

ALIMENTAZIONE E MALFORMAZIONI CONGENITE: PROSPETTIVE PER UN APPROFONDIMENTO

Alberto Mantovani, Francesca Baldi, Chiara Frazzoli, Sabrina Tait

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Al momento, l'acido folico è l'unico componente della dieta su cui si incentra una strategia di prevenzione primaria delle malformazioni. L'effetto positivo della supplementazione periconcezionale con acido folico sull'incidenza di difetti del tubo neurale (riduzione sino al 50-70%) e in minore misura (sino al 20%) di altre malformazioni (es. cardiache) è un'evidenza scientifica consolidata. Per raggiungere pienamente tale effetto, però, è necessario anche promuovere una educazione alimentare, a partire dall'età scolare, che porti a una dieta variata, ricca di frutta e verdura e che assicuri un corretto apporto di folati, le forme naturali della vitamina presenti negli alimenti (1). Certamente, l'insufficiente apporto di folati non è l'unico fattore di rischio per i difetti del tubo neurale, neppure per l'importante frazione prevenibile con la supplementazione periconcezionale: tuttavia, la supplementazione -coadiuvata dalla dieta- è l'intervento "ambientale" in grado di interrompere la catena di eventi che porta all'instaurarsi dell'alterazione embrionale irreversibile nei soggetti vulnerabili.

La massima parte delle malformazioni hanno una patogenesi multifattoriale causata da interazioni geni-ambiente. La componente "ambientale" si identifica con fattori di rischio potenzialmente prevenibili o comunque modulabili: tuttavia "l'ambiente", inteso come contesto di vita, può essere almeno altrettanto complesso da affrontare quanto la componente genetica. Nella moderna concezione di ambiente, il cibo è parte determinante, come bisogno primario (mangiamo tutti i giorni), aspetto profondamente modulato dalle caratteristiche individuali e sociali, nonché riflesso, a sua volta, del contesto di vita degli organismi (animali e vegetali) produttori di alimenti. I differenti alimenti apportano, in modo specifico, un insieme di sostanze che vanno valutate in modo integrato e bilanciato: macro- (proteine, lipidi, glucidi) e micronutrienti (vitamine, oligoelementi), ma anche sostanze bioattive e contaminanti (2). Pertanto, il ruolo delle diverse componenti alimentari nella prevenzione delle malformazioni congenite può, e dovrà, andare ben oltre la supplementazione con acido folico.

L'apporto di nutrienti può essere un fattore di rischio quando è insufficiente di per sé (carenza primaria) o quando altre componenti ne ostacolano l'assorbimento o l'utilizzazione (carenza secondaria): nel caso della gravidanza, è possibile una situazione in cui l'apporto di un nutriente è sufficiente per l'organismo materno, ma non per la protezione dello sviluppo embrionale, come nel noto esempio dei folati (1). Infine, è necessario considerare anche il rischio di un'assunzione eccessiva, almeno per alcuni nutrienti (es. selenio, iodio, vitamina A e lo stesso acido folico): per queste sostanze occorre minimizzare il rischio tanto di carenza quanto di eccesso (2).

Questo capitolo vuole sviluppare spunti di riflessione, citando alcuni esempi riguardanti le vitamine, gli elementi in traccia essenziali e le alterazioni fisiologiche associate alla sindrome metabolica, quale principale disturbo della salute associato ad un'alimentazione squilibrata nei Paesi industrializzati.

Vitamine

Metabolismo dei folati: il ruolo di altre vitamine

A fronte delle azioni per promuovere la supplementazione con acido folico e un'alimentazione ricca in folati, è necessario, anche in Italia, la messa a punto di un sistema di monitoraggio dei biomarcatori dello stato di nutrizione per i folati nelle donne in età fertile: questo sia per valutare l'efficacia degli interventi, sia per poter programmare interventi mirati su gruppi particolarmente vulnerabili. Tuttavia, i biomarcatori specifici per lo status dei folati (folatemia plasmatica ed eritrocitaria) vanno considerati congiuntamente con altri fattori che ne regolano il metabolismo.

