

ARTICOLO ORIGINALE

Modificazioni epigenetiche e diabete gestazionale

Epigenetic changes and gestational diabetes

Sabrina Prudente¹, Alessandra Di Gamberadino^{1,2}

¹Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Unità di Ricerca Malattie Metaboliche e Cardiovascolari, Istituto CSS-Mendel, Roma. ²Università Sapienza, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Roma

Corresponding author: s.prudente@css-mendel.it

Abstract

Gestational diabetes mellitus (GDM), which is characterized by glucose intolerance first diagnosed during pregnancy, is one of the most common pregnancy complication. It is now affecting approximately 14% of pregnancies worldwide, and its prevalence continues to increase.

Although GDM usually resolves after delivery, it may have several long-lasting health consequences, such as increased risk for type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease, on the mother as well as on the offspring.

An increasing body of evidences supports the notion that experiencing an adverse intrauterine environment, especially when due to maternal hyperglycemia, can affect cellular and organ systems during the early life of the offspring and interact with postnatal environmental and lifestyle factors to define metabolic disease risk.

The concept of lasting consequences of early-life environmental exposure for later disease risk is widely known as “fetal programming”, but the involved mechanisms are still not completely known.

Compelling evidences point to the epigenetic processes as an important mechanism underpinning lasting effects on the offspring.

The epigenetic processes, which include DNA methylation, the establishment of chromatin states by histones modifications and non-coding RNAs regulation, are able to modulate gene expression without DNA nucleotide sequence changes. These processes, physiologically involved in cell differentiation and the maintenance of the differentiated state, also play an important role in the complex interplay between genes and the environment. This interaction may result in the activation or deactivation of genes through induced epigenetic changes, thus facilitating adaptation to different environmental cues.

This review provides an overview of the critical role of epigenetic changes in fetal metabolic programming linked to GDM and their long-lasting health consequences.

KEY WORDS pregnancy; gestational diabetes; insulin secretion; long-term consequences; epigenetics; type 2 diabetes; diabetes risk.



OPEN
ACCESS



PEER-
REVIEWED

Citation Prudente S., Di Gamberadino A. Modificazioni epigenetiche e diabete gestazionale. JAMD 26:14–26, 2023.

DOI 10.36171/jamd23.26.1.3

Editor Luca Monge, Associazione Medici Diabetologi, Italy

Received March, 2023

Accepted May, 2023

Published June, 2023

Copyright © 2023 Prudente S. This is an open access article edited by AMD, published by [Idelson Gnocchi](#), distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement All relevant data are within the paper and its supporting Information files.

Funding The Author received no specific funding for this work.

Competing interest The Author declares no competing interests.

Riassunto

Il diabete mellito gestazionale (GDM), che è caratterizzato da intolleranza al glucosio diagnosticata per la prima volta durante la gravidanza, è una delle complicanze più comuni della gravidanza. Attualmente il GDM colpisce circa il 14% delle gravidanze in tutto il mondo e la sua prevalenza continua ad aumentare.

Sebbene il GDM di solito si risolva dopo il parto, esso può avere diverse conseguenze a lungo termine sulla salute, come un aumento del rischio di diabete mellito di tipo 2 e malattie cardiovascolari, sia nella madre che nella prole.

Un numero crescente di evidenze supporta l'idea che l'esperienza di un ambiente intrauterino avverso, specialmente se dovuto all'iperglicemia materna, possa influenzare i sistemi cellulari e gli organi durante le prime fasi di vita della prole, e interagire con fattori ambientali e stile di vita postnatale per definire il rischio di future malattie metaboliche. Il concetto legato alle conseguenze durature dell'esposizione ambientale nelle prime fasi dello sviluppo rispetto al rischio futuro di malattia è ampiamente conosciuto come "programmazione fetale", ma i meccanismi coinvolti non sono ancora completamente noti.

Prove convincenti indicano i processi epigenetici quale importante meccanismo alla base degli effetti sul futuro stato di salute nella prole.

I processi epigenetici, che includono la metilazione del DNA, la determinazione degli stati della cromatina mediante la modificazione degli istoni e la regolazione degli RNA non codificanti, sono in grado di modulare l'espressione genica senza apportare cambiamenti nella sequenza nucleotidica del DNA. Questi processi, che sono fisiologicamente coinvolti nella differenziazione cellulare e nel mantenimento dello stato di differenziamento, svolgono anche un ruolo importante nella complessa interazione tra geni e ambiente. Questa interazione può indurre l'attivazione o la disattivazione dei geni attraverso cambiamenti epigenetici, facilitando l'adattamento a diversi segnali ambientali.

Questa rassegna fornisce una panoramica del ruolo critico dei cambiamenti epigenetici nella programmazione metabolica fetale legata al GDM e al loro effetto a lungo termine sulla salute.

PAROLE CHIAVE gravidanza; diabete gestazionale; secrezione insulinica; conseguenze a lungo termine; epigenetica; diabete di tipo 2; rischio di diabete.

Introduzione

Il diabete mellito, ed in particolar modo il diabete di tipo 2, ha raggiunto attualmente nel mondo proporzioni epidemiche, ma gli sforzi fin qui messi in campo per frenare questa epidemia hanno avuto un successo piuttosto limitato⁽¹⁾.

È interessante notare che non solo negli ultimi anni l'età di esordio della malattia è andata progressivamente diminuendo ma si osserva una percentuale crescente di giovani donne affette da diabete, ed un numero di gravidanze complicate dall'iperglicemia che continua a salire⁽²⁾.

Numerosi studi epidemiologici hanno da tempo evidenziato che il diabete mellito gestazionale (GDM) è un importante fattore di rischio per la salute metabolica della donna e del nascituro. Il GDM infatti, non solo aumenta enormemente il rischio di diabete di tipo 2 nella madre e nelle generazioni successive, creando così un circolo vizioso di "diabete che genera diabete" (Figura 1), ma espone la prole anche allo sviluppo futuro di diverse altre patologie metaboliche tra cui l'obesità⁽³⁾, la malattia cardiovascolare⁽⁴⁾ e la sindrome metabolica⁽⁵⁾.

Anche nei modelli animali di iperglicemia materna sono stati evidenziati nella progenie diversi effetti a lungo termine, tra cui aumento dell'adiposità, insulino-resistenza, disfunzione delle beta cellule, e importanti cambiamenti strutturali e funzionali in organi e tessuti coinvolti nel metabolismo glucidico e lipidico⁽⁶⁾.

Anche se i meccanismi precisi che legano gli effetti dell'iperglicemia in gravidanza allo stato futuro di salute della madre e della prole restano ancora da chiarire, si ipotizza che i processi epigenetici, che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica, in particolar modo durante la vita embrionale e fetale, possano essere i mediatori chiave di questa relazione.

In questa rassegna verranno approfondite le specifiche relazioni tra il GDM e le modificazioni epigenetiche, per comprendere in dettaglio, alla luce delle evidenze scientifiche attualmente presenti in letteratura, il ruolo dell'epigenetica sulla programmazione fetale (fetal programming) indotta dall'iperglicemia materna e sugli effetti avversi a lungo termine nella prole.

