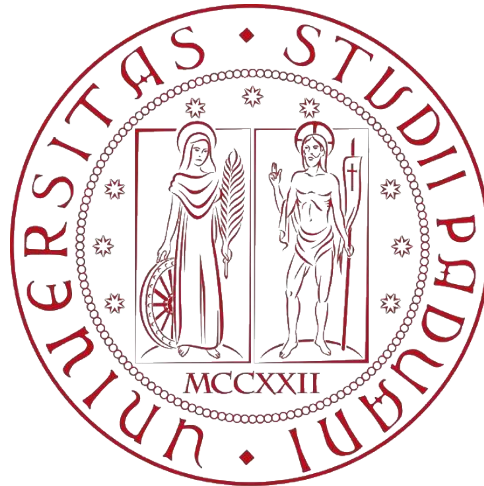


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



**ELABORATO DI LAUREA**

Invecchiamento epigenetico accelerato nella prima infanzia:  
impatto del basso peso alla nascita sull'accelerazione dell'età  
epigenetica e sulla salute nell'adulto

**Tutor:** Prof.ssa Sofia Pavanello  
Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica

**Laureando:** Andrea Redolfi

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



## INDICE

<b>Abstract</b> .....	1
<b>1. Stato dell'arte</b> .....	3
1.1 Invecchiamento biologico: overview e meccanismi.....	3
1.2 Basso peso alla nascita come indicatore di salute nell'età adulta.....	6
1.3 Orologi molecolari ed età epigenetica.....	6
<b>2. Materiali e metodi</b> .....	9
2.1 Campione di studio: dimensione e reclutamento individui partecipanti..	9
2.2 Generazione dei dati di metilazione del DNA.....	9
2.2.1 Estrazione del DNA.....	9
2.2.2 Infinium MethylationEPIC BeadChip v1.0.....	10
2.3 Stima dell'età epigenetica.....	11
2.4 Misurazione del peso alla nascita.....	11
2.5 Raccolta di dati sulle covariate.....	11
2.6 Analisi statistica.....	12
<b>3. Osservazioni e risultati</b> .....	13
3.1 Statistiche descrittive nei vari punti temporali.....	13
3.2 Analisi dati ottenuti.....	14
<b>4. Discussione e conclusioni</b> .....	17
<b>Bibliografia</b> .....	19
<b>Appendice</b> .....	21



## **Abstract**

Secondo l'ipotesi Development Origins of Health and Disease (DOHaD), le avversità della prima infanzia hanno un impatto negativo sulla salute dell'individuo nell'età adulta. Questa teoria è stata esplorata dalla ricerca epidemiologica che ha messo in relazione il basso peso alla nascita con la salute e la mortalità nell'adulto. Nello studio preso in considerazione in questo elaborato di tesi sono riportati i risultati di una analisi longitudinale che ha esaminato l'accelerazione dell'età epigenetica (EAA) dalla nascita fino ai tre anni di vita in sessantasette bambini nati nella Repubblica Democratica del Congo (RDC).

Per ogni soggetto in esame è stato misurato il peso alla nascita ed è stato eseguito un prelievo di sangue al tempo zero (nascita) e alle visite di controllo per un follow-up complessivo di tre anni. L'età epigenetica è stata stimata attraverso l'orologio epigenetico di Horvath che prende in considerazione i pattern di metilazione in 353 siti CpG.

L'utilizzo di un modello multilivello ha permesso di esaminare la correlazione tra il peso alla nascita e l'accelerazione dell'età epigenetica. Questo studio ha rivelato che l'invecchiamento epigenetico accelerato manifestatosi nei primi tre anni d'età è associato a un basso peso alla nascita. Inoltre, il basso peso alla nascita, e quindi l'accelerazione dell'età epigenetica, sono correlati ad una scarsa salute nell'età adulta.



## 1. Stato dell'arte

### 1.1 Invecchiamento biologico: overview e meccanismi

L'invecchiamento biologico, nella sua definizione più generale, è un processo complesso e inevitabile che coinvolge una serie di cambiamenti fisiologici, genetici e molecolari che si verificano nel corso della vita di un organismo vivente<sup>1</sup>. L'insieme di questi cambiamenti che avvengono nel corso del tempo portano ad un aumento del rischio di malattia e di morte.

In realtà, una recente definizione di invecchiamento, non vede tale processo come una serie di cambiamenti che portano esclusivamente ad una perdita di funzioni (senescenza) ma anche ad una loro acquisizione (crescita e sviluppo)<sup>1</sup>. Basandosi su questa definizione la velocità di invecchiamento diventa sinonimo di velocità di cambiamento<sup>1</sup>. Tale velocità è massima durante il periodo fetale, quando l'organismo si sviluppa da singola cellula a complesso organismo multicellulare<sup>1</sup>. L'invecchiamento fetale è determinato da fattori che regolano la velocità di mitogenesi, differenziazione e morte cellulare. Questi stessi fattori sono responsabili dell'invecchiamento durante tutto l'arco della vita<sup>1</sup>.

Al contrario di quanto sostenevano le teorie precedenti, è stato dimostrato che l'invecchiamento non è un processo *monofattoriale* ma *multifattoriale*: non è presente quindi una singola causa alla base di tale fenomeno ma più fattori e meccanismi possono interagire simultaneamente a diversi livelli di organizzazione funzionale. Il processo di invecchiamento, infatti, può essere influenzato da fattori genetici, epigenetici, ambientali e dallo stile di vita.

Ad oggi esistono tre principali teorie che cercano di trovare e spiegare i meccanismi alla base dell'invecchiamento biologico negli organismi viventi: la *teoria dell'invecchiamento programmato*, la *teoria dell'accumulo del danno* e la *teoria dell'invecchiamento epigenetico*.

- La *teoria dell'invecchiamento programmato* si basa sull'idea che tale processo sia il risultato di un programma biologico intrinseco all'organismo che è stato selezionato evolutivamente. La selezione positiva sarebbe avvenuta poiché l'invecchiamento fornisce dei vantaggi evolutivi: il *turnover cellulare* sarebbe vantaggioso per la specie poiché può avere un ruolo nella promozione dell'adattamento della specie all'ambiente circostante. Questa teoria sembra essere confutata dal fatto che, se l'invecchiamento fosse un programma genetico intrinseco, tramite mutazioni nel genoma si dovrebbe riuscire a rallentare o addirittura inibire il processo di invecchiamento stesso. In assenza di evidenze significative a riguardo, possiamo dire che non esiste una vera e propria regolazione genica dei processi di invecchiamento.
- La *teoria dell'accumulo del danno* ipotizza che l'individuo passi inevitabilmente da una situazione di ordine ad una di disordine in seguito all'accumulo di danni che possono avvenire a diversi livelli. A livello cellulare l'invecchiamento è caratterizzato da una progressiva perdita della funzione e dell'integrità delle cellule imputabile a fenomeni quali l'ossidazione, l'infiammazione e l'accumulo di prodotti di scarto.

Tali fattori possono danneggiare il DNA, le proteine e i lipidi cellulari, portando a un deterioramento delle funzioni cellulari e alla loro morte.

