

FOCUS

EPIGENETICA E RISCHIO CARDIOVASCOLARE IN ETÀ PEDIATRICA

Epigenetics and cardiovascular risk in childhood

FRANCESCO MARTINO, ELIANA MARTINO

Dipartimento di Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, Cardiologia Pediatrica,
Policlinico Umberto I "Sapienza" Università di Roma

SUMMARY

Cardiovascular disease (CVD) can arise at the early stages of development and growth. Genetic and environmental factors may interact resulting in epigenetic modifications with abnormal phenotypic expression of genetic information without any change in the nucleotide sequence of DNA. Maternal dietary imbalance, inadequate to meet the nutritional needs of the fetus can lead to intrauterine growth retardation (IUGR), decreased gestational age, low birth weight, excessive post-natal growth and metabolic alterations, with subsequent appearance of CVD risk factors. The IUGR, in later years, may correlate with nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. Fetal exposure to high cholesterol, diabetes and maternal obesity is associated with increased risk and progression of atherosclerosis. Maternal smoking during pregnancy and exposure to various environmental pollutants induce epigenetic alterations of gene expression relevant to the onset or progression of CVD. In children with hypercholesterolemia and/or obesity, oxidative stress activates platelets and monocytes, which release pro-inflammatory, pro-atherogenic and pro-oxidants substances, inducing endothelial dysfunction, decreased Doppler flow-mediated dilation and increased carotid intima-media thickness. Primary prevention of atherosclerosis should be implemented early. It is necessary to identify, through screening, high-risk apparently healthy children and take care of them enforcing healthy lifestyle (mainly consisting of Mediterranean diet and physical activity), prescribing nutraceuticals and eventual medications, if required by a high-risk profile. The key issue is the restoration of endothelial function in the reversible stage of atherosclerosis. Epigenetics may provide new markers for an early identification of children at risk and thereby develop innovative therapies and specific nutritional interventions in critical times.

Keywords: cardiovascular disease, epigenetics, intrauterine growth retardation, oxidative stress, childhood.

Indirizzo per la corrispondenza

Francesco Martino
Dipartimento di Pediatria e Neuropsichiatria
Infantile, Cardiologia Pediatrica, Policlinico
Umberto I "Sapienza", Università di Roma
Viale Regina Elena, 324 - 00161 Roma
E-mail: francesco.martino30@tin.it

Le malattie cardiovascolari (MCV) sono la principale conseguenza dell'aterosclerosi, un processo cronico-degenerativo che, come dimostrato da importanti e numerose ricerche, ha le sue origini in età pediatrica, fin dall'età gestazionale. Ogni

anno nell'Unione Europea si verificano 1,8 milioni di decessi e si spendono circa 210 miliardi di euro per malattie ed eventi cardiovascolari, che potrebbero essere ridotti dell'80% eliminando i fattori di rischio. In Italia il tasso di mortalità per MCV è pari a 383 morti ogni 100 mila abitanti (Eurostat, Public health, 2013); ogni anno sono oltre 135 mila gli eventi coronarici acuti (infarti), e circa un terzo di questi ha un esito fatale. È stato evidenziato, inoltre, che chi ha avuto un primo infarto ha maggiori probabilità di averne un secondo. La possibilità di ricovero, infatti, entro i due anni dal primo evento coronarico acuto, è superiore al 60% dei casi e il 30% di questi è dovuto a una nuova sindrome coronarica acuta.

L'idea che i segni di aterosclerosi e le MCV siano clinicamente rilevanti solo du-