Diabete gestazionale e "fetal programming"

La gravidanza rappresenta uno stato dinamico in cui il corpo della donna si adatta al prodotto del concepimento in via di sviluppo attraverso impor-

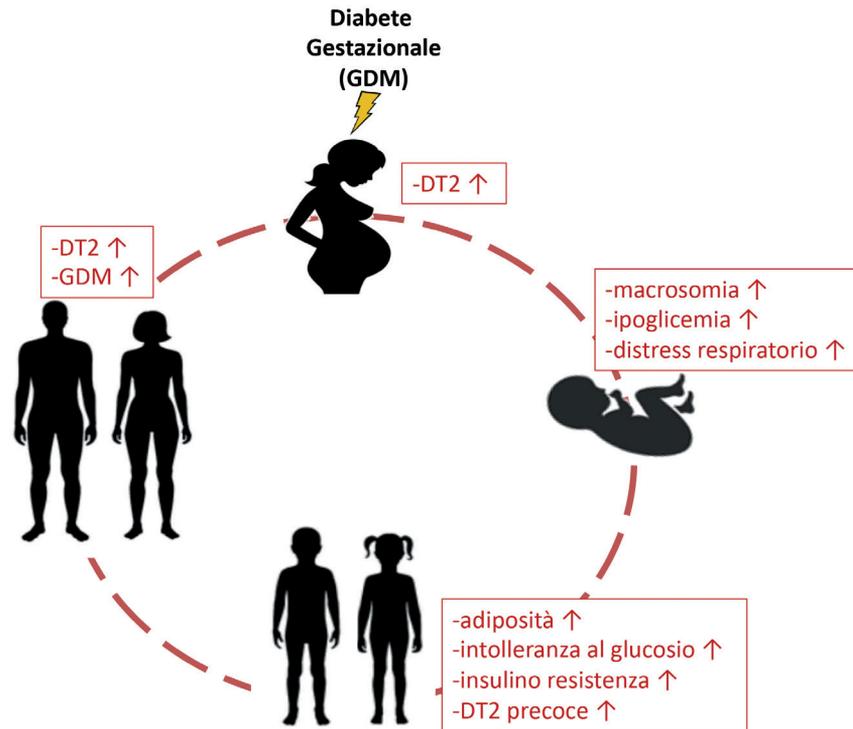


Figura 1 | Il “circolo vizioso” del diabete.

La donna che sperimenta il diabete gestazionale (GDM) in gravidanza presenta un rischio aumentato di sviluppare successivamente il diabete di tipo 2 (DT2). L'iperglicemia materna influenza negativamente la corretta programmazione metabolica nel feto. Questo, oltre che avere possibili conseguenze sulla vita perinatale del nascituro, può impattare negativamente sul suo stato di salute nella vita futura (sia nell'adolescenza che nella vita adulta) aumentando anche nei giovani adulti il rischio di DT2 e nelle giovani donne il rischio di GDM. Il GDM è quindi in grado di innescare un circolo vizioso di “diabete che genera diabete”.

tanti cambiamenti fisiologici e anatomici. Ciò si manifesta con un aumento del peso, lo sviluppo placentare e diversi e profondi cambiamenti nel sistema metabolico⁽⁷⁾. Uno dei più importanti tra questi è rappresentato dalla graduale riduzione della sensibilità all'insulina⁽⁸⁾. Conseguentemente, il glucosio e tutti i nutrienti vengono assorbiti ed immagazzinati nelle prime fasi della gravidanza per il fabbisogno energetico richiesto successivamente nella gestazione. Durante la seconda metà della gravidanza (20-24 settimane in poi) si osserva quindi un aumento dell'insulino-resistenza, mediata dagli ormoni placentari oltre che da fattori coinvolti nell'infiammazione cronica^(8, 9). Di conseguenza, le cellule beta pancreatiche vanno incontro a ipertrofia e iperfunzione per produrre più insulina e quindi compensare l'insulino-resistenza materna⁽⁸⁾.

L'incapacità di compensare l'aumento della domanda di insulina durante la gravidanza è alla base di uno dei meccanismi fisiopatologici più rilevanti del diabete gestazionale (GDM)⁽¹⁰⁾.

Il GDM rappresenta una delle complicanze più comuni della gravidanza, con una prevalenza che varia dal 2% al 25% a seconda dei criteri diagnostici utilizzati e della specifica popolazione studiata^(11,12). L'obesità, una storia familiare di diabete o precedenti esperienze di iperglicemia in gravidanza sono tra i principali fattori di rischio per lo sviluppo del GDM⁽¹⁰⁾.

Il GDM è associato ad un aumentato rischio di complicanze ostetriche per il nascituro (come ad es. parto pretermine, macrosomia e spalla distocica) e di disturbi neonatali (es. ipoglicemia, iperbilirubinemia e sindrome da distress respiratorio)⁽¹³⁾ ma anche ad effetti a lungo termine sulla prole (es. obesità, sviluppo puberale accelerato e diabete di tipo 2 ad esordio giovanile)^(14,15).

Anche se l'intolleranza materna al glucosio di solito si normalizza poco dopo la gravidanza, le madri con GDM presentano un rischio quasi 10 volte maggiore di sviluppare il diabete di tipo 2 rispetto alle donne con gravidanze non complicate da GDM⁽¹⁶⁾, così come un aumentato rischio di sviluppare future malattie cardiovascolari anche in assenza di diabete di tipo 2⁽¹⁷⁾.

È noto ormai da tempo che il benessere di un individuo nell'arco della vita è strettamente influenzato dalle interazioni tra il suo background genetico, l'ambiente, ed il suo stile di vita. Le attuali conoscenze scientifiche hanno però evidenziato che anche l'ambiente intrauterino, al quale un individuo è esposto durante la vita fetale, può avere un impatto a lungo termine sul suo stato di salute. Durante la vita intrauterina infatti lo sviluppo del feto è particolarmente vulnerabile a diversi fattori, tra cui le condizioni fisiche materne (presenza di obesità, iperglicemia, ipertensione etc.) ma anche l'ambiente esterno a cui la madre è esposta durante la gravidanza (es. abitudini alimentari, attività fisica, stress psicoemotivo etc.). Tutti questi fattori possono influire in modo permanente sulla condizione di salute del bambino dopo la nascita ma anche sul suo futuro stato di salute nella vita adulta.

Più di 20 anni fa, l'epidemiologo britannico David Barker, studiando la correlazione tra basso peso alla nascita ed aumentato rischio di malattia cardiovascolare nell'età adulta, introdusse per la prima volta il concetto di "fetal programming" (letteralmente programmazione fetale), definendolo come risposta adattativa del feto, messa in atto quando l'ambiente ottimale in cui questo cresce e si sviluppa viene perturbato da fattori avversi⁽¹⁸⁾. Il "fetal programming" rappresenta quindi un meccanismo di fondamentale importanza, in particolar modo durante il periodo critico di sviluppo degli organi essenziali, poiché permette al nuovo organismo di mantenere l'omeostasi in condizioni avverse.

Barker e colleghi evidenziarono che mediante il "programming" il feto è in grado in condizioni sfavorevoli di mettere in atto una risposta adattativa sviluppando un fenotipo definito "parsimonioso", capace cioè di assicurare la sopravvivenza risparmiando il cervello a scapito di altri organi importanti come il fegato, il pancreas, i reni e i muscoli. Questo programma adattativo, sebbene conferisca al feto un immediato vantaggio in utero, sarebbe però poi responsabile di una maggiore vulnerabilità a diverse malattie croniche nella vita adulta^(19,20).

L'iperglicemia in gravidanza, anche quando non associata all'obesità materna, sembra essere uno dei fattori più rilevanti nella determinazione del fetal programming. Negli ultimi anni, infatti, numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato che gli effetti dismetabolici del diabete in gravidanza sono in grado di innescare un "circolo" vizioso che riguarda sia la madre che le generazioni successive. Il GDM è

infatti responsabile, oltre che di complicanze sulla gravidanza e sul parto, del rischio marcatamente elevato di sviluppare nella vita adulta il diabete di tipo 2, o le malattie cardiometaboliche ad esso associate, osservato nella prole⁽²¹⁾.

In uno studio recente, è stato riportato che i figli di madri con GDM mostravano un aumento dell'adiposità, un inizio precoce della pubertà e tratti dismetabolici, già nell'età preadolescenziale (9-16 anni)⁽¹⁵⁾. Clausen e colleghi hanno evidenziato che la prole giovane adulta di madri con GDM ha un rischio fino a otto volte più elevato di sviluppare diabete di tipo 2 o prediabete, un rischio due volte più elevato di essere in sovrappeso e un rischio quattro volte più elevato di sviluppare la sindrome metabolica rispetto alla prole di donne non diabetiche^(22,23).