L'infiammazione cronica, in particolare, è una caratteristica importante dell'invecchiamento: sebbene sia un processo fisiologico fondamentale per combattere le infezioni, se persistente può causare danno tissutale e promuovere l'invecchiamento cellulare. Si definisce “*inflammaging*” lo stato infiammatorio cronico di basso grado (*low grade inflammation, LGI*) che favorisce l'invecchiamento cellulare<sup>2</sup>. L'*inflammaging* è un fattore di rischio molto rilevante per la morbilità e la mortalità nelle persone anziane perché la maggior parte delle malattie legate all'età hanno una patogenesi infiammatoria<sup>1</sup>. La *geroscience* è un campo di ricerca interdisciplinare che si concentra sull'indagine dei processi di invecchiamento e sullo studio delle connessioni tra invecchiamento e malattie associate. Tra i suoi propositi vi è lo studio dei meccanismi di base dell'invecchiamento implicati in patologie *age-related* (sindrome metabolica, obesità, diabete di tipo 2 e malattie cardiovascolari) con l'obiettivo di contrastarle<sup>3</sup>.

La *LGI* è una risposta che si innesca in assenza di infezione (“sterile”). Ricordiamo, infatti, che in condizioni fisiologiche l'infiammazione è il risultato di una risposta immunitaria acuta e transiente che si verifica in seguito al contatto con un agente estraneo, sia esso un patogeno (infezione) oppure un corpo estraneo. Più in generale, l'infiammazione è una risposta dinamica di un tessuto vascularizzato ad una lesione e coinvolge sia una componente vasale che cellulare. La prima è caratterizzata dalla fuoriuscita di liquido dai vasi di piccolo calibro con lo scopo di diluire il patogeno e le cellule del sistema immunitario e drenare agli organi linfoidi secondari, attraverso la via linfatica, le cellule deputate all'attivazione dei linfociti T e gli antigeni liberi riconosciuti dai linfociti B. La risposta infiammatoria prevede un coinvolgimento iniziale del sistema immunitario innato con la produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$  e IL-6 seguita da una risposta immunitaria adattativa. L'eziologia della *low grade inflammation* e il modo in cui può influire negativamente sulla salute rimangono in gran parte sconosciuti<sup>2</sup>. Sono state fatte però delle ipotesi sui fattori che potrebbero causare una condizione di infiammazione cronica. Ad esempio, la produzione di molecole reattive da parte dei leucociti infiltrati finisce per danneggiare gli elementi strutturali e cellulari dei tessuti<sup>2</sup>. Inoltre, le cellule non immunitarie danneggiate e le cellule immunitarie attivate portano alla produzione di citochine che amplificano o modulano la risposta infiammatoria, alterando i fenotipi delle cellule vicine con una conseguente alterazione della normale funzione dei tessuti<sup>2</sup>. Un'altra fonte di infiammazione potrebbe essere rappresentata dalle *cellule self-debris*<sup>2</sup>, ovvero le cellule dell'organismo che sono danneggiate o invecchiate e diventano quindi “detriti” cellulari. Le cellule che subiscono danno o invecchiamento rilasciano dei “segnali di allarme” che vengono percepiti dal sistema immunitario (SI) il quale risponde avviando una reazione infiammatoria. Infatti, i *self-debris* rilasciati come conseguenza del danno alle cellule possono imitare i prodotti batterici e fungere da agenti



molecolari endogeni che attivato una risposta immunitaria innata<sup>2</sup>. Talvolta il SI riesce ad eliminare o riparare le cellule danneggiate. Durante l'invecchiamento o in determinate condizioni patologiche, aumenta la produzione di *cellule self-debris* e diminuisce l'efficienza della loro rimozione con un conseguente aumento di questi "detriti cellulari" responsabili di una risposta infiammatoria persistente.

Un altro fenomeno correlato all'invecchiamento è l'ossidazione. La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), infatti, può causare danni a macromolecole che, a loro volta, portano ad una alterazione delle funzioni cellulari. I ROS sono prodotti sia durante una risposta infiammatoria che come prodotti di scarto dell'attività mitocondriale durante il processo di riduzione dell'O<sub>2</sub>. Lo stress ossidativo può portare all'accumulo di proteine danneggiate o mal ripiegate che possono essere causa dell'insorgenza di malattie legate all'invecchiamento come Parkinson ( $\alpha$ -sinucleina) o Alzheimer ( $\beta$ -amiloide).

- La *teoria dell'invecchiamento epigenetico* si concentra sul ruolo delle modifiche epigenetiche nel processo di invecchiamento. Quest'ultime sono cambiamenti chimici che avvengono nel DNA e sulle proteine che interagiscono con esso, senza alterare la sequenza del DNA stesso. Tale teoria afferma che, col passare del tempo, si accumulino delle modifiche epigenetiche nel nostro genoma che possono influenzare l'espressione genica (favorire o inibire l'espressione di un gene) e regolare le funzioni cellulari. Le principali modifiche epigenetiche coinvolte nell'invecchiamento e quindi nell'insorgenza di malattie legate all'età includono: la metilazione del DNA, la modificazione degli istoni, il rimodellamento della cromatina, la regolazione degli RNA non codificanti (ncRNA) e la modifica dell'RNA<sup>4</sup>. Per questo motivo, comprendere i meccanismi epigenetici associati all'invecchiamento potrebbe aprire nuove strade per ritardare l'invecchiamento stesso<sup>4</sup>. Diversi studi hanno dimostrato che le modifiche epigenetiche associate all'invecchiamento sono reversibili, suggerendo la possibilità di rallentare l'invecchiamento attraverso terapie epigenetiche.

Al di là delle possibili teorie che possono spiegare in modo più o meno completo il processo di invecchiamento, la conclusione che possiamo trarre è che l'invecchiamento biologico è il risultato dell'interazione di numerosi fattori, molti dei quali ancora da chiarire.

## 1.2 Basso peso alla nascita come indicatore di salute nell'età adulta

Il basso peso alla nascita è un indicatore che permette di predire in modo affidabile i fattori di rischio per le malattie croniche e la mortalità negli adulti.

In realtà, non è il basso peso alla nascita di per sé ad avere un impatto negativo sulla salute negli adulti ma sono i cambiamenti prenatali nella fisiologia fetale la causa ultima dell'aumento nel rischio di morte e malattia negli adulti. Tali cambiamenti sono a loro volta dovuti al basso peso alla nascita.

Il basso peso alla nascita può essere spiegato utilizzando due modelli alternativi di sviluppo:

- un *modello di "vincoli"* in cui il basso peso alla nascita è il risultato di limitazioni nelle risorse necessarie alla crescita e allo sviluppo dell'individuo. Questa condizione di denutrizione in utero si verifica quando il feto non riceve quantità sufficienti di ossigeno e nutrienti durante la gestazione.
- un *modello di "risposta adattativa predittiva"* in cui il basso peso alla nascita è una risposta a segnali che rappresentano condizioni ambientali future; è una sorta di adattamento agli stress ambientali che l'individuo si troverà ad affrontare.

Il basso peso alla nascita è inoltre correlato ad un invecchiamento accelerato e quindi ad una maggior rapidità nello sviluppo dell'individuo. Quest'ultima porta ad una riduzione dei tempi necessari al raggiungimento della maturità sessuale con un conseguente miglioramento del successo riproduttivo. D'altra parte, tale accelerazione comporta, come accennato in precedenza, un aumento del rischio di morbilità e mortalità nella vita adulta.