La vitamina B12 è un coenzima necessario affinché il metile tetraidrofolato (metabolita attivo dei folati) possa esplicare il proprio ruolo nella sintesi della metionina dalla omocisteina: studi epidemiologici indicano il ruolo della vitamina B12 nella prevenzione dei difetti congeniti e nello sviluppo del sistema nervoso del nascituro (3). La carenza sub-clinica di vitamina B12 è diffusa e raramente diagnosticata, associata soprattutto a patologie gastriche (4).

Il ruolo della vitamina B6 nella prevenzione dei difetti congeniti è meno chiaro, tuttavia è un fattore essenziale per il metabolismo dei folati; sebbene rara una carenza sub-clinica di B6 può essere indotta da fattori quali disturbi epatici, stati infiammatori, alcolismo, assunzione di taluni integratori quali ginkgo biloba e teofillina (5). Pertanto, migliori informazioni sullo status nutrizionale di queste vitamine potrebbero ridurre le carenze secondarie di folati e aumentare la frazione di difetti del tubo neurale prevenibile con l'assunzione di acido folico, che di rado raggiunge i livelli ottimali attesi. Negli USA è attivo un sistema di monitoraggio dello status dei folati all'interno della *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) (www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm). In Italia, invece, come per altri Paesi europei, gli studi finora disponibili forniscono dati a macchia di leopardo, ottenuti spesso con metodologie analitiche non confrontabili: ad esempio, i valori di riferimento per definire uno status adeguato o carenziale di folati sono diversi fra i test disponibili. Per quanto riguarda le vitamine B12 e B6 mancano dati attendibili (6) e sarebbe auspicabile trasferire ad un programma di monitoraggio le metodologie utilizzate in attività di ricerca. Folati sierici (status a breve termine), folati eritrocitari (status a lungo termine) e omocisteina totale plasmatica (indicatore funzionale complessivo per le vitamine B2, B6, B12 e folati) sono i biomarcatori più comunemente usati per valutare lo status dei folati (7).

Difetti del tubo neurale non suscettibili all'acido folico

Le evidenze scientifiche confermano che la riduzione del rischio di difetti del tubo neurale ottenibile con la supplementazione con acido folico è molto più evidente nelle popolazioni con alta incidenza di queste malformazioni e con insufficiente assunzione di folati nella dieta (1). Anche in queste situazioni, rimane una frazione residua di difetti del tubo neurale pari ad almeno il 30% che apparentemente non è suscettibile all'azione della vitamina. Fermo restando che per queste malformazioni vi è un'importante componente di suscettibilità genetica, evidenziata dal rischio di ricorrenza, si possono identificare due tipi di fattori di rischio non genetici:

a) Fattori non connessi ai folati

Particolarmente importanti sembrano essere l'obesità e le alterazioni fisiologiche associate alla sindrome metabolica, e anche gli squilibri di elementi in traccia essenziali, soprattutto la carenza secondaria di zinco nell'embrione (questi fattori verranno discussi

più in dettaglio nei paragrafi seguenti). Studi sperimentali sul topo mostrano che l'esposizione orale ad arsenico inorganico induce un'alta incidenza di difetti del tubo neurale in ceppi geneticamente suscettibili (8); l'acido folico ha solo una modesta azione protettiva (9). Un aspetto interessante è che l'arsenico inorganico, oltre ad indurre stress ossidativo e danno epigenetico (10) è in grado di interferire con l'insulina, alterando il metabolismo del glucosio (11). Il diabete gestazionale è un fattore teratogeno nell'uomo; tuttavia, le attuali evidenze sperimentali non permettono di sostenere con certezza l'associazione fra arsenico e diabete ai livelli di esposizione nella popolazione generale (12). L'arsenico inorganico è un importante contaminante delle acque per uso umano e di alcuni alimenti vegetali, come il riso e altri cereali, e l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, (EFSA) raccomanda di sorvegliarne e ridurre l'esposizione (13): sebbene le principali preoccupazioni siano attualmente soprattutto nei confronti del rischio cancerogeno, i dati tossicologici indicano una necessaria attenzione verso gli effetti sulla generazione futura; pertanto è importante indagare l'incidenza di malformazioni nelle popolazioni con elevata esposizione ad arsenico