Cambiamenti metabolici e dello sviluppo nel tessuto muscolare e adiposo, inclusa l'ipertrofia degli adipociti, sono tra i possibili meccanismi in grado di spiegare l'aumento del rischio di malattia a lungo termine nella prole di madri con GDM⁽²⁴⁾. È stato inoltre evidenziato che l'esposizione fetale al diabete materno è associata a una ridotta produzione di insulina più avanti nella vita, potenzialmente mediata dalla ridotta massa delle beta cellule. Questo suggerisce un altro importante meccanismo possibilmente in grado di determinare un aumento del rischio di diabete⁽²⁵⁾. Un'ampia meta-analisi ha inoltre mostrato un rischio più elevato di malformazioni congenite, in particolare di anomalie cardiovascolari, nella prole di donne con GDM e con diabete di tipo 2 rispetto alla prole di donne non diabetiche⁽²⁶⁾.

È importante sottolineare che l'impatto economico sui sistemi sanitari imputabile al GDM è molto alto, e si stima che negli Stati Uniti il solo GDM costi più di 1,8 miliardi di dollari all'anno, senza considerare le sue conseguenze a lungo termine⁽²⁷⁾. Ad oggi però gli esatti meccanismi patogenetici che mediano la relazione tra esposizione in utero all'iperglicemia materna ed effetti avversi sulla prole sono complessi e non definitivamente chiariti, così come non sono stati ancora chiariti gli esatti termini di trasmissione del rischio attraverso le generazioni.

Fetal programming e modificazioni epigenetiche

Numerose evidenze scientifiche, ottenute negli ultimi anni, indicano che i processi epigenetici siano tra i meccanismi principalmente coinvolti nel fetal

programming e in grado di spiegarne i suoi effetti a lungo termine sullo stato di salute dell'individuo⁽²⁸⁾. Le modificazioni epigenetiche si riferiscono sostanzialmente a modificazioni ereditabili, che comportano cambiamenti nell'espressione genica senza però alterare la sequenza del DNA. Nel dettaglio, esse si realizzano o attraverso specifiche reazioni, grazie alle quali una serie di molecole vengono attaccate o staccate da specifiche regioni del DNA o della cromatina, rendendole così più o meno accessibili alla trascrizione genica, oppure mediante l'attività di regolazione da parte di RNA non codificanti⁽²⁹⁾.

I meccanismi epigenetici sono in grado di influenzare la regolazione dell'espressione genica con diverse modalità, ma tre sono quelle più note attraverso le quali essi agiscono: la metilazione del DNA, la modifica degli istoni e l'attività degli RNA non codificanti, in particolar modo dei miRNA⁽²⁹⁾.

Mentre il genoma (uguale in tutte le cellule) fornisce le istruzioni che consentono la determinazione ed il funzionamento di un organismo vivente, l'epigenoma (definito dallo specifico assetto di marcatori epigenetici presenti in ciascuna cellula) consente a queste istruzioni di essere lette differenzialmente nei diversi tipi cellulari e nel momento opportuno, determinando quali specifici geni devono essere trascritti e quali silenziati, modulandone quindi correttamente l'espressione durante tutto lo sviluppo e la vita adulta.

L'assetto epigenetico nelle cellule di un individuo viene stabilito in due momenti critici del suo sviluppo che si svolgono nella vita intrauterina: il pre-impianto dell'embrione e lo sviluppo delle cellule germinali primordiali nel feto⁽³⁰⁾. Le specifiche modificazioni epigenetiche stabilite in quei momenti vengono trasmesse in modo relativamente stabile nei processi di proliferazione cellulare.

I meccanismi epigenetici sono però processi dinamici in grado di rispondere plasticamente sia ai segnali intrinseci dell'organismo, al fine di poter espletare fedelmente il programma di sviluppo e differenziamento dettato dal DNA, ma anche a quelli estrinseci, sia di natura ambientale (es. esposizione a xenobiotici) che sociale (es. abitudini alimentari, stile di vita), al fine di consentire, per quanto possibile, il mantenimento dell'omeostasi in cellule, tessuti ed organi.

Modificazioni epigenetiche possono quindi verificarsi durante tutto l'arco della vita stessa.

A seconda del momento in cui si verificano però, se nella vita prenatale o in quella postnatale, esse

possono avere un impatto molto diverso sulla vita e sulla salute dell'organismo. Infatti, cambiamenti epigenetici indotti durante lo sviluppo embrionale sembrano avere un impatto molto maggiore sull'organismo in quanto le alterazioni che si verificano nelle cellule staminali embrionali singole possono essere trasmesse nelle divisioni mitotiche consecutive e interesseranno molte più cellule (e di conseguenza i tessuti e gli organi che da queste origineranno) rispetto alle alterazioni che si verificano in cellule staminali adulte e/o somatiche durante lo sviluppo postnatale⁽³¹⁾.

Evidenze scientifiche dimostrano che le modificazioni epigenetiche acquisite possono essere trasmesse alle generazioni successive^(32,33). La possibilità che le modificazioni epigenetiche possano essere trasmesse alla progenie apre un importante scenario sull'ereditarietà delle malattie complesse e sulla determinazione del rischio di sviluppare malattia nella vita adulta di figli e nipoti.

Poiché il fetal programming viene indotto da un ambiente uterino sfavorevole e la risposta ad un ambiente sfavorevole in utero induce modificazioni epigenetiche trasmissibili si è ipotizzato che proprio l'epigenetica giocasse un ruolo chiave nella mediazione tra esposizione ad un ambiente sfavorevole nella vita prenatale ed effetti a lungo termine sulla salute. L'instaurarsi nel feto e nelle sue cellule germinali di un assetto epigenetico diverso da quello fisiologico predeterminato potrebbe spiegare la maggiore suscettibilità alla malattia nella vita adulta.

Diabete gestazionale e modificazioni epigenetiche

Metilazione del DNA

La maggior parte degli studi umani volti a valutare la possibile mediazione dell'epigenetica nella correlazione fra l'esposizione al GDM in utero e gli effetti a lungo termine sulla salute della prole è stata effettuata valutando lo stato di metilazione del DNA nella placenta, nel cordone ombelicale della prole o nel sangue dei neonati⁽³⁴⁾. La metilazione del DNA è infatti il meccanismo epigenetico più ampiamente analizzato e studiato. Durante questo processo, un gruppo metilico viene aggiunto alla posizione 5 dei residui di citosina. Gli enzimi che catalizzano la metilazione del DNA sono le DNA metiltransferasi (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B). DNMT1 è principalmente responsabile del mantenimento dell'assetto della metilazione durante

la sintesi del DNA, mentre DNMT3A e DNMT3B sono invece necessari per la metilazione *de novo*⁽³⁵⁾.

Le citosine metilate si trovano principalmente nelle cosiddette isole CpG (citosina-fosfato-guanina) regioni in cui il dinucleotide CG è ripetuto numerose volte; esse sono importanti indicatori epigenetici della stabilità genomica e dell'espressione genica. Nella maggior parte dei casi, l'ipermetilazione di regioni del DNA situate in un promotore genico è collegata al silenziamento genico. Al contrario, un basso livello di metilazione è generalmente associato all'attivazione genica.