## 1.3 Orologi molecolari ed età epigenetica

Un orologio molecolare è un algoritmo in grado di predire l'età biologica di un organismo sulla base di specifici *biomarkers*<sup>5</sup>. I biomarcatori sono delle impronte tracciabili e quantificabili che vengono prodotte dal processo di invecchiamento e permettono di stimare l'età di un organismo<sup>5</sup>. Alcuni esempi di biomarcatori dell'invecchiamento sono: i cambiamenti epigenetici, l'accorciamento dei telomeri e le alterazioni dell'espressione genica e delle concentrazioni di metaboliti<sup>5</sup>.

I *biomarkers*, affinché possano essere utilizzati nel contesto degli orologi molecolari, devono essere ubiquitari (presenti sia in uomo che in altri organismi modello in un certo numero di tessuti) e correlati a processi di invecchiamento<sup>5</sup>. Un orologio molecolare può essere considerato universale soltanto se si basa su *biomarkers* cellulari o sub-cellulari perché solo quest'ultimi possono essere usati come strumento di paragone tra tessuti e tra specie differenti<sup>5</sup>.

Le modificazioni epigenetiche sono i *biomarkers* su cui si basano gli orologi epigenetici.

Quindi, sia gli orologi epigenetici che molecolari sono strumenti che si basano su meccanismi biologici intrinseci che avvengono all'interno delle cellule di un organismo vivente e sono utilizzati per stimare i tempi di divergenza evolutiva o di eventi biologici. Gli orologi epigenetici, di fatto, sono degli orologi molecolari che si basano su modifiche epigenetiche piuttosto che su mutazioni genetiche nella

sequenza del genoma. Le modifiche epigenetiche possono andare ad influenzare l'espressione genica e quindi le caratteristiche fenotipiche.

La metilazione del DNA, ad esempio, è una modifica epigenetica che viene utilizzata spesso dagli orologi epigenetici per stimare l'età biologica (BA) di un individuo. Quest'ultima è molto correlata all'età cronologica ed è un concetto abbastanza complesso da definire perché dipende da quale si considera essere l'inizio dei processi di invecchiamento biologico a cui corrisponde una  $BA=0$ . Indipendentemente da quale sia considerato essere lo zero, l'età biologica è l'età associata alle condizioni fisiche di una persona che possono influenzare la sua salute e il suo invecchiamento.

L'età cronologica, invece, è semplicemente il trascorrere dei giorni, in altre parole il periodo compreso tra la nascita e il momento presente.

Un concetto fondamentale per la trattazione dell'articolo in esame è di accelerazione (o decelerazione) dell'età epigenetica che è definita come la differenza tra l'età epigenetica (o biologica) e l'età cronologica.

Si parla di accelerazione dell'età epigenetica (EAA) quando l'invecchiamento biologico è più rapido di quello cronologico. Questa condizione porta inevitabilmente ad un declino più rapido della salute e ad un maggior rischio di sviluppare malattie croniche.

Al contrario, si parla di decelerazione dell'età epigenetica quando l'invecchiamento biologico è più lento di quello cronologico con un conseguente rallentamento nel declino della salute.



## **2. Materiali e metodi**

### **2.1 Campione di studio: dimensione e reclutamento individui partecipanti**

I dati dello studio in analisi provengono tutti da una collaborazione (iniziata nel 2009) tra l'università della Florida e l'ospedale HEAL situato a Goma, nella RDC (Africa centrale).

Il campione studiato è costituito da sessantasette coppie madre-bambino reclutate nell'unità di violenza sessuale del reparto di maternità dell'ospedale HEAL tra luglio 2015 e aprile 2017. Le visite di follow-up, invece, sono continuate fino a maggio 2019. In realtà, i campioni utilizzati nelle diverse analisi hanno una dimensione che varia da 61 a 67 coppie a causa della mancanza di dati: poteva accadere che non sempre le madri portassero i loro bambini alle visite di follow-up che si tenevano a sei mesi, un anno, due anni e tre anni di età.

Le donne sono state reclutate per la prima volta quando sono arrivate in ospedale per il parto. La partecipazione allo studio era volontaria (potevano ritirarsi in qualsiasi momento) e prevedeva l'approvazione di un documento di consenso.

Quest'ultimo e le domande necessarie allo svolgimento dello studio (sondaggi e interviste etnografiche) erano somministrati in lingua madre (swahili congolese) per facilitarne la comprensione. I campioni di sangue necessari per le analisi sono stati raccolti entro un giorno dal parto sia nella madre che nel neonato. Ai bambini sono stati eseguiti prelievi anche durante le visite di follow-up.

### **2.2 Generazione dei dati di metilazione del DNA**

#### **2.2.1 Estrazione del DNA**

Il DNA necessario alla generazione dei dati di metilazione è stato estratto da sangue intero presso l'Università della Florida (UF) utilizzando i QIAmp DNA Blood Mini Kits sviluppati dall'azienda biotecnologica Qiagen. In realtà, il prelievo di sangue e i primi 7 passaggi dell'estrazione, necessari per stabilizzare i campioni di DNA e uccidere gli agenti infettivi, sono stati eseguiti presso l'ospedale HEAL. I campioni sono stati poi inviati all'UF, dove si è conclusa la fase di estrazione. I mini kits contengono un tampone di lisi, necessario a rompere le membrane cellulari consentendo la fuoriuscita del DNA, e una colonna di cromatografia a base di silice, necessaria a separare il DNA dalle altre componenti cellulari (RNA e proteine). Dopo l'eluizione del DNA dalla colonna i campioni di bassa qualità sono stati rimossi e quelli con una bassa quantità sono stati concentrati usando un protocollo descritto nella rivista "*Cold Spring Harbor Protocols*" che prevede l'utilizzo di sali ed etanolo per la precipitazione del DNA, seguito da una sua risospensione in un buffer alternativo.

### 2.2.2 Infinium MethylationEPIC BeadChip v1.0

250g di DNA sono stati spediti all'Università di Miami dove sono stati generati i dati di metilazione del DNA grazie a 3 passaggi principali: trattamento del DNA con bisolfito di sodio, ibridazione con Infinium MethylationEPIC BeadChip v1.0 e tipizzazione della metilazione. La conversione con bisolfito di sodio permette di rilevare e distinguere le citosine metilate dalle citosine non metilate all'interno del DNA genomico. L'aggiunta del gruppo metile (CH<sub>3</sub>) avviene comunemente in posizione 5 della base azotata citosina, dando origine alla base modificata