b) Fattori che interferiscono con i folati, vanificandone l'effetto protettivo

I principali fattori antinutrizionali per i folati sono le carenze di vitamina B12 e di vitamina B6, già discusse. Tra i contaminanti alimentari che possono interferire con il metabolismo dei folati, occorre citare almeno la fumonisina B1, una micotossina presente nei cereali. La fumonisina induce difetti del tubo neurale nei roditori, associati ad una ridotta sintesi di sfingolipidi essenziali per lo sviluppo del sistema nervoso: nel cervello si verifica un accumulo di precursori dei ceramidi e una ridotta espressione del recettore dei folati (14, 15). Anche se l'esposizione alla micotossina non raggiunge livelli direttamente teratogeni, sebbene possa divenire importante nei Paesi in via di sviluppo, potrebbe però rappresentare un fattore di rischio per carenze secondarie di folati in soggetti vulnerabili.

Eccesso di vitamina A come fattore teratogeno

L'esempio della vitamina A è paradigmatico per indicare come sia l'eccesso sia la carenza di taluni nutrienti possano determinare effetti negativi sulla salute, compreso lo sviluppo embrionale (16).

A parte abitudini alimentari, comunque sconsigliabili, con un forte consumo di fegato, un eccesso di vitamina può essere associato al consumo disinformato di integratori e alimenti "rinforzati" con supplementi: il Comitato Scientifico per l'Alimentazione umana ha definito il limite massimo tollerabile di assunzione pari a 3000 unità internazionali/giorno nell'adulto, proprio sulla base di un possibile effetto teratogeno nella donna (17).

Studi condotti su roditori hanno evidenziato che sia la carenza, sia l'eccesso di retinoidi inducono uno spettro di malformazioni ampio e piuttosto simile; in primo luogo difetti cardiaci, quali ipoplasia ventricolare e difetti settali (18), nonché anomalie a carico di occhi, reni, polmoni, tratto genito-urinario, nonché dello scheletro e del diaframma (19). Riguardo all'organogenesi del diaframma, è interessante notare la correlazione, osservata nell'essere umano, tra carenza di vitamina A e un alto rischio di ernia diaframmatica congenita (20). Studi epidemiologici effettuati sugli effetti del trattamento di donne in gravidanza con retinoidi sintetici analoghi della vitamina A per la cura di problemi cutanei, indicano un aumento del rischio per le anomalie cranio-facciali, cardiovascolari, del timo e del sistema nervoso centrale (21). I retinoidi, come sostanze liposolubili, possono andare incontro ad un certo accumulo

corporeo, pertanto, un'elevata esposizione pre-concezionale può portare ad un rischio per il nascituro.

Dosi eccessive di vitamina A nella dieta potrebbero interagire con altri contaminanti alimentari con analoghi bersagli. Un esempio è fornito dall'effetto sinergico dell'esposizione concomitante ad acido retinoico e cadmio che porta a difetti degli arti anteriori nel topo (22).

Le interazioni gene-nutriente sono importanti per una valutazione rischio-beneficio della vitamina A in gravidanza. I retinoidi sono ligandi naturali di due gruppi di recettori nucleari che agiscono come fattori trascrizionali, denominati RAR e RXR. Essi sono coinvolti nella regolazione di determinati pattern di espressione genica critici durante lo sviluppo embrionale/fetale (23). In particolare, RXR-alfa sembra principalmente implicato nello sviluppo cardiaco, RAR-gamma nelle anomalie scheletriche, ad eccezione di quelle cranio-facciali (23) e RAR-alfa e -beta nella patogenesi dell'ernia diaframmatica (24). Molti degli effetti osservati sono dovuti alla regolazione da parte dell'acido retinoico, attraverso i recettori RAR, dell'espressione dei geni HOX, cruciali per lo sviluppo dell'asse corporeo dell'embrione durante le prime fasi dell'organogenesi (25). L'ectoderma sembra essere più suscettibile alla carenza di vitamina A, mentre l'eccesso colpisce soprattutto il mesoderma: questo potrebbe essere correlato alla diversa localizzazione nei compartimenti embrionali dei recettori nucleari e delle proteine di trasporto per l'acido retinoico (16).