rante l'età adulta e anziana è cambiata negli ultimi anni. Vi è crescente evidenza, infatti, che le malattie cronico degenerative dell'età adulta cominciano a formarsi nelle prime fasi dello sviluppo e della crescita. Già dagli anni 80 del secolo scorso Barker ipotizzava che le più frequenti patologie dimetaboliche acquisite, tipiche dell'età adulta, sarebbero legate al fenomeno del "fetal programming": nel caso in cui le capacità dell'unità materno-placentare non soddisfino le richieste del feto, i primitivi adattamenti favorirebbero lo sviluppo di patologie quali l'ipertensione arteriosa, le malattie cardiovascolari e il diabete mellito tipo 2 (1, 2). Studi sperimentali e in vitro confermano che la crescita fetale è molto vulnerabile, soprattutto durante il primo trimestre di gravidanza (3-5). Lo sviluppo della vita precoce è criticamente sensibile alla nutrizione inadeguata e ad altri fattori ambientali, portando a mutamenti permanenti nello sviluppo che possono influenzare la salute del nascituro a lungo termine (6). La crescita fetale è un processo complesso che dipende sia dal corredo genetico che dall'ambiente intrauterino. Un adeguato apporto nutritivo durante la gravidanza e l'allattamento è necessario per il normale sviluppo del feto/neonato. È anche noto che l'ambiente, l'alimentazione e lo stile di vita peri-concezionale dei genitori possono creare effetti duraturi sulla salute della prole (7, 8). Fattori ambientali e genetici possono interagire già dall'età gestazionale provocando alterazioni epigenetiche che possono riprogrammare i geni metabolici in utero, dare origine a markers precoci di rischio cardiovascolare nel neonato/bambino e MCV nell'età adulta.

L'epigenetica rappresenta un fenomeno di alterata espressione fenotipica che si ha senza cambiamenti della sequenza nucleotidica; può interessare la metila-

Punti chiave

- I cambiamenti epigenetici rappresentano una risposta biologica a fattori di stress ambientale e possono essere trasmessi alla prole influenzandone il rischio di aterosclerosi.
- La dieta è un importante modificatore del profilo epigenetico prima della nascita. In effetti, gli squilibri nutrizionali del padre prima del concepimento e della madre durante la gravidanza possono predisporre il feto al rischio di malattie cardiovascolari e malattie metaboliche nell'età adulta.
- L'ipercolesterolemia materna durante la gravidanza può causare ipercolesterolemia fetale e perossidazione lipidica con conseguente disfunzione endoteliale e formazione di lesioni aterosclerotiche primordiali. Lo stato epigenetico del genoma fetale, influenzato dalla nutrizione materna, può persistere nell'età adulta.
- La prevenzione primaria dell'aterosclerosi dovrebbe essere iniziata il più precocemente possibile. Il punto chiave è il ripristino della funzione endoteliale nella fase reversibile dell'aterosclerosi.
- È necessario identificare, attraverso screening, i bambini ad alto rischio sebbene apparentemente sani.
- I mircoRNA sono emersi come un nuovo strumento valido non solo per la diagnosi e la stratificazione del rischio, ma anche come potenziale bersaglio terapeutico.

zione del DNA, le alterazioni degli istoni e dei microRNA (9). La metilazione del DNA può essere influenzata dall'alimentazione, in particolare da nutrienti portatori di gruppi metilici come le vitamine e gli aminoacidi. Gli istoni, ottameri di proteine basiche attorno a cui si avvolge il DNA in doppia elica, nelle code terminali possono andare incontro ad alterazioni enzimatiche. I microRNA, il cui interesse è andato aumentando negli ultimi anni, sono piccole molecole endogene di RNA non codificante che contengono circa 22 nucleotidi. Sono implicati nell'eziopatogenesi di diverse malattie, soprattutto di quelle cronico-degenerative come l'aterosclerosi e quindi delle MCV (10-12). Lo stress ossidativo, che si ha nell'eziopatogenesi dell'aterosclerosi, può portare a disfunzione endoteliale con attivazione cellulare sia piastrinica che monocitica e rilascio di sostanze pro-aterogene, pro-infiammatorie, vasocostrittrici e pro-ossidanti (13-15). Recentemente sono state osservate alterazioni epigenetiche di alcuni microRNA in bambini ipercolesterolemici (16, 17). L'epigenetica è un paradigma chiave della salute riproduttiva. I modulatori epigenetici, attraverso le modificazioni epigenetiche, possono rimodellare la cromatina e dare origine a fenotipi alterati (18).