5-metilcitosina (5-mC). Il trattamento del genoma con bisolfito porta alla deaminazione delle citosine non modificate in uracile, lasciando inalterate le basi modificate 5-mC e 5-hmC (5-idrossimetilcitosina). Solitamente questa procedura è seguita da una amplificazione con PCR o da sequenziamento Sanger perché permettono di definire il pattern specifico di metilazione in una determinata regione del genoma. La PCR richiede l'uso di due set diversi di coppie di primer: una specifica per la sequenza metilata non alterata e l'altra specifica per la sequenza non metilata convertita. Osservando quale delle due coppie di primer dà origine ad un amplicone è possibile risalire al pattern di metilazione delle citosine nel DNA originario. Nel nostro caso, dovendo fare uno screening di metilazione sull'intero genoma, la conversione con bisolfito è seguita da una ibridazione con Infinium MethylationEPIC BeadChip, un array che permette l'analisi contemporanea di centinaia di migliaia di siti CpG nel genoma umano (più di 850000 nella versione 1.0). Prima dell'ibridazione vera e propria tutto il DNA viene amplificato e frammentato per facilitarne l'ibridazione stessa. I frammenti vengono fatti precipitare e vengono incubati insieme all'array contenente migliaia di sonde oligonucleotidiche, ognuna delle quali è progettata per riconoscere una specifica sequenza di DNA target contenente un sito CpG ed è ancorata a microsfere (*beads*) situate sul microarray. Per rilevare la metilazione, vengono utilizzate due sonde per ciascun locus CpG: una per rilevare la metilazione (M) e una per rilevare l'assenza di metilazione (U). Una volta avvenuta l'ibridazione tra DNA target e sonde specifiche, quest'ultime vengono estese tramite l'aggiunta di nucleotidi fluorescenti. Se il locus CpG analizzato è metilato, una maggiore intensità di fluorescenza sarà osservata nel pozzetto associato alla sonda M specifica per quel sito. Al contrario, se il locus CpG non è metilato, l'intensità di fluorescenza più elevata verrà rilevata nel pozzetto contenente la sonda U. La rilevazione avviene grazie alla lettura del chip tramite uno scanner laser che rileva l'intensità del segnale fluorescente in ciascun sito CpG e lo converte in un valore numerico (*imaging*), che sarà proporzionale alla quantità di frammenti di DNA trattato che si sono ibridati alle sonde.

I file grezzi con estensione .idat, rilasciati come risultato dalla scansione del Beadchip Illumina, sono stati analizzati in R, in particolare col pacchetto *SeSame* che ha consentito di correggere il *background* (rimuovere aspecifici). Il controllo della qualità dei dati di metilazione è stato eseguito in R col pacchetto *meffil*.

Per avere un risultato più robusto è stata calcolata la media delle repliche tecniche. Dopo la rimozione di un *outlier* (verificato con un test di Grubbs) dell'età di metilazione del DNA e di tutti quei campioni che non avevano superato i controlli qualità, il numero di campioni di metilazione del DNA disponibili per l'analisi e provenienti da 67 individui distinti si è ridotto a 155.

### **2.3 Stima dell'età epigenetica**

Per stimare l'età epigenetica è stato utilizzato l'orologio epigenetico di Horvath perché è molto preciso anche nei bambini essendo stato addestrato su campioni aventi una vasta gamma di età (0-100 anni). Tale orologio stima l'età biologica di un individuo basandosi sui pattern di metilazione del DNA in 353 siti CpG. L'orologio di Horvath è un predittore multi-tissutale che consente di misurare l'età di metilazione del DNA (DNAmAge) in diversi tessuti e tipi cellulari ed è stato sviluppato usando 8000 campioni provenienti da 82 datasets di metilazione del DNA Illumina che includevano 51 tessuti sani e tipi di cellule<sup>6</sup>. Il contesto epigenomico, infatti, varia notevolmente tra i tipi di tessuto e molti cambiamenti legati all'età dipendono dal tipo di tessuto stesso<sup>6</sup>.

Una volta creato il modello grazie all'utilizzo di campioni con età note durante l'addestramento, è possibile utilizzarlo per analizzare nuovi campioni di metilazione del DNA e predire l'età biologica di un individuo. Tale orologio confronta i livelli di metilazione dei siti CpG nel campione in analisi con quelli previsti dal modello e fornisce una stima della BA dell'organismo.

### **2.4 Misurazione del peso alla nascita**

Il peso alla nascita di ogni bambino è stato misurato due volte e il valore è stato mediato in modo da ottenere un valore più consistente. La definizione di basso peso alla nascita secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) è stata utilizzata nell'articolo in esame per dicotomizzare il peso alla nascita in due categorie distinte:  $<2500\text{g}$  e  $\geq 2500\text{g}$ . I bambini con peso inferiore a 2500g sono considerati con un basso peso alla nascita. Nel seguente studio sono presenti due bambini che alla nascita hanno un peso maggiore di 4000g (4040g e 4080g rispettivamente) e dovrebbero essere considerati con un peso alla nascita elevato secondo il criterio dell'OMS. Essendo soltanto due e avendo grafici di accelerazione dell'età epigenetica simili a quelli con un peso normale, si è deciso di inserirli nella categoria dei "bambini con peso normale" nel corso dell'analisi.

### **2.5 Raccolta di dati sulle covariate**

Le covariate sono variabili che vengono considerate nell'analisi statistica per valutare l'effetto che possono avere sulla variabile di interesse che stiamo studiando. Sono quindi dei fattori o caratteristiche che potrebbero influenzare o spiegare le variazioni della variabile dipendente. Nel nostro caso, le covariate sono quelle variabili che possono andare ad influire sul peso alla nascita e conseguentemente sulla metilazione del DNA.

Le covariate analizzate nell'elaborato in analisi sono: i fattori di stress psicosociali materni, il fumo<sup>1</sup>, il consumo di alcol, la parità di gravidanza (donne primigravide o multigravide), metodo di parto (cesareo o vaginale), età materna, sesso infantile, l'età gestazionale e la distribuzione dei tipi di cellule immunitarie.

I membri locali del gruppo di ricerca hanno condotto interviste etnografiche in lingua locale per ricostruire il passato e la storia personale delle madri, in modo da ottenere informazioni sui fattori di stress psicosociali materni, in particolare il trauma di guerra e lo stress cronico. Il trauma di guerra era una somma non ponderata<sup>2</sup> di elementi come l'essere un rifugiato in passato o l'uccisione di alcuni membri della famiglia e forniva un risultato teorico da 0 a 5. Lo stress cronico era una somma non ponderata che teneva in considerazione esperienze quotidiane come abusi emotivi, mancanza di aiuto per le pulizie e matrimonio infelice e restituiva un risultato teorico da 0 a 16.

L'età gestazionale è un fattore chiave negli studi sul peso alla nascita ed è stata stimata utilizzando un orologio epigenetico che utilizza la metilazione del DNA in 176 siti CpG.

La distribuzione dei tipi di cellule immunitarie nel sangue è stata misurata e introdotta come covariata in quanto è strettamente legata all'invecchiamento epigenetico: la proporzione e l'abbondanza dei tipi di cellule cambiano nel tempo. Nello studio sono state stimate le seguenti cellule: linfociti T CD8<sup>+</sup> naïve, linfociti T CD4<sup>+</sup>, cellule NK, monociti e granulociti.

## 2.6 Analisi statistica

Per valutare l'accuratezza dell'orologio epigenetico nelle analisi sono stati utilizzati la differenza mediana assoluta (MAD) e il coefficiente di misure ripetute ( $r_{rm}$ ). La MAD è la mediana dei valori assoluti delle differenze tra età cronologica ed età epigenetica.  $r_{rm}$  è un coefficiente che permette di valutare la correlazione tra due variabili in un contesto di misure ripetute ed è un valore che va da -1 a +1. A differenza della regressione lineare viene violata l'assunzione di indipendenza delle osservazioni e viene valutata l'associazione intra-individuale tra due misure. Poiché  $r_{rm}$  tiene conto della non indipendenza ed è quindi in grado di sfruttare più punti di dati per partecipante, in genere produce una potenza statistica molto maggiore rispetto a una correlazione di Pearson standard che utilizza dati mediati<sup>7</sup>. È stato utilizzato un modello multilivello nullo per calcolare il coefficiente di correlazione intra-classe dell'accelerazione dell'età epigenetica. Tutte le analisi sono state completate in R ed è stato utilizzato un livello di significatività  $\alpha=0.05$  per tutti i test.