Alla luce di tali evidenze, nel caso sia necessaria una supplementazione con vitamina A in fase periconcezionale, è prudente utilizzare beta-carotene, una provitamina presente in alimenti vegetali e per la quale non esistono indicazioni di un effetto teratogeno (26).

Oltre ai folati e ai fattori correlati e alla vitamina A, anche altre vitamine possono modulare il rischio di malformazioni congenite. Ad esempio, vi sono indicazioni sulla correlazione con malformazioni addominali, in particolare, fra carenza di vitamine E e C e gastroschisi (27), carenza di vitamine del gruppo B, E e colina ed ernia diaframmatica (28), assunzione periconcezionale di supplementi multivitaminici e ridotto rischio di onfalocele (29). Si tratta però di informazioni non corrette da studi sui possibili meccanismi biologici e che non arrivano ancora a formare un quadro coerente, utilizzabile per una strategia di prevenzione primaria.

Elementi in traccia essenziali: il caso dello zinco

Le carenze primarie, con manifestazioni cliniche, di uno o più oligoelementi essenziali sono rare nei Paesi industrializzati. Possono essere, invece, importanti le carenze subcliniche, indotte da stili alimentari erranei e/o da esposizioni ad alcuni contaminanti alimentari che, interferendo con i nutrienti, ne aumentano il fabbisogno: tipici esempi sono le interazioni fra alcune sostanze ad attività tireostatica (es. la genisteina, fitoestrogeno della soia) e lo iodio (30). Nei Paesi in via di sviluppo, con diete monotone, possono essere particolarmente importanti i fattori antinutrizionali presenti in alcuni alimenti: un esempio classico è il sorgo, un cereale importante per l'alimentazione umana in Africa, ma ricco di fitati che interferiscono con l'assorbimento di elementi in traccia essenziali, in particolare ferro e zinco (31). Le carenze subcliniche possono rappresentare un rischio soprattutto quando l'organismo ha un fabbisogno maggiore e non rimandabile dello specifico nutriente, ad esempio durante la gravidanza.

Lo zinco è in equilibrio con altri due elementi in traccia essenziali, in primo luogo con l'apporto di rame, ma anche con il ferro: un eccesso di un elemento tende ad inibire la biodisponibilità degli altri, e viceversa. L'eccessiva assunzione di zinco induce l'espressione di metallotioneine nella mucosa intestinale e questo riduce la biodisponibilità di rame e ferro. Per contro, un'adeguata assunzione di zinco può essere un fattore protettivo nei confronti di elementi tossici, come il cadmio (32).

Lo zinco attualmente riscuote una considerevole attenzione per il suo ruolo in numerosi processi metabolici e in particolare nei processi coinvolti nella embriogenesi: ad esempio, le proteine Zinc-finger hanno un ruolo cruciale nella regolazione epigenetica dello sviluppo del neuroectoderma (33). Inoltre, l'apporto dell'oligoelemento è importante per la crescita di cellule e tessuti: la carenza di zinco riduce la produzione di somatomedina ((IGF-1, insuline-like growth factor) (34). Le fonti alimentari dell'elemento sono diverse: importanti sono la carne e i cereali integrali, mentre i latticini e molte verdure danno un apporto modesto (32). Inaspettatamente, la carenza subclinica di zinco rappresenta un possibile problema in Europa: il 18% degli adulti maschi in Spagna hanno livelli plasmatici di zinco inadeguati rispetto ai valori di riferimento per un apporto sufficiente (35). Al momento, non vi sono studi epidemiologici su un ruolo della carenza di zinco come fattore di rischio teratogeno: tuttavia il ruolo dello zinco nella regolazione dell'epigenoma indica che ottenere informazioni sullo status nutrizionale nella popolazione delle donne in età fertile può essere importante per la tutela della generazione futura. La carenza di zinco può essere un fattore di rischio riproduttivo importante nelle donne di Paesi in via di sviluppo, anche in assenza di apparente malnutrizione (36, 37): pertanto, l'apporto di zinco in gravidanza può rappresentare un problema meritevole di attenzione nella società multiculturale.