Il maschio, sottoposto a radiazioni ionizzanti, ad alcool, fumo e diete squilibrate, può andare incontro a modificazioni epigenetiche che alterano la morfo-funzionalità degli spermatozoi con ripercussioni negative sulla fecondazione, sull'embriogenesi, e, dopo la nascita, sul neonato e sull'adulto (19). È scientificamente accertato che malattie della madre durante la gravidanza (sovrappeso, obesità e diabete), squilibri nutrizionali e alterati stili di vita (fumo, abuso di alcool, droga ecc.) pre e periconcezionali, sia materni che paterni, possono dare origine ad un ritardo di crescita

intrauterino (IUGR), ad una diminuita età gestazionale, ad un basso peso alla nascita e, infine, ad un'eccessiva crescita di recupero di peso in età precoce, il cosiddetto '*adiposity rebound*', con sviluppo successivo di obesità, sindrome metabolica e aumento delle probabilità di andare incontro in futuro a malattie e neoplasie del fegato, diabete di tipo 2 e MCV (20, 21).

I neonati, soprattutto se pretermine, sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo perché presentano una produzione accelerata di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e la protezione limitata di antiossidanti, aumentando la suscettibilità alle MCV nelle età successive. La programmazione ossidativa di stress-mediato può agire direttamente attraverso la regolazione epigenetica del gene. Lo stress ossidativo e gli squilibri nutrizionali sono considerati meccanismi importanti della programmazione e dello sviluppo di malattie cardiovascolari, che si manifestano dopo un lungo periodo asintomatico (22). Recentemente è stato dimostrato che l'espressione di miR-155, miR-181a e miR-221 differisce nei bambini nati da donne obese rispetto ai bambini nati da donne di peso normale. I cambiamenti nell'espressione dei microRNA potrebbero partecipare alla programmazione epigenetica fetale dei disturbi metabolici nei bambini nati da donne obese (23). Tra l'altro, i nati da genitori obesi presentano alterata metilazione del DNA rispetto ai bambini nati da genitori in normopeso. Lo stile di vita pre-concezionale dei genitori può causare, durante la gametogenesi e lo sviluppo precoce, effetti epigenetici transgenerazionali (24). Uno studio sperimentale, condotto su ratti, ha dimostrato che la dieta ricca in grassi e l'obesità della madre durante la gravidanza provocano alterazioni della metilazione del DNA e del microbioma intestinale, predisponendo la prole all'in-

fiammazione epatica e alla fibrogenesi che contribuiscono alla patogenesi della steatosi epatica non alcolica (NASH) (25).

È recente l'interesse per la nutrizione, il microbioma intestinale e l'epigenetica, la cui interazione, nel tempo, può dare origine a rischio cardiovascolare attraverso metilazione e modificazioni epigenetiche e alterazioni del metaboloma, lipidoma e proteoma (26). Infatti i fattori di rischio gestazionali (aumento di peso, BMI, dieta, farmaci) influenzano il microbiota intestinale materno, con ripercussioni sul feto che, anche dopo la nascita, attraverso l'allattamento al seno, può subire ulteriori modifiche del suo microbioma. Si possono così porre le basi per la formazione, in futuro, di malattie metaboliche e autoimmuni (27). L'interrelazione tra nutrizione materna e neonatale, microbiota intestinale ed epigenetica avviene durante i primi 1.000 giorni di vita (28). L'alimentazione materna, pertanto, può influenzare lo stato epigenetico del genoma fetale che può persistere nell'età adulta. È stato inoltre dimostrato che una dieta a basso contenuto proteico è associata ad alterata metilazione prenatale del DNA dei geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi (29).

L'ipercolesterolemia in gravidanza influenza il "programming" in utero e aumenta la suscettibilità all'aterosclerosi nelle età successive (30). Durante le prime fasi della gravidanza, l'ipercolesterolemia materna può dare origine a ipercolesterolemia, perossidazione lipidica e alterazioni dei geni aterogeni nel plasma fetale favorendo la formazione di lesioni aterosclerotiche primordiali a livello delle arterie del feto a causa dell'aumentato stress ossidativo (31).

