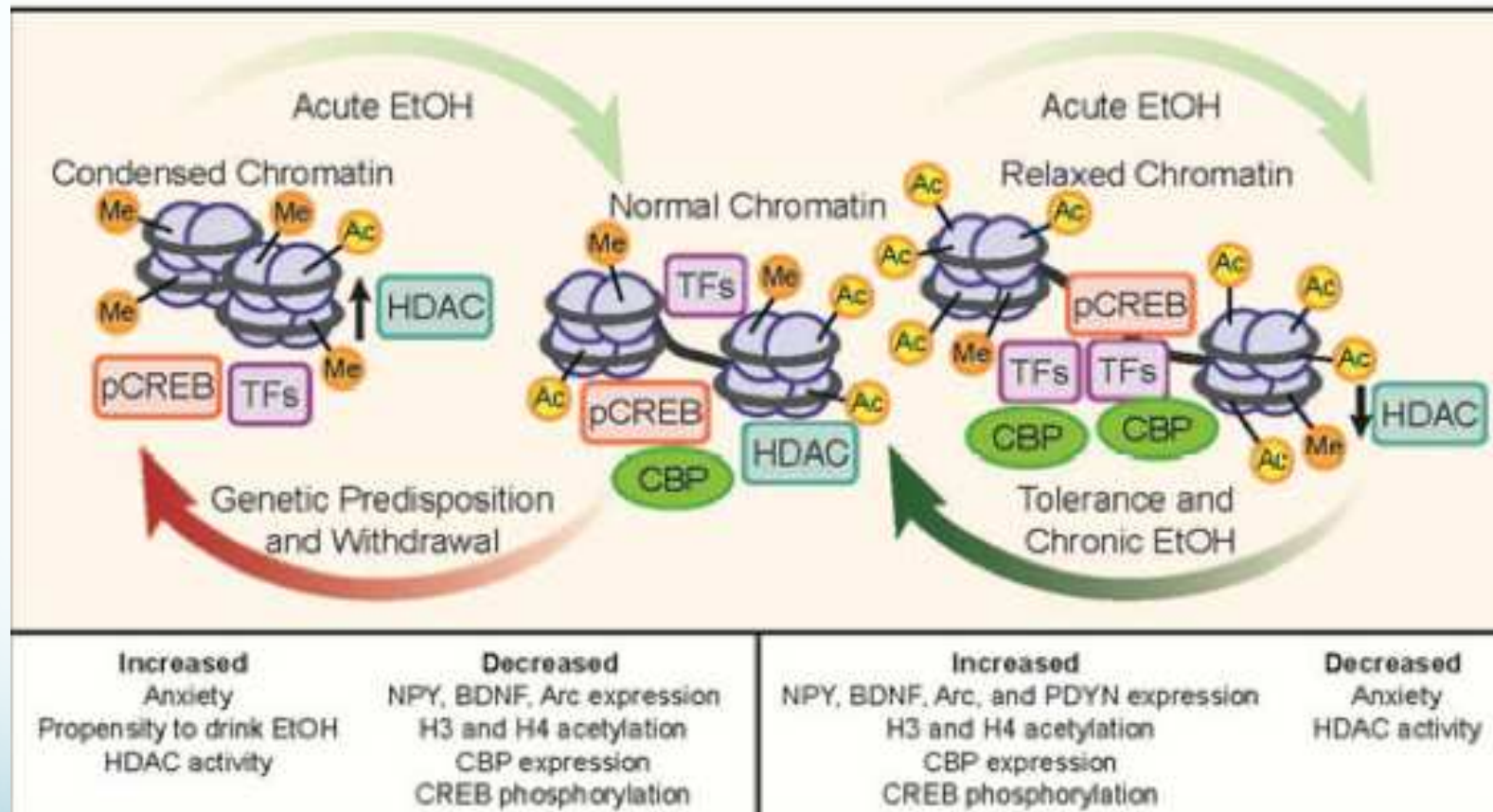
Neuroepigenetic development and alcohol interference

Frontiers in Genetics | Epigenomics and Epigenetics

August 2014 | Volume 5 | Article 285 | 8



## Summary of alcohol-induced histone modifications (acetylation/methylation) in the rat amygdala.



# Studi su volontari umani

- Esaminata la metilazione del DNA anche in volontari consumatori di alcol → cambiamenti stabili in > **6500 promotori genici**. I geni interessati sono coinvolti nel **neurosviluppo** e in **processi cerebrali nell'adulto**.
- I cambiamenti di metilazione includono anche un certo numero di **siti di legame di repressori trascrizionali** (CTCF) noti per legarsi a DMR di geni imprinted. Questi cambiamenti sono relativamente **stabili** durante lo sviluppo e sono soggetti a **riprogrammazione nelle cellule germinali**.