Indice glicemico e obesità

L'obesità e le alterazioni fisiologiche associate alla sindrome metabolica sono riconosciuti fattori di rischio per i difetti del tubo neurale (38, 39): l'aumento di rischio, espresso come *Odds Ratio*, è di un fattore 2, che diventa di un fattore 4 per l'obesità grave (*Body Mass Index*, BMI > 40) presente prima della gravidanza (40). Il meccanismo teratogeno sembra associato ad alterazioni del metabolismo del glucosio, quali l'alto indice glicemico, che a sua volta aumenta lo stress ossidativo e l'apoptosi nel neuroepitelio (41). La differenziazione delle isole di Langerhans pancreatiche nell'embrione umano termina alla settima settimana di gestazione, quindi molto dopo la chiusura del tubo neurale (tra la terza e la quarta settimana); pertanto, durante l'organogenesi del tubo neurale, se l'embrione riceve un eccesso di glucosio dalla madre, non è in grado di regolarne la quantità in circolo (42). Questo squilibrio porta ad un aumento dello stress ossidativo nel neuroepitelio, nonché ad una diminuzione dell'inositolo, carboidrato presente negli alimenti (cereali, noci, meloni, arance) e sintetizzato dall'organismo, che è implicato in vari processi fisiologici tra cui la chiusura del tubo neurale (43). Nei roditori la somministrazione di inositolo è un fattore protettivo nei confronti dei difetti del tubo neurale indipendente dai folati (44). Oltre all'inositolo, anche il fattore di trascrizione Pax-3, essenziale durante lo sviluppo del tubo neurale, viene inibito dallo stress ossidativo determinato dall'eccesso di glucosio (45). Oltre al diabete clinicamente conclamato, anche l'iperglicemia e l'iperinsulinemia materne, soprattutto ove vi sia un alto BMI prima della gravidanza (46-48), così come i polimorfismi del metabolismo del glucosio (49) sono di per sé fattori di rischio per i difetti del tubo neurale.

Il complesso della sindrome metabolica è un fattore di rischio anche per altre malformazioni. Le donne obese, infatti, presentano un rischio maggiore di avere prole con onfalocoele, difetti cardiaci o anomalie multiple (50). Il diabete gestazionale è associato con una tipica e ben nota sofferenza dismetabolica fetale, in cui è frequente la crescita intrauterina eccessiva, accompagnata da parto prematuro o distocico e aumentata mortalità; tuttavia, i bambini di madri diabetiche presentano anche un rischio più elevato di rare e gravi malformazioni indotte da alterazioni durante la prima organogenesi, quali l'oloprosencefalia (51) e la sindrome da regressione caudale (52). Infine, un elevato apporto alimentare di grassi, specialmente quelli saturi, è associato di per sé ad una più alta incidenza di gastroschisi (53).

Conclusioni

La valutazione delle evidenze scientifiche su componenti alimentari e malformazioni congenite rientra nel quadro concettuale della sicurezza alimentare sostenibile, intesa come “l’insieme delle azioni volte a minimizzare le conseguenze avverse sulla salute anche della generazione futura associate alla presente sicurezza e qualità nutrizionale dell’alimento” (54).

Le evidenze disponibili identificano le lacune conoscitive e le incertezze dovute a dati inadeguati o controversi; pertanto, possono e debbono innescare ulteriori studi, sperimentali ed epidemiologici, su obiettivi prioritari. Un possibile esempio di argomento critico per ulteriori ricerche è l’identificazione e la caratterizzazione dei fattori coinvolti in carenze secondarie.