È recente uno studio sperimentale condotto su ratti che dimostra come il diabete materno e l'iperglicemia fetale diano origine a diminuita sintesi di NO (NOS3) e ad inibizione di Notch 1, gene implicato nello

sviluppo di numerose cellule e tessuti cardiaci, per cui si ha un alterato sviluppo del cuore e la formazione di cardiopatie congenite (32). L'iperglicemia fetale, associata al diabete materno, aumenta di 5 volte il rischio di MCV. Il diabete materno può influenzare l'espressione di geni critici di sviluppo cardiaco attraverso meccanismi epigenetici, suggerendo che i fattori ambientali possono agire in una popolazione geneticamente sensibilizzata (33,34). L'esposizione alla caffeina durante l'embriogenesi inibisce l'espressione di enzimi chiave della metilazione del DNA e porta ad alterazioni cardiache morfo-funzionali come la cardiomiopatia ipertrofica e la cardiomiopatia dilatativa (35). In gravidanza l'assunzione di caffeina deve essere <200 mg/die cioè due tazzine (il contenuto di caffeina/tazzina è ~85 mg).

Diversi studi hanno dimostrato che un maggior consumo di sale può provocare alterazioni epigenetiche come il deficit di LSD1, una demetilasi istonica che si associa a vasocostrizione vasale, alterato rilascio di NO e ipertensione arteriosa (36). Recentemente è stato anche dimostrato che l'eccessivo consumo di sale può promuovere l'autoimmunità indotta dalla demetilazione del DNA (37).

Il fumo in gravidanza e durante l'allattamento può provocare modificazioni epigenetiche con alterazioni organiche (riduzione dei nefroni), endocrine (obesità, diabete) e metaboliche (riduzione HDL colesterolo) (38). Bambini nati da madri fumatrici, all'età di 5 anni mostrano aumento dell'ispessimento medio-intimale carotideo e riduzione della flussimetria mediata (indici subclinici di aterosclerosi); danni questi che si possono avere anche con il fumo di terza mano (39). Come tutti i fattori di rischio cardiovascolare fin qui trattati anche l'esposizione a inquinanti ambientali - metalli pesanti, quali nichel,

cadmio e arsenico e radiazioni ionizzanti o raggi ultravioletti -, può dare origine a disfunzione endoteliale con alterazione della permeabilità, adesione e migrazione subendoteliale leucocitaria e successiva formazione di cellule schiumose, *primum movens* dell'evoluzione aterosclerotica. Gli inquinanti ambientali possono avere effetti obesogeni, dare origine a ipometilazione del DNA, aumentare la rigidità carotidea e alterare l'espressione dei mir 222 implicati nell'infiammazione vasale (40).

Conclusioni

Le MCV hanno origine in età pediatrica. Le modificazioni epigenetiche si possono avere già dall'età gestazionale. È necessario promuovere e diffondere corrette abitudini di vita ed alimentari che possono avere ripercussioni positive sull'epigenetica. La dieta mediterranea, prototipo di una

sana alimentazione, ha effetti positivi sul diabete tipo 2 e sulla sindrome metabolica, che è più frequente nei bambini che hanno scarsa aderenza alla dieta mediterranea e all'attività fisica. Lavori recenti hanno dimostrato che la dieta mediterranea può esercitare un benefico effetto sulla salute con la sua azione antiinfiammatoria mediata da meccanismi epigenetici (41). Ci sono forti prove che i cambiamenti epigenetici durante lo sviluppo fetale sono fattori chiave nella formazione della sindrome metabolica. Questi cambiamenti sono indotti dalla nutrizione materna, che influenza l'ambiente intra-uterino. L'epigenetica svolge un ruolo importante nella regolazione del rischio cardiovascolare in età pediatrica (42). I microRNA rappresentano utili *biomarkers* per identificare i bambini a rischio ed eventualmente sviluppare terapie innovative e interventi nutrizionali specifici per le MCV.