# E l'assunzione paterna pre-concezionale di alcol? (*effetti transgenerazionali.*)

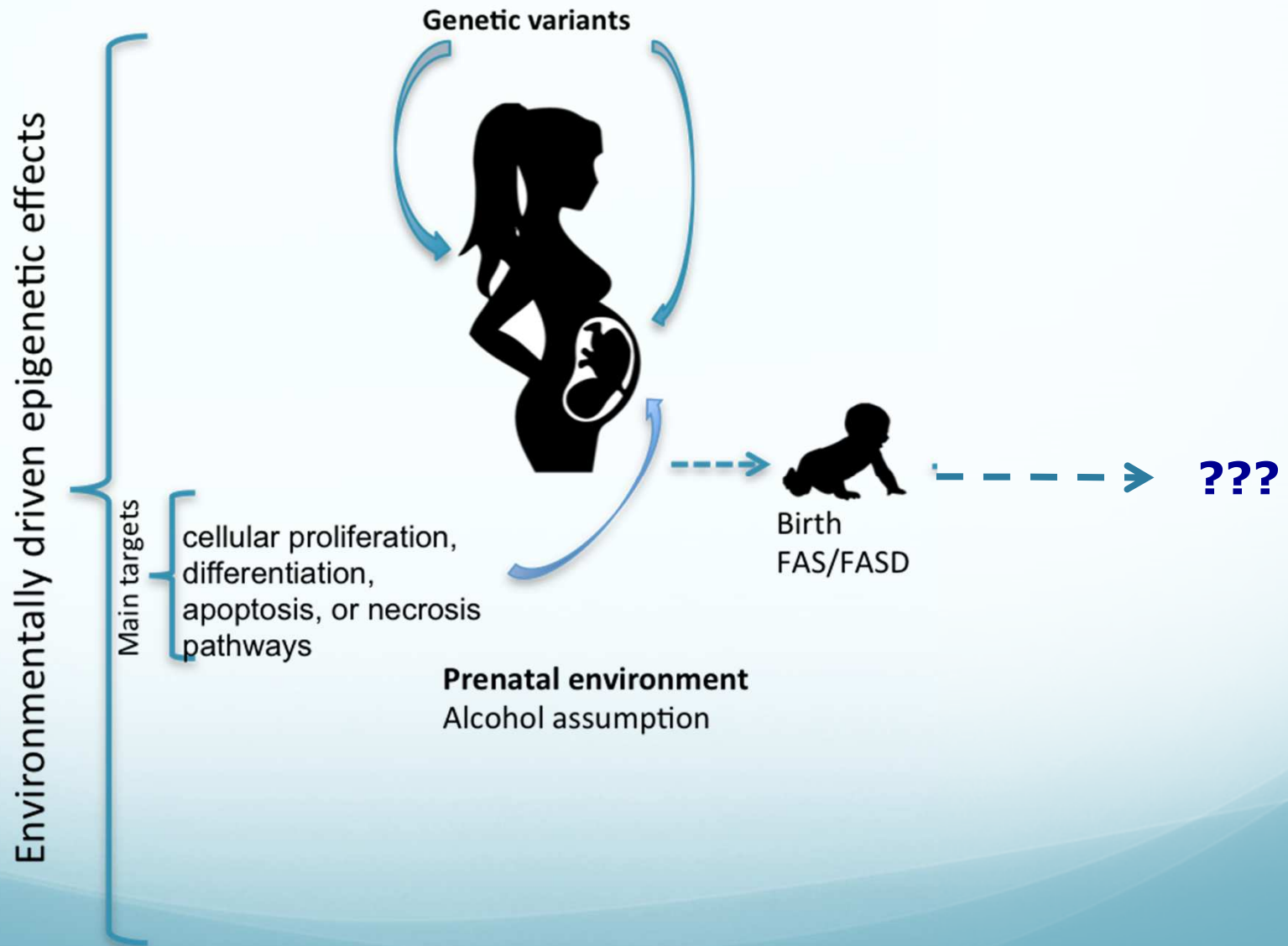


- ✓ Assunzione cronica di alcol (ratti, 3 volte/sett per 9 sett) **alterati livelli di metilazione** (*DNMTs*) nel **DNA spermatico** (Bielawski et al., 2002).
- ✓ Effetti transgenerazionali in topi esposti a basse dosi di alcol in utero. Variazione del pattern di metilazione del gene a imprinting paterno **H19** (Stouder et al., 2011)