---

<sup>1</sup> Il fumo potrebbe essere una covariata ma nell'articolo in esame non è stata inclusa come tale perché nessuna donna ha dichiarato di aver fumato durante la gravidanza.

<sup>2</sup> Ogni elemento ha lo stesso peso.



### 3. Osservazioni e risultati

#### 3.1 Statistiche descrittive nei vari punti temporali

Nella Tabella 1 sono riportati i dati raccolti tramite misurazioni o interviste etnografiche riguardanti madri e bambini. Le variabili sono state analizzate in cinque punti temporali differenti: alla nascita, a 6 mesi, a 1, 2 e 3 anni. Il numero di coppie madri-bambino variava nei diversi intervalli temporali.

Variables	Birth (N = 64)	6 months (N = 8)	1 year (N = 35)	2 years (N = 32)	3 years (N = 16)
DNA methylation age					
Mean (SD)	0.29 (0.21)	1.24 (0.36)	2.12 (0.57)	3.43 (0.72)	5.17 (1.52)
Birthweight					
Mean (SD)	2890 (553)	2850 (546)	2920 (586)	2890 (588)	2910 (613)
Low birthweight					
<2500 g	17 (26.6%)	3 (37.5%)	10 (28.6%)	9 (28.1%)	4 (25.0%)
≥2500 g	47 (73.4%)	5 (62.5%)	25 (71.4%)	23 (71.9%)	12 (75.0%)
Sex					
Female	33 (51.6%)	6 (75.0%)	22 (62.9%)	21 (65.6%)	10 (62.5%)
Male	31 (48.4%)	2 (25.0%)	13 (37.1%)	11 (34.4%)	6 (37.5%)
Gestational age <sup>1</sup> (weeks)					
Mean (SD)	39.6 (1.45)	39.3 (1.37)	39.8 (1.16)	39.7 (1.21)	39.6 (1.16)
Missing	0 (0%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	0 (0%)
Maternal age					
Mean (SD)	17.2 (3.60)	18.6 (3.87)	18.5 (4.69)	18.3 (4.79)	18.5 (5.29)
Missing	3 (4.7%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	0 (0%)
Parity					
Primigravida	53 (82.8%)	6 (75.0%)	26 (74.3%)	24 (75.0%)	14 (87.5%)
Multigravida	8 (12.5%)	1 (12.5%)	7 (20.0%)	6 (18.8%)	2 (12.5%)
Missing	3 (4.7%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	0 (0%)
Delivery method					
Cesarean	19 (29.7%)	1 (12.5%)	10 (28.6%)	8 (25.0%)	5 (31.3%)
Vaginal	45 (70.3%)	7 (87.5%)	25 (71.4%)	24 (75.0%)	11 (68.8%)
Alcohol in pregnancy					
Alcohol	7 (10.9%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	1 (6.3%)
No alcohol	54 (84.4%)	6 (75.0%)	31 (88.6%)	28 (87.5%)	15 (93.8%)
Missing	3 (4.7%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	0 (0%)
Maternal BMI					
Mean (SD)	25.9 (2.83)	25.9 (2.41)	25.9 (3.09)	25.9 (3.10)	25.2 (3.19)
Missing	1 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
War trauma					
Mean (SD)	2.00 (1.07)	1.13 (0.991)	1.71 (0.987)	1.72 (0.958)	1.63 (0.885)
Chronic stress					
Mean (SD)	7.83 (3.15)	6.38 (3.38)	7.89 (3.38)	8.22 (3.41)	9.06 (3.09)

<sup>1</sup>Calculated using DNA methylation data and a gestational age epigenetic clock.  
SD: Standard deviation.

Tabella 1, Descriptive statistics across time points

Ai 67 individui di partenza sono state effettuate 155 osservazioni dell'età di metilazione del DNA nei diversi periodi temporali, con una media di 2.3 osservazioni per individuo. Il peso medio dei bambini alla nascita era di 2890 grammi e il 26.6% dei neonati era sottopeso. In media, l'età gestazionale dei bambini era di 39,6 settimane (a termine) mentre l'età delle madri variava da 17,2 a 18,6 anni. Per la maggior parte delle madri era la prima gravidanza e solo una piccola percentuale di loro ha riferito di aver consumato alcol durante la gravidanza. Il BMI materno medio variava tra 25.2 e 25.9 e il trauma di guerra medio da 1.63 a 2.00 (eccetto l'analisi a 6 mesi con un valore di 1.13). Lo stress cronico medio era piuttosto elevato e variava da 7.83 a 9.06.

### 3.2 Analisi dati ottenuti

In seguito ad una analisi di correlazione di misure ripetute è stato dimostrato che nei primi tre anni di vita l'età della metilazione del DNA è altamente correlata con l'età cronologica ( $r_{rm}=0.95$ ,  $p<2.2 \times 10^{-16}$ ) (Figura 1A).

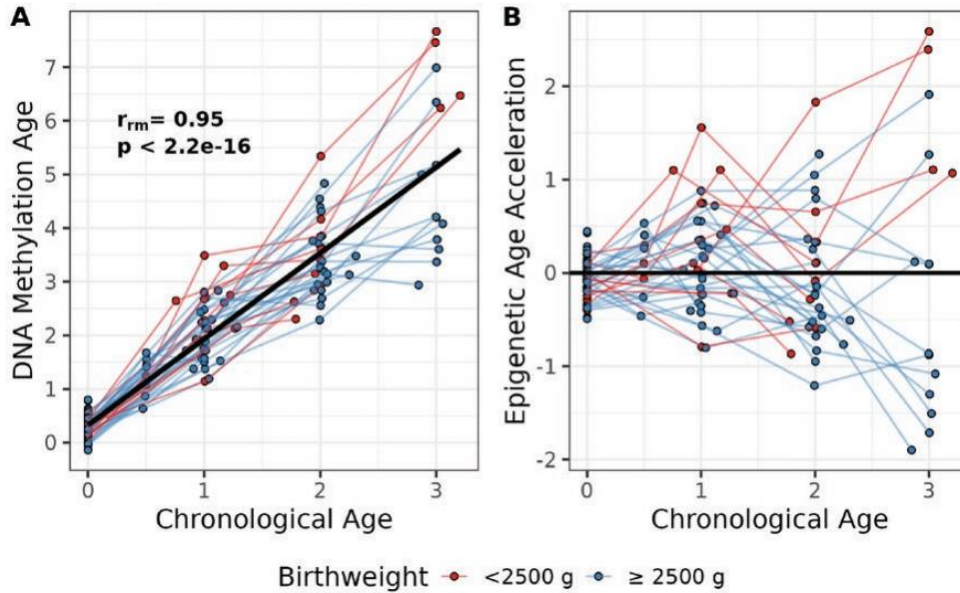


Figura 1, Spaghetti plot of DNA methylation age (A) and epigenetic age acceleration/deceleration (B) of each infant over the first 3 years of life ( $N_{individuals} = 67$ ,  $N_{observations} = 155$ )

La MAD tra l'età epigenetica e l'età cronologica è aumentata in tutti e cinque i punti temporali, variando da una differenza di 0.29 alla nascita ad una di 2.15 a tre anni d'età (Tabella 2).