RIASSUNTO

Le malattie cardiovascolari (MCV) possono insorgere nelle prime fasi dello sviluppo e della crescita. Fattori genetici e ambientali possono interagire dando origine ad alterata plasticità dello sviluppo e a modificazioni epigenetiche con anormale espressione fenotipica di informazioni genetiche pur senza cambiamenti nella sequenza nucleotidica del DNA. Squilibri alimentari materni, inadeguati a soddisfare i bisogni nutrizionali del feto, possono portare a: ritardo della crescita intrauterina (IUGR), diminuzione dell'età gestazionale, basso peso alla nascita, eccessiva crescita post-natale, alterazioni metaboliche e conseguente comparsa di fattori di rischio cardiovascolare. L'IUGR, negli anni successivi, può essere correlato con la steatosi epatica non alcolica e la sindrome metabolica. L'esposizione fetale a colesterolo alto, diabete e obesità della madre è associata ad un aumento del rischio e della progressione dell'aterosclerosi. Il fumo materno durante la gravidanza e l'esposizione a vari inquinanti ambientali inducono alterazioni epigenetiche dell'espressione genica, importanti per l'insorgenza o la progressione delle MCV. Nei bambini con ipercolesterolemia e/o obesità, lo stress ossidativo attiva le piastrine e i monociti, che rilasciano sostanze pro-infiammatorie, pro-aterogene e pro-ossidanti, inducendo disfunzione endoteliale, diminuzione della dilatazione flusso-mediata e aumento dello spessore intimo-medio carotideo. La prevenzione primaria dell'aterosclerosi, ancorata ai classici fattori di rischio, deve essere attuata precocemente. È necessario identificare, attraverso screening, i bambini ad alto rischio, seppur apparentemente sani, trattarli preventivamente con alimentazione, attività fisica e stile di vita corretti, con eventuale aggiunta di nutraceutici e, infine, con farmaci se i profili di rischio non si sono normalizzati. Il problema chiave è il ripristino della funzione endoteliale nella fase ancora reversibile dell'aterosclerosi. L'epigenetica può fornire nuovi marcatori per una identificazione precoce dei bambini a rischio e quindi sviluppare terapie innovative e specifici interventi nutrizionali nei periodi critici.

Parole chiave: *malattie cardiache, epigenetica, ritardo di crescita intrauterino, stress ossidativo, età pediatrica.*

Questionario di auto-apprendimento

- | | |
|---|--|
| <p>1) La crescita fetale è un processo complesso che dipende:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) dal corredo genetico b) dall'ambiente intrauterino c) solo dall'apporto nutritivo d) a e b | <p>3) L'aterosclerosi è un processo cronico-degenerativo che:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) inizia in età adulta b) inizia in età fetale c) si manifesta in età pediatrica d) compare dopo la pubertà |
| <p>2) Il ritardo di crescita intrauterino aumenta il rischio di:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) insulino-resistenza b) obesità c) diabete e) tutti i precedenti | <p>4) Le modificazioni epigenetiche:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) alterano l'espressione di determinati geni b) alterano la sequenza nucleotidica c) provocano solo metilazione del DNA d) provocano l'ossidazione del DNA |

(Risposte corrette: 1) d; 2) e; 3) b; 4) a

Glossario

Fetal programming: è un processo per cui uno stimolo o un insulto durante la vita fetale può condizionare sfavorevolmente la crescita e la funzione di organi e apparati, correlandosi con l'insorgenza di patologie cronico-degenerative.

Nutrigenomica: è la scienza che studia le correlazioni tra alimenti e modifiche del DNA.

Epigenetica: fenomeno di alterata espressione fenotipica che si ha senza cambiamenti della sequenza nucleotidica; può interessare la metilazione del DNA, le alterazioni degli istoni e dei microRNA.

Epigenomica: è lo studio del set completo di modifiche epigenetiche nel materiale genetico di una cellula (l'epigenoma).

Metilazione DEL DNA: è un meccanismo epigenetico ben definito che "silenzia" i geni, ossia ne impedisce l'attività; è coinvolto nella regolazione di una grande varietà di processi biologici, tra cui l'espressione genica, la stabilità del genoma e l'imprinting dei genitori.