- ✓ **Analoga riduzione della metilazione di H19 e RASGRF1** negli spermatozoi di topi esposti ad alcol (Knezovich e Ramsay, 2012)
- ✓ **Effetto del consumo paterno di alcol sulla metilazione di H19 e IG DMR (> 99% metilati). Nei gruppi di bevitori : ipometilazione delle 2 DMR. H19 + sensibile alla demetilazione mediata dall'alcol (Ouko et al. (2009)**



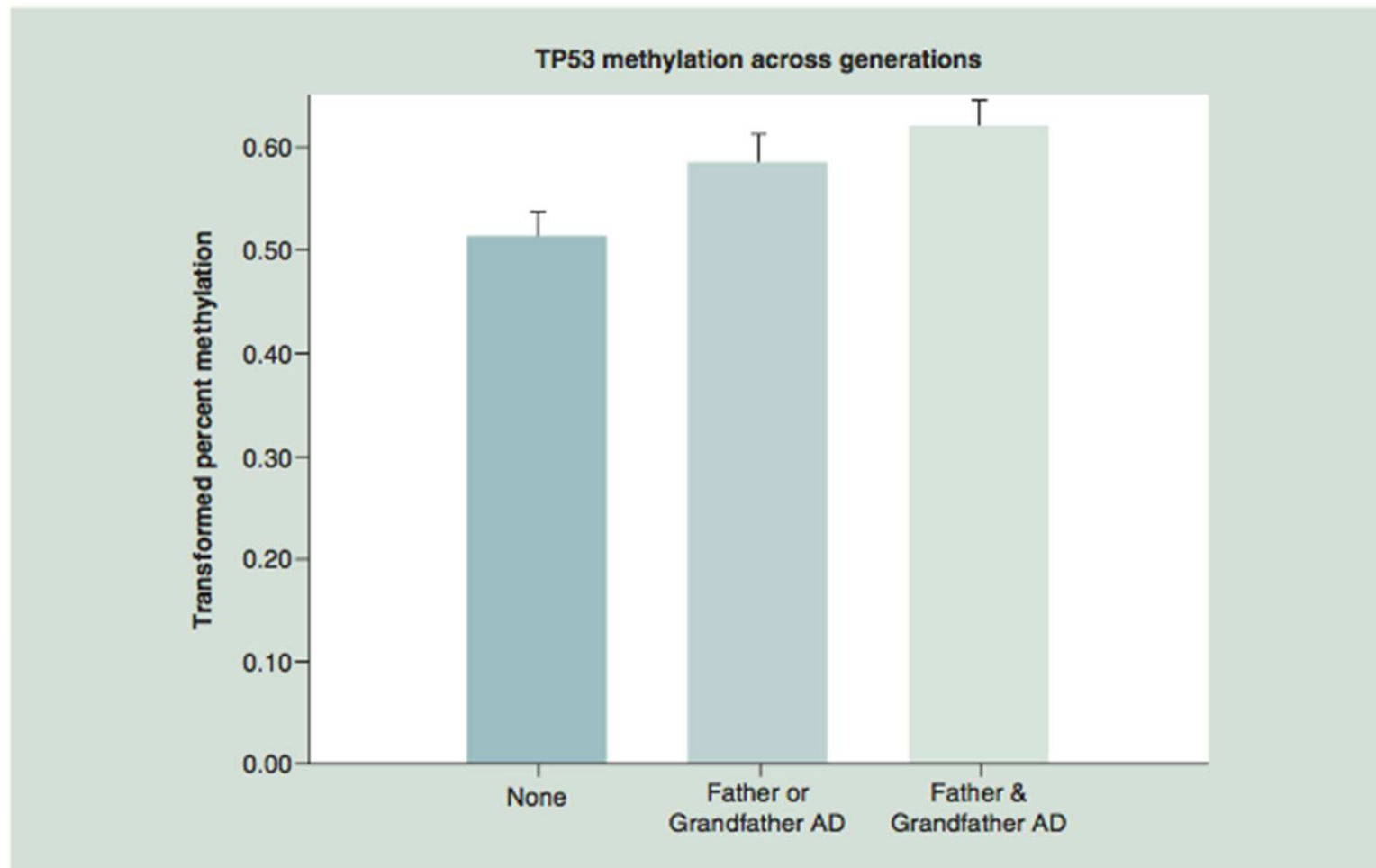
**Impiego dei livelli di metilazione di H19 come biomarker dell'esposizione paterna ad alcol.**