Time Point	N	Mean DNAm Age (SD)	Median Absolute Difference
Birth	64	0.29 (0.21)	0.29
6 months	8	1.24 (0.36)	0.82
1 year	35	2.12 (0.57)	0.99
2 years	32	3.43 (0.72)	1.27
3 years	16	5.17 (1.52)	2.15

Tabella 2

La varianza nell'età di metilazione del DNA è aumentata significativamente tra tutti gli intervalli temporali tranne da uno a due anni di età dove l'aumento misurato non è significativo ( $p=0.25$ ) (Tabella 3).

Time Point 1	Variance 1	Time Point 2	Variance 2	$N_{individuals}$	$p$
Birth	0.03	One year	0.34	32	$5.4 \times 10^{-5}$
Birth	0.03	Two years	0.49	29	0.002
Birth	0.04	Three years	2.31	16	$1.1 \times 10^{-5}$
One year	0.33	Two years	0.53	31	0.25
One year	0.43	Three years	2.31	16	$4.2 \times 10^{-5}$
Two years	0.56	Three years	2.31	16	$5.7 \times 10^{-4}$

Tabella 3

L'aumento della varianza nelle stime dell'età epigenetica è diventato evidente quando si è tracciato il grafico dell'accelerazione dell'età epigenetica in funzione dell'età cronologica (Figura 1B). Nel seguente grafico, infatti, le stime della EAA sono strettamente raggruppate intorno allo zero alla nascita e la variazione di tale accelerazione emerge nel tempo.

Per determinare le fonti di variazione dell'età epigenetica che emerge nel tempo sono stati utilizzati dei modelli multilivello che hanno rivelato i seguenti risultati (riportati in Tabella 4).

Predictor	<i>b</i> [95% Confidence interval]
Age	0.30* [0.06, 0.54]
Birthweight ( $\geq 2500$ g)	0.02 [-0.22, 0.26]
Sex (male)	-0.03 [-0.21, 0.16]
Gestational age	0.02 [-0.06, 0.10]
Maternal age	0.00 [-0.03, 0.03]
Maternal BMI	0.00 [-0.04, 0.04]
Parity (multigravida)	-0.20 [-0.52, 0.13]
Delivery mode (vaginal)	-0.02 [-0.24, 0.19]
Alcohol (none)	0.19 [-0.10, 0.49]
Naïve CD8 <sup>+</sup> T	0.003** [0.001, 0.006]
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup>	0.02 [-0.02, 0.05]
Plasma blast	1.32** [0.44, 2.20]
CD4 <sup>+</sup> T	-0.79 [-3.23, 1.66]
Natural killer	1.67 [-1.74, 5.09]
Monocytes	-1.95 [-4.50, 0.61]
Granulocytes	-1.39* [-2.48, -0.30]
War trauma	-0.09 [-0.19, 0.02]
Chronic stress	0.02 [-0.02, 0.05]
Age $\times$ birthweight (dichotomized around 2500 g)	-0.39** [-0.64, -0.13]
<i>N</i> (observations)	141
<i>N</i> (individuals)	61
<i>R</i> <sup>2</sup> (fixed) <sup>1</sup>	0.24
<i>R</i> <sup>2</sup> (marginal) <sup>2</sup>	0.62

\*\**p* < 0.01; \**p* < 0.05.

<sup>1</sup>Fixed *R*<sup>2</sup> quantifies variance explained by fixed effects alone.

<sup>2</sup>Marginal *R*<sup>2</sup> quantifies variance explained by fixed and random effects combined.

Tabella 4, Multilevel model predicting epigenetic age acceleration using Horvath's pan-tissue clock

Non c'erano prove di un'associazione tra l'accelerazione dell'età epigenetica e il trauma di guerra ( $b = -0.09$ ,  $p = 0.10$ ) o lo stress cronico ( $b = 0.02$ ,  $p = 0.29$ ). Invece, la distribuzione di diversi tipi di cellule immunitarie era associata ad una accelerazione dell'età epigenetica. In particolare, le plasmacellule ( $b = 1.32$ ,  $p = 0.004$ ) e i linfociti T CD8<sup>+</sup> naïve ( $b = 0.003$ ,  $p = 0.006$ ) erano associati positivamente all'accelerazione dell'età epigenetica; mentre i granulociti erano associati negativamente all'accelerazione dell'età epigenetica ( $b = -1.39$ ,  $p = 0.01$ ). C'erano prove di una interazione significativa tra il peso alla nascita e l'età cronologica del bambino nella variazione dell'accelerazione dell'età epigenetica ( $b = -0.39$ ,  $p = 0.005$ ). Tale interazione è stata studiata tracciando un grafico dell'accelerazione dell'età epigenetica nel tempo con peso alla nascita dicotomizzato intorno a 2500g (Figura 2). Il risultato ottenuto è stato il seguente: i neonati con un basso peso alla nascita hanno mostrato una crescente accelerazione dell'età epigenetica nei primi tre anni di vita ( $b = 0.40$ ,  $p < 0.01$ ); mentre nei bambini con peso alla nascita  $\geq 2500$ g non è stata osservata alcuna evidenza di accelerazione (o decelerazione) dell'età epigenetica nei primi tre anni di vita ( $b = -0.06$ ,  $p = 0.49$ ) (Figura 2).

In media, un neonato con peso alla nascita <2500g aveva un'accelerazione dell'età epigenetica di 0,69 anni all'età cronologica di tre anni, ovvero l'età biologica era maggiore dell'età cronologica e la loro differenza dava un risultato di 0,69 anni. A differenza dei grafici precedenti, in cui i dati utilizzati sono quelli ricavati dalla popolazione in studio, quello sottostante è stato aggiustato per tutte le covariate. Significa che sono state rimosse tutte le influenze delle covariate in modo da riuscire a visualizzare esclusivamente l'influenza dell'interazione tra peso alla nascita e età sull'accelerazione dell'età epigenetica.

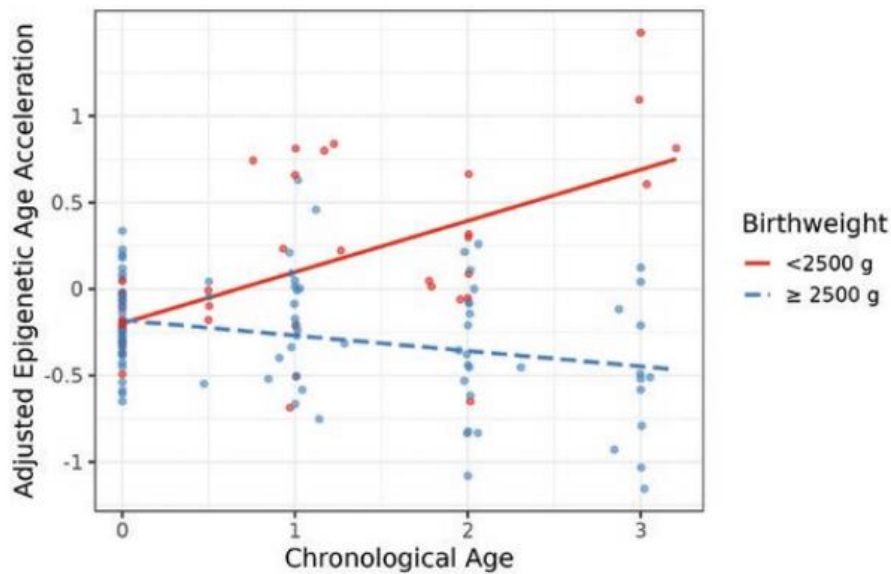


Figura 2, Low birthweight predicts epigenetic age acceleration ( $N_{\text{individuals}} = 61$ ,  $N_{\text{observations}} = 141$ ).