Nel contempo questa disamina, per quanto limitata, identifica dei fattori associati all’alimentazione per cui già ora è possibile considerare una strategia integrata di prevenzione primaria delle malformazioni, basata su dati scientifici, in particolare:

- l’adeguato apporto di altre vitamine del gruppo B per ottimizzare l’efficacia della supplementazione con acido folico;
- la corretta assunzione di vitamina A;
- il monitoraggio dello stato nutrizionale dello zinco associato con altri elementi in traccia (rame, ferro);
- la riduzione dell’incidenza della sindrome metabolica (prevenzione primaria) e il controllo delle alterazioni cliniche correlate, in primo luogo la iperglicemia (prevenzione secondaria).

Il periodo della massima suscettibilità all’induzione di malformazioni congenite va sino alla sesta-settima settimana di gravidanza: quindi, analogamente alla supplementazione con acido folico, il “gruppo bersaglio” delle azioni sopra citate devono essere le donne in età fertile che non evitano attivamente la gravidanza. Infatti, indirizzarsi solo alle donne che sanno già di essere incinte rischierebbe di lasciare scoperta una parte cruciale della finestra temporale di massima suscettibilità, comprendente anche la chiusura del tubo neurale (sino alla quarta settimana). Sarebbe anzi auspicabile far pervenire alcuni semplici e comprensibili messaggi alla popolazione, non solo femminile, già a partire dall’età scolare.

Obiettivi generali per un aggiornamento e potenziamento della prevenzione primaria nell’ambito delle malformazioni congenite sono gli stili alimentari che comportano assunzioni inadeguate o squilibrate di nutrienti, i fattori (ambientali e/o associati a suscettibilità genetiche) che possono portare a carenze secondarie, nonché la caratterizzazione dei possibili rischi di assunzioni eccessive di talune componenti associate all’uso di integratori o alimenti “salutistici”.

Bibliografia

1. Salerno P, Bianchi F, Pierini A, Baldi F, Carbone P, Mantovani A, Taruscio D. Folic acid and congenital malformation: scientific evidence and public health strategies. *Ann Ig* 2008;20(6):519-30.
2. Mantovani A, Baldi F, Frazzoli C, Lorenzetti S, Maranghi F (Ed.). Modelli per la valutazione rischio-beneficio in sicurezza alimentare. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012. (Rapporti ISTISAN 12/50).
3. Breimer LH, Nilsson TK. Has folate a role in the developing nervous system after birth and not just during embryogenesis and gestation? *Scand J Clin Lab Invest* 2012;72(3):185-91.
4. Braillard O, Casini A, Samii K, Rufenacht P, Junod PN. Vitamin B12 deficiency: what’s new? *Rev Med Suisse* 2012;8(355):1805-10.