# Genetic and environmental factors, epigenetic mechanisms and FAS/FASD

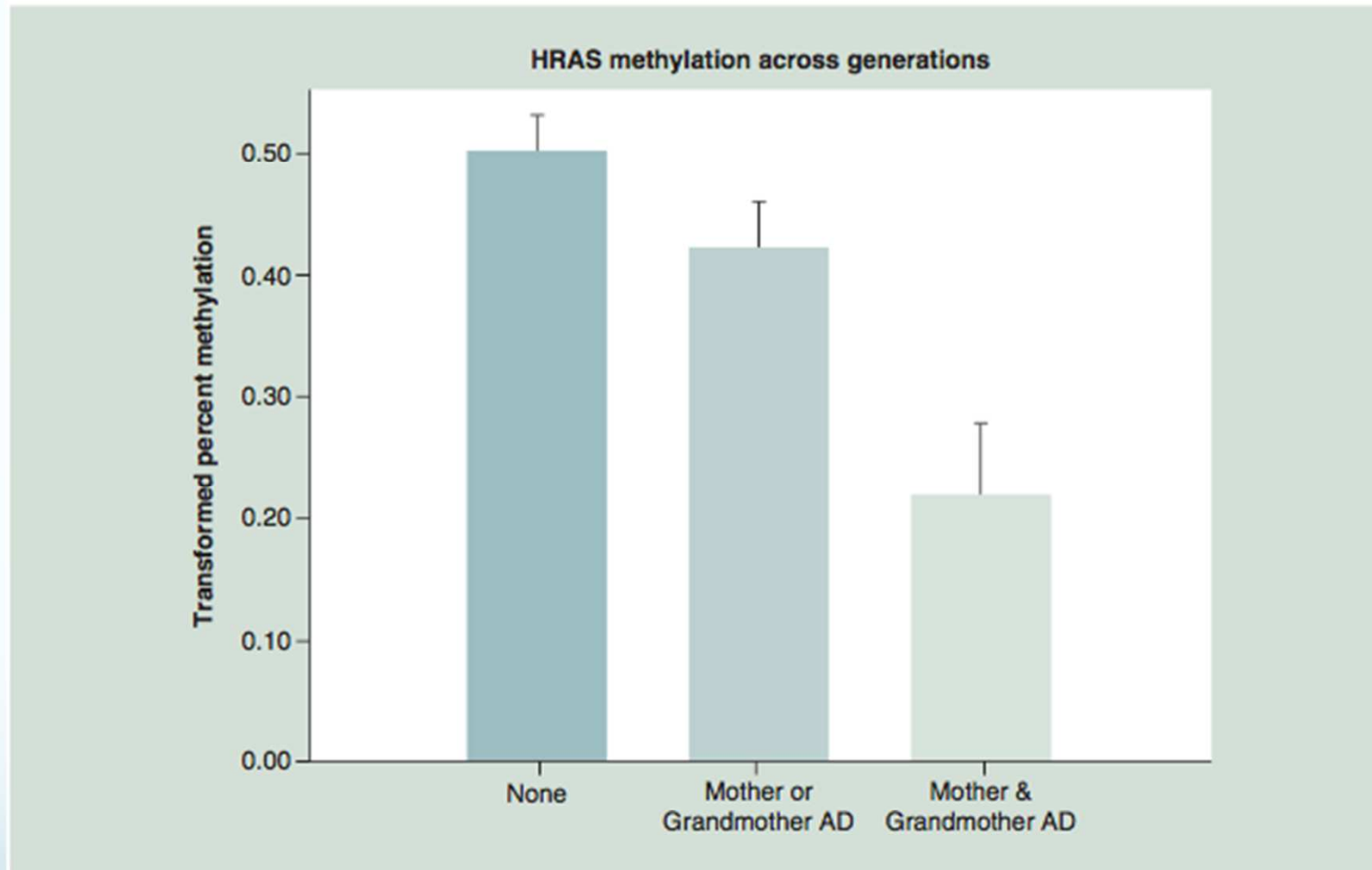


# Le modificazioni epigenetiche permangono nel corso delle generazioni

L'esposizione *ancestrale* all'alcol può avere effetti duraturi che influenzano processi epigenetici come la metilazione del DNA, che controlla l'espressione di geni critici per lo sviluppo del cancro come *HRAS* e *TP53*.