#### 4. Discussione e conclusioni

L'articolo in esame in questo elaborato di tesi è uno studio recente che ha deciso di esplorare un ambito di ricerca sconosciuto fino ad ora: l'accelerazione dell'età epigenetica nei primi 3 anni di vita (prima infanzia). Infatti, la gran parte degli studi sull'accelerazione dell'età epigenetica nei bambini si concentra sulla media/tarda infanzia o sull'adolescenza. Inoltre, è stata studiata una popolazione africana, sottorappresentata in studi riguardanti tale argomento. Lo studio si pone come obiettivo la dimostrazione di un'associazione tra il basso peso alla nascita e l'accelerazione dell'età epigenetica nei primi tre anni d'età.

I risultati ottenuti rivelano che il basso peso alla nascita potrebbe essere associato all'invecchiamento biologico attraverso dei percorsi epigenetici: il basso peso sarebbe quindi il responsabile di un'accelerazione dell'età epigenetica e conseguentemente di un invecchiamento biologico più rapido. Per lo stesso motivo un peso <2500g può essere associato ad un aumento della morbilità e della mortalità nella vita adulta.

È stata trovata una forte correlazione tra età cronologica ed età epigenetica nei bambini studiati. Quest'ultima era già stata osservata in uno studio trasversale che aveva preso in considerazione bambini e adolescenti della RDC con un'età compresa tra 2 e 17 anni<sup>8</sup> e in un'ulteriore indagine riguardante individui adulti in altre popolazioni africane. Questi dati suggeriscono che l'orologio epigenetico di Horvath può essere utilizzato per stimare l'età epigenetica in individui di età e provenienze diverse ed è accurato anche nelle popolazioni sottorappresentate nel set di dati di addestramento originario utilizzato per costruirlo.

L'accelerazione dell'età epigenetica è emersa gradualmente nei primi tre anni di vita: alla nascita si aveva la più bassa variazione dell'età epigenetica mentre a tre anni la più elevata. Lo studio in analisi dimostra per la prima volta che l'aumento dell'età dei bambini (CA) è associato a un aumento della EAA anche nella prima infanzia (0-3 anni); tale risultato è stato ottenuto anche in studi precedenti in bambini più grandi e adolescenti<sup>9</sup>.

La prima infanzia è un momento fondamentale per acquisire il pattern di metilazione iniziale che determinerà la traiettoria dell'invecchiamento. Infatti, i profili dell'età epigenetica e la EAA sono dinamici nei primi anni di vita, ma diventano sempre più stabili con l'avvicinarsi dell'età adulta. Tale modello suggerisce che le correlazioni dell'accelerazione dell'età epigenetica tra punti temporali diversi cambiano nel corso della vita: sono basse tra momenti temporali nella prima infanzia, più forti tra l'infanzia e l'adolescenza e ancora più forti all'interno dell'età adulta. Ad esempio, in uno studio precedente<sup>10</sup>, è stata riportata una correlazione della EAA tra la nascita e l'infanzia di  $r=0.109$  e tra l'infanzia e l'adolescenza di  $r=0.260$ . La correlazione all'interno dell'età adulta era ancora maggiore, indicando che le traiettorie dell'invecchiamento epigenetico possono essere dinamicamente sensibili ai fattori ambientali nei primi anni di vita e diventare meno suscettibili nell'età adulta. L'influenza dell'ambiente di sviluppo si è rivelata fondamentale nel plasmare la traiettoria dell'accelerazione dell'età

epigenetica ed è stato dimostrato che l'invecchiamento epigenetico non è ereditabile. Uno studio sui gemelli, infatti, ha permesso di scoprire che l'età epigenetica non era correlata all'interno delle famiglie all'inizio della convivenza, ma quest'ultima iniziava ad esserlo dopo un maggior tempo trascorso a vivere insieme a causa della presenza di fattori ambientali condivisi<sup>11</sup>. Le correlazioni della DNAmAge tra coppie di gemelli variavano da -0.12 a 0.18 alla nascita (molto vicine allo 0) e aumentavano in modo significativo con il tempo trascorso insieme<sup>11</sup>.

Lo studio in esame ha permesso di individuare due predittori significativi dell'accelerazione dell'età epigenetica nella prima infanzia: la diversa distribuzione di vari tipi di cellule immunitarie e l'interazione tra basso peso alla nascita ed età del bambino.

Il basso peso alla nascita è quindi associato ad un invecchiamento epigenetico accelerato che, a sua volta, è legato ad uno sviluppo più rapido nell'individuo. Diversi studi hanno dimostrato che un peso alla nascita <2500g era associato ad uno sviluppo puberale più rapido nei bambini e ad una maggior altezza all'età di 7 anni. Il basso peso alla nascita può riflettere segnali ambientali che indicano una limitazione delle risorse energetiche, a cui il feto risponde attraverso un processo di adattamento che si traduce in uno sviluppo più rapido, favorito da una accelerazione dell'età epigenetica. Tale accelerazione viene quindi interpretata, in questo modello di studio, come un indicatore di adattamento ai segnali ambientali della prima infanzia, come la privazione di nutrienti.

In conclusione, i risultati ottenuti dall'articolo analizzato suggeriscono come le prime esperienze di vita, come il basso peso alla nascita, possano modellare la traiettoria dell'accelerazione dell'età epigenetica nella prima infanzia. Inoltre, è stato dimostrato che l'invecchiamento epigenetico accelerato è una "via di collegamento" tra il basso peso alla nascita e la scarsa salute negli adulti.

## Bibliografia

1. Ferrara N, Corbi G, Scarpa D, et al. Teorie dell'invecchiamento. *G GERONTOL.* 2005;53:57-74.
2. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014;69 Suppl 1:S4-9. doi:10.1093/gerona/glu057
3. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(10):576-590. doi:10.1038/s41574-018-0059-4
4. Wang K, Liu H, Hu Q, et al. Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):374. doi:10.1038/s41392-022-01211-8
5. Galkin F, Mamoshina P, Aliper A, De Magalhães JP, Gladyshev VN, Zhavoronkov A. Biohorology and biomarkers of aging: Current state-of-the-art, challenges and opportunities. *Ageing Res Rev.* 2020;60:101050. doi:10.1016/j.arr.2020.101050
6. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115
7. Bakdash JZ, Marusich LR. Repeated Measures Correlation. *Front Psychol.* 2017;8:456. doi:10.3389/fpsyg.2017.00456
8. Gettler LT, Lin DTS, Miegakanda V, et al. Epigenetic aging in children from a small-scale farming society in The Congo Basin: Associations with child growth and family conflict. *Dev Psychobiol.* 2020;62(2):138-153. doi:10.1002/dev.21935
9. Simpkin AJ, Howe LD, Tilling K, et al. The epigenetic clock and physical development during childhood and adolescence: longitudinal analysis from a UK birth cohort. *Int J Epidemiol.* 2017;46(2):549-558. doi:10.1093/ije/dyw307
10. Simpkin AJ, Hemani G, Suderman M, et al. Prenatal and early life influences on epigenetic age in children: a study of mother-offspring pairs from two cohort studies. *Hum Mol Genet.* 2016;25(1):191-201. doi:10.1093/hmg/ddv456
11. Li S, Nguyen TL, Wong EM, et al. Genetic and environmental causes of variation in epigenetic aging across the lifespan. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):158. doi:10.1186/s13148-020-00950-1






## **Appendice**

Quinn EB, Hsiao CJ, Maisha FM, Mulligan CJ. Low birthweight is associated with epigenetic age acceleration in the first 3 years of life. *Evol Med Public Health*. 2023 Jun 30;11(1):251-261. doi: 10.1093/emph/eoad019. PMID: 37485054; PMCID: PMC10360162.