Istoni: proteine basiche che si aggregano formando ottameri intorno a cui si avvolge il DNA in doppia elica dando origine al nucleosoma. Ciascun istone può subire numerose alterazioni ad opera di specifici enzimi che provocano acetilazione, metilazione e fosforilazione. Tali modificazioni avvengono a livello delle code N-terminali alterando la formazione della cromatina.

MicroRNA: brevi sequenze endogene di RNA non codificante (lunghe da 19 a 25 nucleotidi a singolo filamento) che agiscono come regolatori dell'espressione genica prevalentemente a livello post trascrizionale. I microRNA svolgono un ruolo determinante nella fisiologia e fisiopatologia vascolare sin dalle prime fasi dello sviluppo embrionale e sono in grado di interferire con le varie fasi dell'aterogenesi.

Adiposity rebound: fisiologica inversione della curva dell'adiposità. Rappresenta l'età in cui, in età prescolare, il BMI inizia ad aumentare ed è predittivo dello sviluppo di obesità: se avviene prima dei 5 anni vi è elevato rischio che il bambino diventi obeso.

Bibliografia

1. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986; 1: 1077-1081.
2. Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995; 311: 171-174.
3. Barker DJP. Programming the baby. Mothers, babies and health in later life. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1998; 13-42.
4. Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 2004; 23 (Suppl. 6): 588s-595s.
5. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *British medical bulletin*. 2001; 60: 5-20.
6. Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin. Reprod. Med.* 2009; 2: 358-368.
7. Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, et al. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clinical Epigenetics*. 2015; 7: 120.
8. Capra L, Tezza G, Mazzei F and Boner AL. The origins of health and disease: the influence of materna diseases and lifestyle during gestation. *Italian Journal of Pediatrics*. 2013; 39: 7.
9. Metzinger L, de Franciscis S, Serra R. The Management of Cardiovascular Risk through Epigenetic Biomarkers. *BioMed Research International*. 2017; Article ID. 9158572.
10. Tao H, Yang JJ, Shi K. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic mechanism regulation of cardiac fibrosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19: 707-716.
11. Chen W, Zhang M, Zha G, et al. MicroRNA-33 in atherosclerosis etiology and pathophysiology. *Atherosclerosis*. 2013; 227: 201-208.
12. Liu X and Liu S. Role of microRNAs in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Biomedical Reports*. 2017; 6: 140-145.
13. Martino F, Loffredo L, Carnevale R, et al. Oxidative Stress Is Associated With Arterial Dysfunction and Enhanced Intima-Media Thickness in Children With Hypercholesterolemia: The Potential Role of Nicotinamide. Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase. *Pediatrics*. 2008; 122: e648-e655.
14. Martino F, Pignatelli P, Martino E, et al. Early increase of oxidative stress and soluble CD40L in Children with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49: 1974-1981.
15. Pignatelli P, Loffredo L, Martino F, et al. Myeloperoxidase overexpression in children with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2009; 205: 239-243.
16. Martino F, Carlomosti F, Avitabile D, et al. Circulating *miR-33a* and *miR-33b* are up-regulated in familial hypercholesterolaemia in paediatric age. *Clinical Science*. 2015; 129: 963-972.
17. D'Agostino M, Martino F, Sileno S, et al. Circulating *miR-200c* is up-regulated in paediatric patients with familial hypercholesterolaemia and correlates with *miR-33a/b* levels: implication of a ZEB1-dependent mechanism. *Clinical Science*. 2017; 131: 2397-2408.
18. Bunkar N, Pathak N, Lohiya NK, Mishra PK. Epigenetics: A key paradigm in reproductive health. *Clin Exp Reprod Med*. 2016; 43: 59-81.
19. Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, et al. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clinical Epigenetics*. 2015; 7: 120.
20. Lemas DJ, Brinton JT, Shapiro ALB, et al. Associations of maternal weight status prior and during pregnancy with neonatal cardiometabolic markers at birth: the Healthy Start study. *International Journal of Obesity*. 2015; 39: 1437-1442.
21. Jaddoe VW, de Jonge LL, Hofman A, et al. First trimester fetal growth restriction and cardiovascular risk factors in school age children: population based cohort study. *BMJ*. 2014; 348.
22. Tain YL, and Hsu CN. Interplay between Oxidative Stress and Nutrient Sensing. Signaling in the Developmental Origins of Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18: 841.
23. Méndez-Mancilla A, Lima-Rogel V, Toro-Ortíz C, et al. Differential expression profiles of circulating microRNAs in newborns associated to maternal pregestational overweight and obesity. *Pediatr Obes*. 2017 Oct. doi: 10.1111/ijpo.12247.
24. Soubry A, Murphy SK, Wang F, et al. Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *International Journal of Obesity*. 2015; 39: 650-657.
25. Wankhade UD, Zhong Y, Kang P, et al. Enhanced offspring predisposition to steatohepatitis with maternal high-fat diet is associated with epigenetic and microbiome alterations. *Plos One*. 2017; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175675>
26. Ferguson JF, Allayee H, Gerszten RE, et al. Nutrigenomics, the Microbiome, and Gene Environment Interactions: New Directions in Cardiovascular Disease. *Research, Prevention, and Treatment. Circ Cardiovasc Genet*. 2016; 9: 291-313.
27. Mulligan CM, Friedman JE. Maternal modifiers of the infant gut microbiota: metabolic Conse-