La metilazione rappresenta un elemento chiave della differenziazione cellulare e svolge un ruolo importante nella determinazione e nel mantenimento dello stato differenziato⁽³⁵⁾. L'assetto specifico della metilazione del DNA presente in ogni cellula (definito pattern di metilazione) viene fedelmente copiato dalla metiltransferasi DNMT1 durante la replicazione del DNA e trasmesso alle cellule figlie con la mitosi. Nei mammiferi, quasi tutti i pattern di metilazione vengono però cancellati, prima durante la gametogenesi e poi di nuovo all'inizio dell'embriogenesi, con processi di demetilazione e nuova rimetilazione che si verificano ogni volta⁽³⁶⁾. La demetilazione, che si verifica precocemente durante l'embriogenesi, avviene nel periodo pre-impianto in due fasi: inizialmente nello zigote, poi durante i primi cicli di replicazione embrionale negli stadi di morula e blastula. Un'ondata di nuova metilazione si verifica poi durante la fase di impianto dell'embrione, consentendo una repressione globale che permette l'espressione dei geni housekeeping in tutte le cellule. Successivamente, nella fase post-impianto, i pattern di metilazione sono invece ridefiniti specificamente per stadio e tessuto, ed una volta definiti in ogni singolo tipo cellulare perdurano stabilmente per un lungo periodo⁽³⁷⁾.

La metilazione però, essendo un processo dinamico, è suscettibile alle perturbazioni ambientali che possono agire sia modulando l'attività delle metiltransferasi e delle demetilasi sia attraverso la disponibilità dei gruppi metile (ad esempio attraverso la dieta). Questo meccanismo epigenetico spiegherebbe quindi, in parte, una delle modalità attraverso la quale i possibili cambiamenti indotti dall'ambiente (in questo caso rappresentati appunto dall'alterazione dei pattern di metilazione) possano essere trasmessi alle successive generazioni cellulari attraverso la mitosi o la meiosi e senza alterare il codice genetico.

Utilizzando l'approccio del gene candidato, sono stati identificati nei tessuti fetali di bambini nati da madri con GDM diversi geni differenzialmente metilati; questi includono loci correlati alla leptina (LEP), all'adiponectina (ADIPOQ), al gene imprintato MEST, e ai geni ABCA1, SLC2A1/GLUT1 e SLC2A3/GLUT3, geni coinvolti nel metabolismo energetico e glucidico⁽³⁸⁾. Modificazioni epigenetiche in questi loci in risposta alla compromissione dell'omeostasi del glucosio durante la gravidanza potrebbero quindi essere verosimilmente responsabili della suscettibilità ad un incremento di adiposità e di insulino-resistenza nella prole.

Due studi di associazione condotti sull'intero epigenoma (EWAS) hanno infatti riportato associazioni di marcatori di metilazione del DNA correlati al diabete materno con effetti sull'adiposità nell'infanzia^(39,40). Uno di questi studi, che includeva i dati ottenuti in due importanti studi prospettici: l'EPOCH (Exploring Perinatal Outcomes in Children) e il Colorado Healthy Start, ha identificato 6 marcatori di metilazione del DNA, correlati al GDM e associati a misure di adiposità nell'infanzia e alla distribuzione del grasso⁽³⁹⁾. I profili di metilazione valutati nel sangue periferico/cordonale della prole esposta e non esposta a GDM (n = 285, età media 10,5 anni) hanno rivelato che la metilazione del gene SH3PXD2A era associata a BMI, circonferenza vita, spessore delle pliche cutanee, tessuto adiposo sottocutaneo e livelli di leptina. Nel secondo studio, condotto invece su 388 bambini indiani Pima dell'Arizona (età media 13,0 anni)⁽⁴⁰⁾, i marcatori di metilazione del DNA alterati dall'esposizione intrauterina al diabete materno erano anch'essi associati al BMI e alla secrezione insulinica della prole ma erano diversi da quelli rilevati dallo studio EPOCH. La discrepanza nei siti di metilazione del DNA rilevati nei due studi potrebbe essere dovuta alle diverse popolazioni studiate, alle covariate utilizzate per l'aggiustamento statistico e ai diversi outcomes selezionati.

Una relazione causale tra iperglicemia materna e regolazione epigenetica del gene della leptina (che ha una rilevanza biologica nella programmazione a lungo termine di una eccessiva adiposità nella prole) è stata osservata nel sangue del cordone ombelicale della prole e identificata mediante un approccio di randomizzazione mendeliana⁽⁴¹⁾. Le modificazioni epigenetiche innescate dalla glicemia materna evidenziavano un'associazione tra livelli di metilazione del DNA più bassi nel sito CpG cg12083122 (nel gene della leptina) e livelli più elevati di leptina nel sangue

del cordone ombelicale della prole⁽⁴¹⁾. Livelli più elevati di metilazione del DNA dei geni chiave responsabili del metabolismo glicemico/lipidico (PPARGC1 α) sono invece risultati correlati con livelli più elevati di leptina nel sangue del cordone ombelicale di prole esposta a iperglicemia materna⁽⁴²⁾. La metilazione del DNA (aumento della metilazione di PYGO1 e CLN8) è stata invece riportata mediare gli effetti avversi dell'esposizione al GDM in utero sui tratti cardiometabolici della prole (aumento livelli VCAM-1)⁽⁴³⁾.

Dati interessanti hanno anche evidenziato un effetto dell'esposizione all'iperglicemia in utero sullo sviluppo neurologico. Una recente meta-analisi dei dati EWAS del consorzio "Pregnancy and Childhood Epigenetics" (comprendente 3.677 coppie madre-neonato provenienti da 7 differenti coorti) hanno evidenziato che il GDM era associato a ipometilazione del promotore di OR2L13, un gene associato al disturbo dello spettro autistico, nel sangue del cordone ombelicale⁽⁴⁴⁾. Lo studio è di particolare rilevanza poiché ha tenuto in conto numerosi potenziali fattori confondenti, tra cui l'eterogeneità delle cellule del sangue del cordone ombelicale, che è una delle possibili fonti di variabilità nella metilazione del DNA.

Gli studi fin qui riportati supportano l'ipotesi che l'iperglicemia materna sperimentata dal feto durante la vita intrauterina possa tramite modificazioni dei pattern di metilazione avere un impatto importante sulla deregolazione di specifici geni implicati nel metabolismo energetico, nella funzione beta cellulare e in altre specifiche funzioni legate al mantenimento dell'omeostasi glucidica che nel tempo possono concorrere alla determinazione futura di malattie metaboliche come il diabete di tipo 2, l'obesità e la malattia cardiovascolare, specificatamente legate ad alterazioni in queste pathways.

Tali studi forniscono inoltre preziose informazioni su specifici marcatori epigenetici che possono guidare la ricerca futura nell'identificazione di potenziali biomarcatori diagnostici e lo sviluppo di nuove strategie predittive e/o terapeutiche.

Deregolazione dei miRNA

I miRNA, sono piccoli RNA non codificanti, costituiti da circa 22 nucleotidi, che agiscono come regolatori negativi inibendo la traduzione dell'mRNA o portando alla sua degradazione⁽⁴⁵⁾. Nella maggior parte dei casi, i miRNA mediano il silenziamento genico post-trascrizionale legandosi in modo complemen-

tare a sequenze target presenti nelle regioni 3' o 5' non tradotte (3'-UTR o 5'-UTR) o nelle regioni open reading frame (ORF) degli RNA messaggeri^(45,46).

È stato evidenziato che i miRNA abbiano un importante ruolo nella regolazione dei processi metabolici e della funzione e della massa delle beta cellule⁽⁴⁷⁾. L'analisi dell'intero mirnoma ha evidenziato che oltre 600 miRNA sono espressi nella placenta umana e che essi hanno un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi in gravidanza⁽⁴⁸⁾. Esistono numerose evidenze a supporto del fatto che una loro deregolazione possa essere correlata al GDM ed ai suoi affetti avversi sul feto⁽⁴⁹⁾.

Diversi studi hanno evidenziato che i geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi e del glucosio sono bersagli dei miRNA placentari.