**Figure 5. TP53 methylation across generations.** TP53 methylation in offspring was compared with those without a father or grandfather with alcohol dependence, with those with either a father or grandfather and those having both. Statistical analysis controlled for age at DNA collection, the mothers' prenatal use of substances and the offspring's personal use up to the time of DNA collection. Hypermethylation of CpG sites is seen in association with increased familial AD across generations ( $p = 0.0068$ ). This hypermethylation suggests lesser expression of the tumor suppressor gene.  
AD: Alcohol dependence.

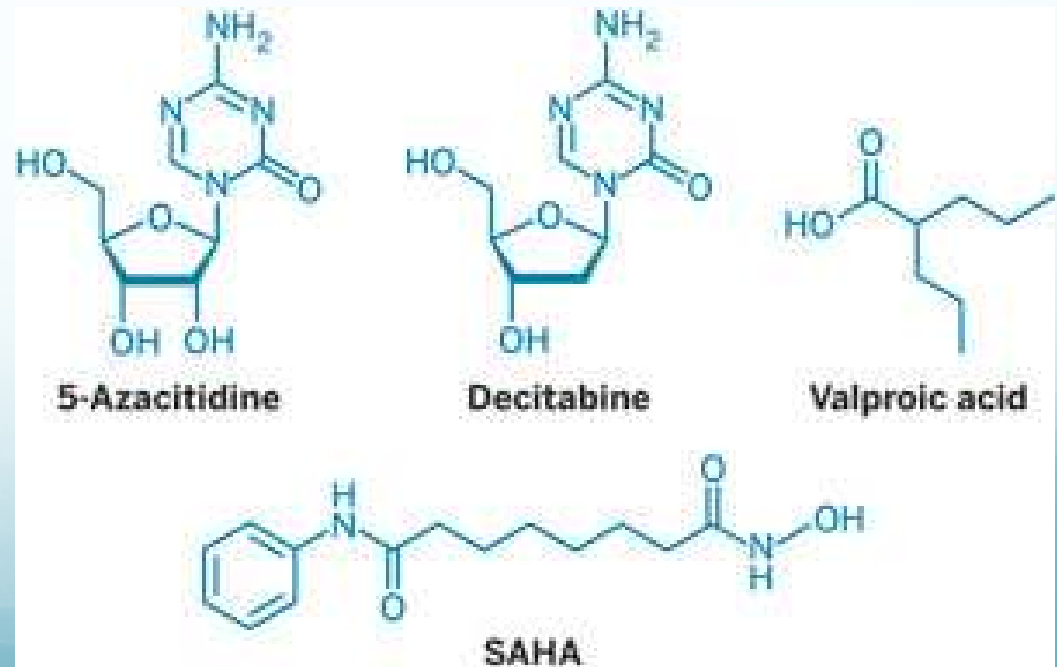


**Figure 3.** *HRAS* methylation in offspring was compared with those without a mother or grandmother with alcohol dependence, those with either a mother or grandmother and those having both. Statistical analysis controlled for age at DNA collection, the mothers' prenatal use of substances and the offspring's personal use up to the time of DNA collection. Hypomethylation of *HRAS*CpG sites is seen in association with increased familial AD across generations ( $p = 0.003$ ).  
AD: Alcohol dependence.