5. Gandhi AK, Desai JV, Ghatge MS, di Salvo ML, Di Biase S, Danso-Danquah R, Musayev FN, Contestabile R, Schirch V, Safo MK. Crystal structures of human pyridoxal kinase in complex with the neurotoxins, ginkgotoxin and theophylline: insights into pyridoxal kinase inhibition. *PLoS One* 2012;7(7):e40954.
6. Al-Tahan J, González-Gross M, Pietrzik K. B-vitamin status and intake in European adolescents. A review of the literature. *Nutr Hosp* 2006;21(4):452-65.
7. Pfeiffer CM, Schleicher RL, Johnson CL, Coates PM. Assessing vitamin status in large population surveys by measuring biomarkers and dietary intake - two case studies: folate and vitamin D. *Food Nutr Res* 2012;56:5944.
8. Wlodarczyk BJ, Cabrera RM, Hill DS, Bozinov D, Zhu H, Finnell RH. Arsenic-induced gene expression changes in the neural tube of folate transport defective mouse embryos. *Neurotoxicology* 2006;27(4):547-57.
9. Gefrides LA, Bennett GD, Finnell RH. Effects of folate supplementation on the risk of spontaneous and induced neural tube defects in Splotch mice. *Teratology* 2002;65(2):63-9.
10. Bhattacharjee P, Banerjee M, Giri AK. Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ Int* 2013;53C:29-40.
11. Hill DS, Wlodarczyk BJ, Mitchell LE, Finnell RH. Arsenate-induced maternal glucose intolerance and neural tube defects in a mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;239(1):29-36.
12. Maull EA, Ahsan H, Edwards J, Longnecker MP, Navas-Acien A, Pi J, Silbergeld EK, Styblo M, Tseng CH, Thayer KA, Loomis D. Evaluation of the association between arsenic and diabetes: a National Toxicology Program workshop review. *Environ Health Perspect* 2012;120(12):1658-70.
13. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal* 2009;7(10):1351.
14. Gelineau-van Waes J, Rainey MA, Maddox JR, Voss KA, Sachs AJ, Gardner NM, Wilberding JD, Riley RT. Increased sphingoid base-1-phosphates and failure of neural tube closure after exposure to fumonisin or FTY720. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2012;94(10):790-803.
15. Pellanda H, Forges T, Bressenot A, Chango A, Bronowicki JP, Guéant JL, Namour F. Fumonisin FB1 treatment acts synergistically with methyl donor deficiency during rat pregnancy to produce alterations of H3- and H4-histone methylation patterns in fetuses. *Mol Nutr Food Res* 2012;56(6):976-85.
16. Collins MD, Mao GE. Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:399-430.
17. European Commission. *Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Preformed Vitamin A (retinol and retinyl esters)*. Brussels: European Commission; 2002. Disponibile all'indirizzo http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out145_en.pdf; ultima consultazione 12/11/13.
18. Colbert MC. Retinoids and cardiovascular developmental defects. *Cardiovasc Toxicol* 2002;2(1):25-39.
19. Zile MH. Function of vitamin A in vertebrate embryonic development. *J Nutr* 2001;131(3):705-8.
20. Beurskens LW, Schrijver LH, Tibboel D, Wildhagen MF, Knapen MF, Lindemans J, de Vries J, Steegers-Theunissen RP. Dietary vitamin A intake below the recommended daily intake during pregnancy and the risk of congenital diaphragmatic hernia in the offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2013;97(1):60-6.
21. Loureiro KD, Kao KK, Jones KL, Alvarado S, Chavez C, Dick L, Felix R, Johnson D, Chambers CD. Minor malformations characteristic of the retinoic acid embryopathy and other birth outcomes in children of women exposed to topical tretinoin during early pregnancy. *Am J Med Genet A* 2005;136(2):117-21.

22. Liao X, Lee GS, Shimizu H, Collins MD. Comparative molecular pathology of cadmium- and all-trans-retinoic acid-induced postaxial forelimb ectrodactyly. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;225(1):47-60.
23. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 2009;7:e002.
24. Beurskens N, Klaassens M, Rottier R, de Klein A, Tibboel D. Linking animal models to human congenital diaphragmatic hernia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007;79(8):565-72.
25. Schilling TF, Knight RD. Origins of anteroposterior patterning and Hox gene regulation during chordate evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001;356(1414):1599-613.
26. Strobel M, Tinz J, Biesalski HK. The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. *Eur J Nutr* 2007;46 Suppl 1:11-20.
27. Torfs CP, Lam PK, Schaffer DM, Brand RJ. Association between mothers' nutrient intake and their offspring's risk of gastroschisis. *Teratology* 1998;58(6):241-50.
28. Yang W, Shaw GM, Carmichael SL, Rasmussen SA, Waller DK, Poer BR, Anderka M; National Birth Defects Prevention Study. Nutrient intakes in women and congenital diaphragmatic hernia in their offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82(3):131-8.
29. Botto LD, Mulinare J, Erickson JD. Occurrence of omphalocele in relation to maternal multivitamin use: a population-based study. *Pediatrics* 2002;109(5):904-8.
30. Baldi F, Mantovani A. A new database for food safety: EDID (Endocrine disrupting chemicals - Diet Interaction Database). *Ann Ist Super Sanita* 2008;44(1): 57-63.
31. Proietti I. How to improve safety and nutritional security of raw ingredients: the case of sorghum. In: Frazzoli C, Asongalem EA, Orisakwe OE (Ed.). *Cameroon-Nigeria-Italy scientific cooperation: veterinary public health and sustainable food safety to promote "one health/one prevention"*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012. (Rapporti ISTISAN 12/49). p. 143-8
32. European Commission. *Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Zinc (expressed on 5 March 2003)*. Brussels: European Commission; 2003. Disponibile all'indirizzo http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out177_en.pdf; ultima consultazione 12/11/13.
33. Aruga, The role of Zic genes in neural development. *Mol Cell Neurosci* 2004;26(2):205-21.
34. Cole CR, Lifshitz F. Zinc nutrition and growth retardation. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;5(4):889-96.
35. Sánchez C, López-Jurado M, Planells E, Llopis J, Aranda P. Assessment of iron and zinc intake and related biochemical parameters in an adult Mediterranean population from southern Spain: influence of lifestyle factors. *J Nutr Biochem* 2009;20(2):125-31.
36. Ajayi OO, Charles-Davies MA, Arinola OG. Progesterone, selected heavy metals and micronutrients in pregnant Nigerian women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Afr Health Sci* 2012;12(2):153-9.
37. Gebremedhin S, Enquselassie F, Umata M. Prevalence of prenatal zinc deficiency and its association with socio-demographic, dietary and health care related factors in rural Sidama, Southern Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 2011;11:898.
38. Oddy WH, De Klerk NH, Miller M, Payne J, Bower C. Association of maternal pre-pregnancy weight with birth defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2009;49(1):11-5.
39. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009;301(6):636-50
40. Blomberg MI, Källén B. Maternal obesity and morbid obesity: the risk for birth defects in the offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88(1):35-40.