Zhao e colleghi⁽⁵⁰⁾ hanno studiato l'espressione di miR-518d nelle placentate di donne con GDM e parto cesareo, rispetto a donne con normale tolleranza al glucosio (NGT). Gli autori hanno riportato una sovraregolazione del miR-518d, che regola negativamente il fattore di trascrizione PPAR α , nelle donne con GDM. PPAR α è un recettore nucleare coinvolto nell'omeostasi glucidica e lipidica e nell'infiammazione, la cui deregolazione è implicata nella cardiomiopatia diabetica⁽⁵¹⁾.

Uno studio recente condotto su donne con GDM e donne con NGT ha riportato una down regolazione del miR-21 ed un aumento di PPAR α nelle placente derivate da donne con GDM rispetto al gruppo di controllo⁽⁵²⁾.

Un altro interessante studio ha evidenziato una down regolazione del miR-143 in donne con GDM trattate con insulina, rispetto a donne trattate con la dieta o alle donne con NGT; miR-143 targhetta l'enzima esochinasi-2 (HK-2)⁽⁵³⁾, che fosforila il glucosio per produrre glucosio-6-fosfato e rappresenta il primo passo nella via glicolitica.

Tutti questi studi hanno evidenziato che i miRNA placentari sono coinvolti nel metabolismo dei lipidi e del glucosio e la loro deregolazione può contribuire alla patogenesi del GDM e ad esiti avversi nella prole.

Li e collaboratori⁽⁵⁴⁾ hanno studiato i profili di espressione dei miRNA nelle placente di donne con GDM e di donne con NGT. L'analisi ha permesso di identificare l'espressione differenziale di 9 miRNA nel tessuto placentare delle donne con GDM. Tra questi, un miRNA era sovraregolato e otto erano downregolati. I geni bersaglio di questi miRNA sono coinvolti nella via di segnale del recettore del fattore di cre-

scita epidermico (EGFR) lungo l'asse PI3K/Akt e sono implicati nello sviluppo placentare e fetale. Poiché, tra le altre funzioni, l'attivazione della via PI3K/Akt migliora la proliferazione, la sopravvivenza e la crescita cellulare⁽⁵⁵⁾, gli autori dello studio hanno ipotizzato un modello nel quale un signaling potenziato dell'EGFR nei tessuti esposti a GDM incrementa la crescita fetale e placentare, contribuendo così alla macrosomia.

Risultati simili sono stati osservati in espianti di villi coriali ottenuti da donne con GDM e donne con placentate sane⁽⁵⁶⁾. Gli autori hanno osservato un diverso profilo di miRNA esosomiali nelle donne con GDM, dove 9 miRNA risultavano sovraregolati e 14 miRNA downregolati. Questi miRNA targhettano geni coinvolti nelle pathways associate a PI3K/Akt e a MAPK/ERK1/2, entrambe coinvolte nella proliferazione cellulare^(55,57). Gli autori hanno ipotizzato che gli esosomi placentari potrebbero svolgere un ruolo nella modulazione della sensibilità all'insulina in gravidanza.

In un altro studio, Ding e colleghi⁽⁵⁸⁾ hanno valutato i profili di miRNA in cellule HTR-8 derivate da espianti di villi coriali da placentate umane ottenute nel primo trimestre di gravidanza da donne con GDM e donne con NGT. Essi hanno evidenziato che il miR-138-5p aveva una espressione ridotta nelle cellule GDM HTR-8 rispetto alle cellule di controllo, con conseguente maggiore proliferazione e migrazione dei trofoblasti.

Più recentemente, un altro studio, di dimensioni campionarie più consistenti, ha esaminato i profili di espressione di miRNA nel tessuto placentare di donne con GDM e donne con NGT⁽⁵⁹⁾. I risultati ottenuti, che sono stati ulteriormente confermati mediante qRT-PCR, mostravano una sovraregolazione del miRNA-144 e una down regolazione del miRNA-125b nelle placentate di donne con GDM rispetto al gruppo di controllo. L'espressione di questi miRNA era simile a quella osservata negli esosomi circolanti nel plasma di donne con GDM. La sovraregolazione del miRNA-144 è risultata negativamente correlata al BMI e positivamente collegata alla tolleranza al glucosio valutata mediante OGTT.

È stato infine pubblicato uno studio in cui la deregolazione dei miRNA è stata correlata agli effetti a lungo termine nella prole adulta di donne con GDM. Gli individui esposti al diabete materno evidenziano un aumento dell'espressione di miR-15a e miR-15b nel muscolo scheletrico. È interessante notare che questi miRNA possono alterare l'espressione di

proteine importanti nelle vie di segnale dell'insulina e diminuire il livello dei recettori dell'insulina causando così una ridotta tolleranza al glucosio o anche il diabete nella prole di donne diabetiche⁽⁶⁰⁾. In conclusione, questi studi hanno evidenziato che i miRNA placentari non solo sono fondamentali per la corretta funzione placentare ma svolgono anche un importante ruolo negli adattamenti metabolici durante la gravidanza (ad es. resistenza all'insulina, funzione pancreatico e beta-cellulare). La loro deregolazione può quindi comportare complicanze fetali ed avere un effetto negativo sullo stato futuro di salute della prole di donne che hanno sperimentato il GDM.

Sebbene diversi miRNA siano stati rilevati nel primo trimestre di gravidanza, nella maggior parte degli studi esaminati l'osservazione era limitata alla fine del secondo trimestre di gestazione.

Nonostante le evidenze ottenute, a tutt'ora molti degli studi non hanno avuto una replicazione. Pertanto, sono necessari ulteriori studi, e su campioni di dimensioni maggiori, che possano convalidare definitivamente i miRNA con significato realmente eziopatogenetico per le complicanze del GDM e i suoi effetti a lungo termine sulla prole.

Effetti epigenetici inter- e trans-generazionali

Come detto precedentemente, la gravidanza rappresenta una finestra di vulnerabilità durante la quale gli effetti avversi dell'esposizione materna a determinati fattori legati all'ambiente o allo stile di vita possono ripercuotersi sulla salute della prole. È stato inoltre osservato che gli effetti avversi sperimentati nella vita intrauterina possono verosimilmente avere conseguenze non solo sulla salute della prole ma anche su quella dei nipoti e dei pronipoti. Questi effetti sono definiti di tipo inter-generazionale se le generazioni coinvolte hanno sperimentato direttamente l'esposizione e di tipo trans-generazionale quando le generazioni subiscono le conseguenze di una determinata esposizione senza però averla sperimentata direttamente.

Gli effetti inter- e trans-generazionali sono spiegabili dalle modificazioni epigenetiche, che come descritto precedentemente una volta prodottesi sono ereditabili attraverso la meiosi.

Durante la gestazione infatti, gli embrioni (definiti generazione F1, rispetto alla madre definita F0) ini-

ziano a sviluppare le cellule germinali (denominate generazione F2) che daranno origine alla loro prole (cioè i futuri nipoti della madre F0). Le modificazioni epigenetiche che si producono nell'embrione e sono trasmesse alle sue cellule germinali configurano una eredità di tipo inter-generazionale (Figura 2). Se gli effetti delle alterazioni epigenetiche determinate in F1 e trasmesse ad F2 persistono anche nella generazione F3 (che originerà in futuro da F2) che non è stata però esposta direttamente al fattore di esposizione originale sperimentato da F0, F1 ed F2, questo configura una eredità di tipo trans-generazionale (Figura 2). Numerosi studi nell'uomo supportano l'esistenza di eredità inter- e trans-generazionale a seguito del fetal programming innescato da diversi fattori tra cui anche il GDM. Diversi studi condotti in modelli animali hanno fornito la prova relativamente all'esistenza dell'eredità inter-generazionale nel contesto

di iperglicemia materna ⁽⁶¹⁻⁶³⁾. Prove sperimentali a supporto di una eredità di tipo trans-generazionale, invece, sono finora ancora molto poche e limitate a specifiche condizioni e ottenute esclusivamente in modelli animali ^(64,65).