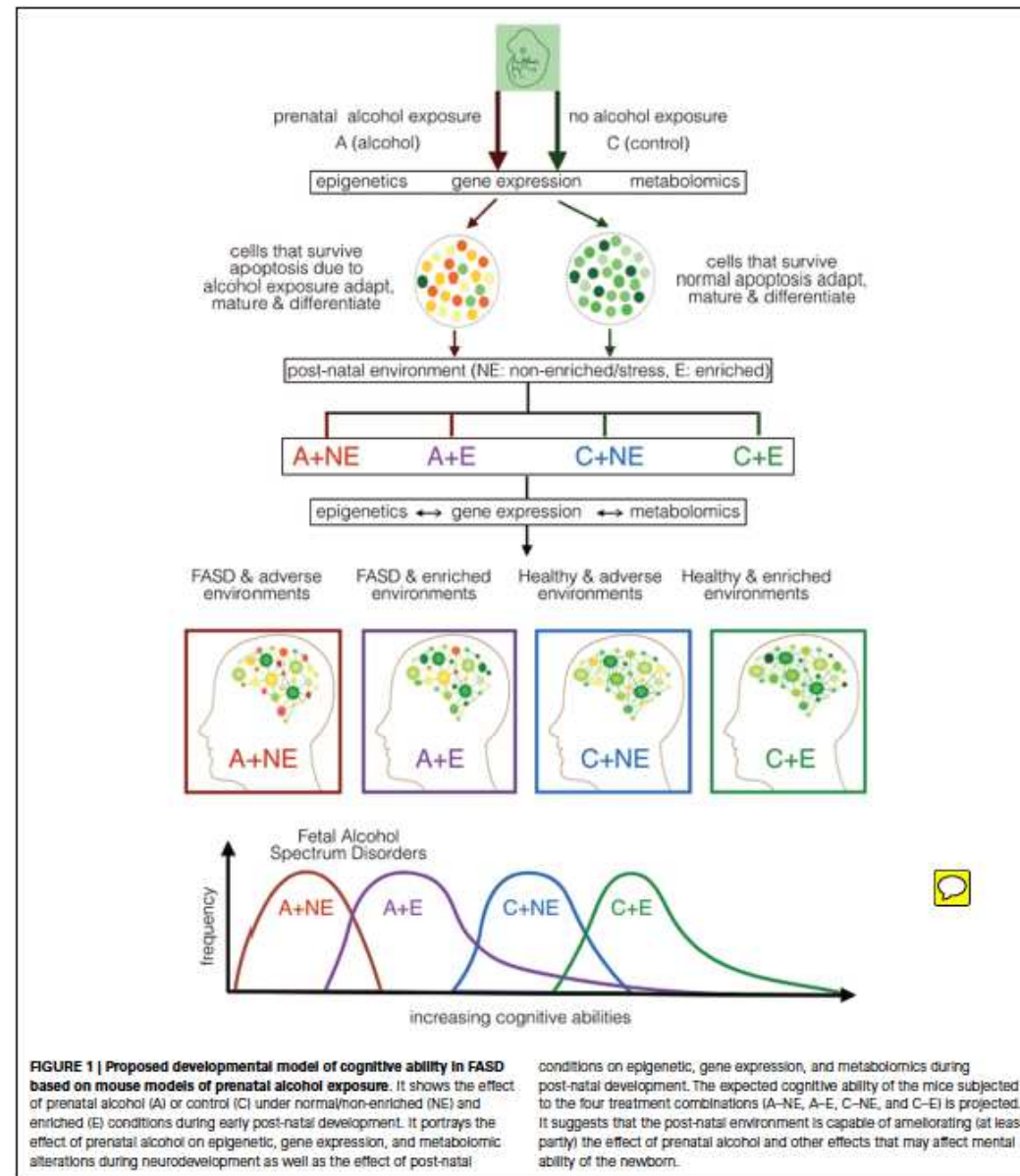


# Le modificazioni epigenetiche sono reversibili

- Data la natura dinamica delle modificazioni epigenetiche, si intravede una grande potenzialità per interventi terapeutici che possano far revertire i cambiamenti di lunga durata che contribuiscono alle malattie ad eziologia epigenetica, compresi FASD.



Le modificazioni epigenetiche sono reversibili  
Proposta: Post-natal EE in FASD



# Riassumendo...

- ✓ **L'ambiente è in grado di interferire con il genoma, modificandolo epigeneticamente**
- ✓ **Questo spiega il ruolo dei fattori ambientali alla base di molte malattie complesse (cancro, malattie del neurosviluppo..)**
- ✓ **Esistono periodi della vita in cui siamo più vulnerabili (pre- e post-natale)**
- ✓ **Le modificazioni epigenetiche sono reversibili**

**Grazie per l'attenzione!**