41. Carmichael SL, Witte JS, Shaw GM. Nutrient pathways and neural tube defects: a semi-Bayesian hierarchical analysis. *Epidemiology* 2009;20(1):67-73.
42. Wentzel P, Wentzel CR, Gäreskog MB, Eriksson UJ. Induction of embryonic dysmorphogenesis by high glucose concentration, disturbed inositol metabolism, and inhibited protein kinase C activity. *Teratology* 2001;63(5):193-201.
43. Harris MJ, Juriloff DM. An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88(8):653-69.
44. Cogram P, Hynes A, Dunlevy LP, Greene ND, Copp AJ. Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol. *Hum Mol Genet* 2004;13(1):7-14.
45. Loeken MR. Advances in understanding the molecular causes of diabetes-induced birth defects. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13(1):2-10.
46. Hendricks KA, Nuno OM, Suarez L, Larsen R. Effects of hyperinsulinemia and obesity on risk of neural tube defects among Mexican Americans. *Epidemiology* 2001;12(6):630-5.
47. Ray JG, Wyatt PR, Vermeulen MJ, Meier C, Cole DE. Greater maternal weight and the ongoing risk of neural tube defects after folic acid flour fortification. *Obstet Gynecol* 2005;105(2):261-5.
48. Yazdy MM, Liu S, Mitchell AA, Werler MM. Maternal dietary glycemic intake and the risk of neural tube defects. *Am J Epidemiol* 2010;171(4):407-14.
49. Au KS, Tran PX, Tsai CC, O'Byrne MR, Lin JI, Morrison AC, Hampson AW, Cirino P, Fletcher JM, Ostermaier KK, Tyerman GH, Doebel S, Northrup H. Characteristics of a spina bifida population including North American Caucasian and Hispanic individuals. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82(10):692-700.
50. Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA, Botto LD, Moore CA. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics* 2003;111(5 Pt 2):1152-8.
51. Goodman FR. Congenital abnormalities of body patterning: embryology revisited. *Lancet* 2003;362(9384):651-62.
52. Hay WW Jr. Care of the infant of the diabetic mother. *Curr Diab Rep* 2012;12(1):4-15.
53. Siega-Riz AM, Olshan AF, Werler MM, Moore C. Fat intake and the risk of gastroschisis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006;76(4):241-5.
54. Frazzoli C, Petrini C, Mantovani A. Sustainable development and next generation's health: a long-term perspective about the consequences of today's activities for food safety. *Ann Ist Super Sanita* 2009;45(1):65-75.