- quences. *Journal of Endocrinology*. 2017; 235: R1-R12.
28. Indrio F, Martini S, Francavilla R, et al. Epigenetic Matters: The Link between early Nutrition, Microbiome, and Long-term Health Development. *Frontiers in Pediatrics*. 2017; 5: 178.
 29. Martino F, Magenta A, Pannarale G, et al. Epigenetics and cardiovascular risk in childhood. *J Cardiovasc Med*. 2016; 17.
 30. Palinsk W, Napoli C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB J*. 2002; 16: 1348-1360.
 31. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of LDL and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest*. 1997; 100: 2680-2690.
 32. Basu M, Zhu J-Y, LaHaye S, et al. Epigenetic mechanisms underlying maternal diabetes associated risk of congenital heart disease. *JCI Insight*. 2017; 2: e95085.
 33. Weerd JH, Koshihara-Takeuchi K, Kwon C, Takeuchi JK. Epigenetic factors and cardiac development. *Cardiovascular Research*. 2011; 91: 203-211.
 34. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. See comment in PubMed Commons below *Nat Genet*. 2003; (Suppl. 33): 245-254.
 35. Rivkees SA, Wendler CC. Long-term consequences of disrupting adenosine signaling during embryonic development. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017; 30: 1-8.
 36. Pojoga LH, Williams JS, Yao TM, et al. Histone demethylase LSD1 deficiency during high-salt diet is associated with enhanced vascular contraction, altered NO- cGMP relaxation pathway, and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301: H1862-H1871.
 37. Wu H, Huang X, Qiu H, et al. High salt promotes autoimmunity by TET2-induced DNA demethylation and driving the differentiation of Tfh cells. *Sci Rep*. 2016; 6: 28065.
 38. Mattsson K, Jönsson I, Malmqvist E, et al. Maternal smoking during pregnancy and offspring type 1 diabetes mellitus risk: accounting for HLA haplotype. *Eur J Epidemiol*. 2015; 30: 231-238.
 39. Raghuvver G, White DA, Hayman LL, et al. Cardiovascular Consequences of Childhood Second Hand Tobacco Smoke Exposure. *Circulation*. 2016; 134: e336-e359.
 40. Baccarelli A, Ghosh S. Environmental Exposures, Epigenetics and Cardiovascular Disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2012; 15: 323-329.
 41. Martino F, Puddu PE, Lamacchia F, et al. Mediterranean diet and physical activity impact on metabolic Syndrome among children and adolescents from Southern Italy: Contribution from the Calabrian Sierras Community Study (CSCS). *International Journal of Cardiology*. 2016; 225: 284-288.
 42. Lorite Mingot D, Gesteiro E, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Epigenetic effects of the pregnancy Mediterranean diet adherence on the offspring metabolic syndrome markers. *J Physiol Biochem*. 2017; 73: 495-510.