Strategie di prevenzione e/o trattamento delle modificazioni epigenetiche e dei loro effetti a lungo termine

La ricerca per esplorare se i cambiamenti epigenetici indotti possono essere invertiti o l'assetto epigenetico presente inizialmente in un individuo possa essere riprogrammato per favorire un migliore risultato metabolico e quindi fornire un'opportunità

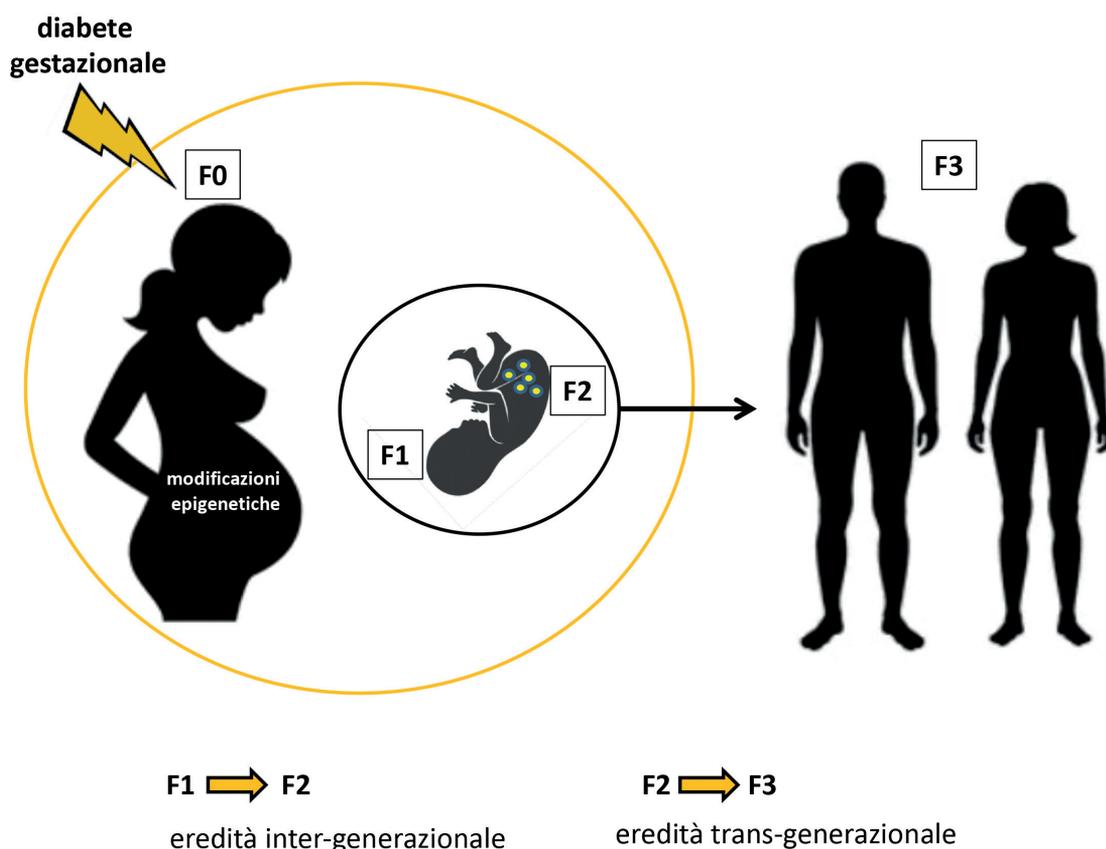


Figura 2 | Eredità inter- e trans-generazionale.

Un evento avverso (di tipo ambientale e/o sociale) sperimentato dalla madre (F0) durante la gravidanza (come ad. esempio l'iperglicemia) può innescare modificazioni di tipo epigenetico nel feto (F1). Queste possono essere trasmesse alle sue cellule germinali (F2), configurando una eredità di tipo inter-generazionale, e potenzialmente alla generazione dei futuri individui che origineranno dalle cellule germinali fetali (F3). Questa generazione, pur non avendo sperimentato direttamente l'evento avverso, ne erediterà comunque gli effetti (eredità di tipo trans-generazionale).

per specifici interventi terapeutici, ha guadagnato un'attenzione diffusa nel corso degli ultimi anni.

Studi *in vivo* su ratti con IUGR hanno dimostrato che il trattamento ormonale determina un'inversione precoce della deacetilazione di Pdx1 (che codifica per un fattore di trascrizione necessario per la maturazione e la funzione beta-cellulare) che di conseguenza preserva la sua espressione genica e contribuisce alla prevenzione dell'insorgenza del diabete⁽⁶⁶⁾. Coerentemente, il trattamento *in vitro* con incretina della linea cellulare di insulinoma di ratto INS-1 o di isole pancreatiche murine attiva il rimodellamento della cromatina cellulare, che facilita l'interazione tra specifici enzimi modificanti la cromatina e fattori di trascrizione⁽⁶⁷⁾. L'espressione del gene Bcl2 incretino-correlata a CREB è risultata ridotta dalla somministrazione dell'inibitore dell'istone acetiltransferasi⁽⁶⁷⁾.

Oltre agli studi epigenetici sulla modificazione della cromatina, alcuni studi riportano anche che i cambiamenti di metilazione del DNA indotti da un ambiente sfavorevole possono essere modificati da semplici interventi fisiologici come l'esercizio fisico o l'integrazione di micronutrienti. Ad esempio, un intervento di esercizio fisico di 6 mesi ha indotto alterazioni nel profilo di metilazione del DNA dell'intero genoma e nell'espressione genica nel tessuto adiposo di pazienti obesi e con DT2⁽⁶⁸⁾.

Allo stesso modo è stato dimostrato che i ratti che consumavano una dieta a basso contenuto proteico avevano una maggiore metilazione del DNA e una ridotta espressione genica dei geni del recettore dei glucocorticoidi e del PPAR γ ⁽⁶⁹⁾. Questi cambiamenti non sono invece stati osservati quando la dieta a basso contenuto proteico veniva integrata con acido folico⁽⁶⁹⁾.

Oltre a questi studi, eleganti studi di intervento farmacologico suggeriscono che l'assetto epigenetico esistente potrebbe essere modificato per favorire una migliore salute metabolica.

Ad esempio, l'aumento dell'espressione genica di Ins1/2 e Glut2 nelle isole pancreatiche coltivate ottenute da topi che erano stati trattati per 6 settimane con pioglitazone orale (un agonista del PPAR γ) è risultato associato all'aumento dell'acetilazione dell'istone H3 e all'aumento del dimetil H3K4 in prossimità del promotore dell'insulina⁽⁷⁰⁾. Queste modificazioni epigenetiche dell'espressione genica sono state associate a un migliore controllo glicemico e a una maggiore secrezione di insulina glucosio-stimolata nelle isole pancreatiche⁽⁷⁰⁾.

Le evidenze ottenute nei diversi modelli sperimentali suggeriscono che le modificazioni a carico dell'epigenoma non sono necessariamente permanenti e possono in qualche modo essere invertite.

I dati ottenuti evidenziano che specifici interventi potrebbero contribuire a migliorare l'effetto negativo sulla salute delle modificazioni epigenetiche indotte da stress ambientali o dallo stile di vita e che vi è impellente necessità di implementare questo ambito estendendolo anche all'uomo.

Conclusioni

I processi epigenetici, per la loro peculiarità di determinare in maniera dinamica modificazioni nell'attività trascrizionale dei geni senza alterare la sequenza del DNA e di essere stabilmente trasmissibili, hanno parzialmente chiarito le modalità attraverso le quali l'ambiente è in grado di determinare precocemente effetti fenotipici che si esplicheranno più avanti nella vita di un individuo influenzandone il suo stato di salute.

Nel contesto delle evidenze scientifiche fin qui ottenute indagando il GDM e che hanno supportato il ruolo delle modificazioni epigenetiche tra i fattori potenzialmente in grado di condizionare le traiettorie future di salute o malattia nella prole esposta in utero, ci sono alcuni aspetti di particolare rilevanza che meritano di essere attenzionati per una corretta valutazione complessiva dei risultati discussi.

Innanzitutto, la maggior parte delle differenze epigenetiche riportate dai diversi studi effettuati, in particolare quelli relativi ai cambiamenti dei livelli di metilazione del DNA, sembrano essere abbastanza modeste e potrebbero semplicemente riflettere l'eterogeneità cellulare.

In secondo luogo, pochissimi studi hanno correlato le modificazioni epigenetiche riscontrate a cambiamenti nell'espressione genica, e laddove questi ultimi sono stati riportati vi è solo una indicazione di associazione. Rimane quindi in gran parte indeterminata la relazione di causalità.

La maggior parte degli studi fin qui effettuati per studiare le modificazioni epigenetiche ha utilizzato i tessuti più facilmente accessibili (come il sangue cordonale, la placenta o il sangue intero) per estrapolare gli effetti epigenetici di un ambiente intrauterino avverso sulla programmazione metabolica di tessuti bersaglio. Poiché i cambiamenti epigenetici sono altamente specifici per tipo cellulare e tissutale, l'estrapolazione ottenuta indagando tessuti di-

versi da quelli bersaglio potrebbe essere errata perché la modificazione osservata in un tipo di cellula o tessuto potrebbe non riflettere un cambiamento simile altrove.

In ultimo, la maggioranza degli studi è stata condotta su campioni di piccole dimensioni, con un potere statistico limitato e la maggioranza di questi non ha poi avuto una formale replicazione.

Vi è quindi la necessità di studi più ampi e meglio disegnati, possibilmente di tipo prospettico, per poter realmente ottenere dati incontrovertibili.

Una migliore comprensione dei meccanismi epigenetici coinvolti nella risposta in utero all'iperglicemia materna e ai suoi possibili effetti a lungo termine, così come l'identificazione di specifici marcatori epigenetici di rischio, potrà consentire un rilevamento precoce e la messa in atto di interventi mirati per ridurre i possibili effetti del GDM sulla madre e sulla prole ma soprattutto il passaggio inter- e/o trans-generazionale del diabete e delle condizioni dismetaboliche ad esso associate e interrompere così quel circolo vizioso attualmente in atto.

Le evidenze di una possibile reversibilità delle modificazioni epigenetiche attraverso il ripristino di condizioni metaboliche favorevoli (mediante l'adozione di uno stile di vita sano e/o mediante trattamento farmacologico), sebbene ancora preliminari, sono molto incoraggianti e lasciano intravedere ottime prospettive per potenziali interventi terapeutici pre e postnatali al fine di prevenire/modificare l'insorgenza delle alterazioni metaboliche legate al GDM.

Bibliografia

1. Federation ID. 10th edn. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 2021.
2. Ma RC, Tutino GE, Lillycrop KA, Hanson MA, Tam WH. Maternal diabetes, gestational diabetes and the role of epigenetics in their long term effects on offspring. *Prog Biophys Mol Biol* 118:55-68, 2015.
3. Lawlor DA, Fraser A, Lindsay RS, Ness A, Dabelea D, Catalano P, et al. Association of existing diabetes, gestational diabetes and glycosuria in pregnancy with macrosomia and offspring body mass index, waist and fat mass in later childhood: findings from a prospective pregnancy cohort. *Diabetologia* 53:89-97, 2010.
4. Yu Y, Arah OA, Liew Z, Cnattingius S, Olsen J, Sorensen HT, et al. Maternal diabetes during pregnancy and early onset of cardiovascular disease in offspring: population based cohort study with 40 years of follow-up. *BMJ* 367:l6398, 2019.
5. Moore TR. Fetal exposure to gestational diabetes contributes to subsequent adult metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 202:643-49, 2010.
6. Bansal A, Simmons RA. Epigenetics and developmental origins of diabetes: correlation or causation? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 315:E15-E28, 2018.
7. Hadden DR, McLaughlin C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med* 14:66-71, 2009.
8. Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr* 54 Suppl 1:S47-51, 2000.
9. Parretti S, Caroli A, Torlone E. Nutrition and Metabolic Adaptations in Physiological and Complicated Pregnancy: Focus on Obesity and Gestational Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 11:611929, 2020.
10. Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R. What is gestational diabetes? *Diabetes Care* 30 Suppl 2:S105-11, 2007.
11. Sacks DA, Hadden DR, Maresh M, Deerochanawong C, Dyer AR, Metzger BE, et al. Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel-recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Diabetes Care* 35:526-28, 2012.
12. DeSisto CL, Kim SY, Sharma AJ. Prevalence estimates of gestational diabetes mellitus in the United States, Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (PRAMS) *Prev Chronic Dis.* 2014;11:E104, 2007-2010.
13. Ornoy A, Becker M, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Diabetes during Pregnancy: A Maternal Disease Complicating the Course of Pregnancy with Long-Term Deleterious Effects on the Offspring. A Clinical Review. *Int J Mol Sci* 22(6), 2021.
14. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115:e290-6, 2005.
15. Grunnet LG, Hansen S, Hjort L, Madsen CM, Kampmann FB, Thuesen ACB, et al. Adiposity, Dysmetabolic Traits, and Earlier Onset of Female Puberty in Adolescent Offspring of Women With Gestational Diabetes Mellitus: A Clinical Study Within the Danish National Birth Cohort. *Diabetes Care* 40:1746-55, 2017.
16. Vounzoulaki E, Khunti K, Abner SC, Tan BK, Davies MJ, Gillies CL. Progression to type 2 diabetes in women with a known history of gestational diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 369:m1361, 2020.
17. Kramer CK, Campbell S, Retnakaran R. Gestational diabetes and the risk of cardiovascular disease in women: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 62:905-14, 2019.
18. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 95:115-28, 1998.
19. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 311:171-4, 1995.
20. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992. *Int J Epidemiol* 42:1215-22, 2013.
21. Alejandro EU, Mamerto TP, Chung G, Villavieja A, Gaus NL, Morgan E, et al. Gestational Diabetes Mellitus: A Harbinger of the Vicious Cycle of Diabetes. *Int J Mol Sci* 21(14), 2020.
22. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, et al. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes

- mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 31(2):340-46, 2008.
23. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, et al. Overweight and the metabolic syndrome in adult offspring of women with diet-treated gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2464-70, 2009.
 24. Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Early life nutrition and metabolic programming. *Ann N Y Acad Sci* 1212:78-96, 2010.
 25. Sobngwi E, Boudou P, Mauvais-Jarvis F, Leblanc H, Velho G, Vexiau P, et al. Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. *Lancet* 361:1861-65, 2003.
 26. Zhao E, Zhang Y, Zeng X, Liu B. Association between maternal diabetes mellitus and the risk of congenital malformations: A meta-analysis of cohort studies. *Drug Discov Ther* 9:274-81, 2015.
 27. Lenoir-Wijnkoop I, van der Beek EM, Garssen J, Nuijten MJ, Uauy RD. Health economic modeling to assess short-term costs of maternal overweight, gestational diabetes, and related macro-somia - a pilot evaluation. *Front Pharmacol* 6:103, 2015.
 28. Godfrey KM, Costello PM, Lillycrop KA. The developmental environment, epigenetic biomarkers and long-term health. *J Dev Orig Health Dis* 6:399-406, 2015.
 29. Aguilera O, Fernandez AF, Munoz A, Fraga MF. Epigenetics and environment: a complex relationship. *J Appl Physiol* (1985) 109:243-51, 2010.
 30. Weaver JR, Susiarjo M, Bartolomei MS. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mamm Genome* 20:532-43, 2009.
 31. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293:1089-93, 2009.
 32. Lim AL, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting effects in a compromised in utero environment: implications for a healthy pregnancy. *Semin Cell Dev Biol* 21:201-8, 2010.
 33. Campbell IC, Mill J, Uher R, Schmidt U. Eating disorders, gene-environment interactions and epigenetics. *Neurosci Biobehav Rev* 35:784-93, 2011.
 34. Elliott HR, Sharp GC, Relton CL, Lawlor DA. Epigenetics and gestational diabetes: a review of epigenetic epidemiology studies and their use to explore epigenetic mediation and improve prediction. *Diabetologia* 62:2171-78, 2019.
 35. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer* 2:607-17, 2011.
 36. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet* 28:33-42, 2012.
 37. Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem* 81:97-117, 2012.
 38. Hjort L, Novakovic B, Grunnet LG, Maple-Brown L, Damm P, Desoye G, et al. Diabetes in pregnancy and epigenetic mechanisms-how the first 9 months from conception might affect the child's epigenome and later risk of disease. *Lancet Diabetes Endocrinol* 7:796-806, 2019.
 39. Yang IV, Zhang W, Davidson EJ, Fingerlin TE, Kechris K, Dabelea D. Epigenetic marks of in utero exposure to gestational diabetes and childhood adiposity outcomes: the EPOCH study. *Diabet Med* 35:612-20, 2018.
 40. Chen P, Piaggi P, Traurig M, Bogardus C, Knowler WC, Baier LJ, et al. Differential methylation of genes in individuals exposed to maternal diabetes in utero. *Diabetologia* 60:645-55, 2017.
 41. Allard C, Desgagne V, Patenaude J, Lacroix M, Guillemette L, Battista MC, et al. Mendelian randomization supports causality between maternal hyperglycemia and epigenetic regulation of leptin gene in newborns. *Epigenetics* 10:342-51, 2015.
 42. Cote S, Gagne-Ouellet V, Guay SP, Allard C, Houde AA, Perron P, et al. PPARGC1alpha gene DNA methylation variations in human placenta mediate the link between maternal hyperglycemia and leptin levels in newborns. *Clin Epigenetics* 8:72, 2016.
 43. West NA, Kechris K, Dabelea D. Exposure to Maternal Diabetes in Utero and DNA Methylation Patterns in the Offspring. *Immunometabolism* 1:1-9, 2013.
 44. Howe CG, Cox B, Fore R, Jungius J, Kvist T, Lent S, et al. Maternal Gestational Diabetes Mellitus and Newborn DNA Methylation: Findings From the Pregnancy and Childhood Epigenetics Consortium. *Diabetes Care* 43:98-105, 2020.
 45. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16:421-33, 2015.
 46. Besnier M, Shantikumar S, Anwar M, Dixit P, Chamorro-Jorganes A, Sweaad W, et al. miR-15a/-16 Inhibit Angiogenesis by Targeting the Tie2 Coding Sequence: Therapeutic Potential of a miR-15a/16 Decoy System in Limb Ischemia. *Mol Ther Nucleic Acids* 17:49-62, 2019.
 47. Guay C, Regazzi R. New emerging tasks for microRNAs in the control of beta-cell activities. *Biochim Biophys Acta* 1861(12 Pt B):2121-29, 2016.
 48. Cai M, Kolluru GK, Ahmed A. Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications. *J Pregnancy* 2017:6972732, 2017.
 49. Filardi T, Catanzaro G, Mardente S, Zicari A, Santangelo C, Lenzi A, et al. Non-Coding RNA: Role in Gestational Diabetes Pathophysiology and Complications. *Int J Mol Sci* 21(11), 2020.
 50. Zhao C, Zhang T, Shi Z, Ding H, Ling X. MicroRNA-518d regulates PPARalpha protein expression in the placentas of females with gestational diabetes mellitus. *Mol Med Rep* 9:2085-90, 2014.
 51. Wang L, Cai Y, Jian L, Cheung CW, Zhang L, Xia Z. Impact of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha on diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol* 20:2, 2021.
 52. Guan CY, Tian S, Cao JL, Wang XQ, Ma X, Xia HF. Down-Regulated miR-21 in Gestational Diabetes Mellitus Placenta Induces PPAR-alpha to Inhibit Cell Proliferation and Infiltration. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13:3009-34, 2020.
 53. Muralimanoharan S, Maloyan A, Myatt L. Mitochondrial function and glucose metabolism in the placenta with gestational diabetes mellitus: role of miR-143. *Clin Sci (Lond)* 130:931-41, 2016.
 54. Li J, Song L, Zhou L, Wu J, Sheng C, Chen H, et al. A MicroRNA Signature in Gestational Diabetes Mellitus Associated with Risk of Macrosomia. *Cell Physiol Biochem* 37:243-52, 2015.
 55. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 22:355-8, 1997.
 56. Nair S, Jayabalan N, Guanzon D, Palma C, Scholz-Romero K, Elfeky O, et al. Human placental exosomes in gestational diabetes mellitus carry a specific set of miRNAs associated with skeletal muscle insulin sensitivity. *Clin Sci (Lond)* 132:2451-67, 2018.
 57. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26:3227-39, 2007.

58. Ding R, Guo F, Zhang Y, Liu XM, Xiang YQ, Zhang C, et al. Integrated Transcriptome Sequencing Analysis Reveals Role of miR-138-5p/ TBL1X in Placenta from Gestational Diabetes Mellitus. *Cell Physiol Biochem* 51:630-46, 2018.
59. Zhang L, Zhang T, Sun D, Cheng G, Ren H, Hong H, et al. Diagnostic value of dysregulated microribonucleic acids in the placenta and circulating exosomes in gestational diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 12:1490-500, 2021.
60. Houshmand-Oeregaard A, Schrolkamp M, Kelstrup L, Hansen NS, Hjort L, Thuesen ACB, et al. Increased expression of microRNA-15a and microRNA-15b in skeletal muscle from adult offspring of women with diabetes in pregnancy. *Hum Mol Genet* 27:1763-71, 2018.
61. Chavey A, Ah Kioon MD, Bailbe D, Movassat J, Portha B. Maternal diabetes, programming of beta-cell disorders and intergenerational risk of type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 40:323-30, 2014.
62. Jiang Y, Yu YC, Ding GL, Gao Q, Chen F, Luo Q. Intrauterine hyperglycemia induces intergenerational Dlk1-Gtl2 methylation changes in mouse placenta. *Oncotarget* 9:22398-405, 2018.
63. Ren J, Cheng Y, Ming ZH, Dong XY, Zhou YZ, Ding GL, et al. Intrauterine hyperglycemia exposure results in intergenerational inheritance via DNA methylation reprogramming on F1 PGCs. *Epigenetics Chromatin* 11:20, 2018.
64. Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 38:894-903, 2006.
65. Ding GL, Wang FF, Shu J, Tian S, Jiang Y, Zhang D, et al. Transgenerational glucose intolerance with Igf2/H19 epigenetic alterations in mouse islet induced by intrauterine hyperglycemia. *Diabetes* 61:1133-42, 2012.
66. Pinney SE, Jaeckle Santos LJ, Han Y, Stoffers DA, Simmons RA. Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetologia* 54:2606-14, 2011.
67. Kim SJ, Nian C, McIntosh CH. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1 modulate beta-cell chromatin structure. *J Biol Chem* 284:12896-904, 2009.
68. Ronn T, Volkov P, Davegardh C, Dayeh T, Hall E, Olsson AH, et al. A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet* 9:e1003572, 2013.
69. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr* 135:1382-6, 2005.
70. Evans-Molina C, Robbins RD, Kono T, Tersey SA, Vestermark GL, Nunemaker CS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation restores islet function in diabetic mice through reduction of endoplasmic reticulum stress and maintenance of euchromatin structure. *Mol Cell Biol* 29:2053-67, 2009.