# Low birthweight is associated with epigenetic age acceleration in the first 3 years of life

Edward B. Quinn<sup>1,2, </sup> Chu J. Hsiao<sup>1,2,3</sup> Felicien M. Maisha<sup>1,2,4,5</sup> and Connie J. Mulligan<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Anthropology, University of Florida, Gainesville, FL 32608, USA; <sup>2</sup>Genetics Institute, University of Florida, Gainesville, FL 32608, USA; <sup>3</sup>College of Medicine, University of Florida, Gainesville, FL 32608, USA; <sup>4</sup>HEAL Africa Hospital, Goma, Democratic Republic of Congo; and <sup>5</sup>Maisha Institute, Goma, Democratic Republic of Congo  
\*Corresponding author. Department of Anthropology, University of Florida, 2033 Mowry Road, PO Box 103610, Gainesville, FL 32610-3610, USA. Tel: 352-273-8092; E-mail: [cmulligan@ufl.edu](mailto:cmulligan@ufl.edu)

Received 17 February 2023; revised version accepted 8 May 2023.

## ABSTRACT

**Background and objectives:** The Developmental Origins of Health and Disease hypothesis posits that early life adversity is associated with poor adult health outcomes. Epidemiological evidence has supported this framework by linking low birthweight with adult health and mortality, but the mechanisms remain unclear. Accelerated epigenetic aging may be a pathway to connect early life experiences with adult health outcomes, based on associations of accelerated epigenetic aging with increased morbidity and mortality.

**Methodology:** Sixty-seven mother-infant dyads were recruited in the eastern Democratic Republic of Congo. Birthweight data were collected at birth, and blood samples were collected at birth and follow-up visits up to age 3. DNA methylation data were generated with the Illumina MethylationEPIC array and used to estimate epigenetic age. A multilevel model was used to test for associations between birthweight and epigenetic age acceleration.

**Results:** Chronological age was highly correlated with epigenetic age from birth to age 3 ( $r = 0.95$ ,  $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ). Variation in epigenetic age acceleration increased over time. Birthweight, dichotomized around 2500 g, predicted epigenetic age acceleration over the first 3 years of life ( $b = -0.39$ ,  $p = 0.005$ ).

**Conclusions and implications:** Our longitudinal analysis provides the first evidence for accelerated epigenetic aging that emerges between birth and age 3 and associates with low birthweight. These results suggest that early life experiences, such as low birthweight, may shape the trajectory of epigenetic aging in early childhood. Furthermore, accelerated epigenetic aging may be a pathway that links low birthweight and poor adult health outcomes.

**Lay summary** Low birthweight is associated with poor adult health outcomes, but the mechanism is unclear. We tested for a relationship between low birthweight and accelerated aging based on DNA methylation. Low birthweight predicted accelerated aging among infants, suggesting potential connections between birthweight, accelerated aging and adult health.

**KEYWORDS:** aging; birthweight; developmental origins of health and disease; DNA methylation; early life adversity; epigenetic aging

## INTRODUCTION

The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis posits that early life experiences are associated with adult health [1]. DOHaD developed as a result of epidemiological studies that linked early life exposures, such as low birthweight, with death from coronary heart disease [2]. These early studies, and many others since, have determined that birthweight reliably predicts risk factors for chronic disease and mortality in adults [3–6]. In particular, low birthweight (<2500 g) strongly predicts all-cause mortality [7]. The damaging effects of low birthweight, indicative of exposure to *in utero* undernutrition or other stress, maybe an early determining event for later life health. However, recent evidence suggests that birthweight itself may not be causally related to adult outcomes [6, 8]. Instead, low birthweight may be correlated with prenatal shifts in physiology that are the ultimate causes of birthweight-associated increases in adult risk of death and disease [9].

Birthweight is a complex phenotype with many sources of variation, including genetic variants [10], maternal depression [11], exposure to violence [12], as well as parity, infant sex, maternal alcohol use and maternal smoking [13]. Low birthweight may be understood in terms of two models of developmental plasticity [14]. A ‘constraints’ model explains low birthweight as a result of limitations in resources for growth and development. A ‘predictive adaptive response’ model, on the other hand, explains low birthweight as a response to signals that represent future environmental conditions, such as high extrinsic mortality risk. In either case, early life signals of adversity are predicted to associate with low birthweight and other alterations in fetal physiology [9]. Low birthweight, as a biomarker for broader shifts in fetal physiology, may then predict a life history schedule characterized by accelerated development. This acceleration in development may enhance reproductive success by shortening time to sexual maturation, but may come at the cost of increased risk for chronic disease in adulthood [15]. Accelerated aging may thus link early life adversity with later life risk of morbidity and mortality.

Biological pathways linking early life experiences with adult health are thought to act in part through epigenetic pathways [1]. Epigenetics refers to modifications to DNA that do not alter the nucleotide sequence but do alter the expression of DNA. The most studied form of epigenetic modification is DNA methylation, which refers to the addition of a methyl group to a cytosine nucleotide in a cytosine-guanine context. Increasingly, researchers are using epigenetic clocks to measure biological aging using DNA methylation data [16]. These clocks estimate biological age using DNA methylation sites in the genome that are known to be associated with age [17]. These epigenetic measures of biological

age show unprecedented correlations with chronological age [18, 19].

More importantly, the difference between epigenetic age and chronological age, termed epigenetic age acceleration (or deceleration), has been shown to predict the timing of puberty [20, 21], risk of chronic disease [22] and mortality [22, 23]. The association of epigenetic age acceleration with negative health outcomes is well established in adults [22], but it is unclear if age acceleration in childhood also represents a risk factor for child and adult health [24, 25]. The literature is limited but several studies report associations between epigenetic age acceleration and negative health outcomes in late childhood and early adolescence such as alterations in brain structure [26, 27], depressive symptoms [28] and internalizing problems [21]. More studies are needed to determine if epigenetic age acceleration links early life experiences such as low birthweight and altered health outcomes in adulthood.

Longitudinal studies in children using an epigenetic clock developed by Horvath [18] have shown that epigenetic age acceleration emerges over time [29–31]. Epigenetic age acceleration is dynamic in early life, but becomes increasingly stable as children approach adulthood. Such a pattern would predict low correlations of epigenetic age acceleration between time points in early childhood, somewhat stronger correlations between childhood and adolescence, and the strongest correlations between time points within adulthood. This pattern in correlations of age acceleration within individuals has been previously reported. For example, Simpkin *et al.* [32] reported a correlation of age acceleration between birth and childhood of  $r = 0.109$  and between childhood and adolescence of  $r = 0.260$ . Even stronger correlations of age acceleration across time points within adulthood have been reported [32, 33], suggesting that trajectories of epigenetic aging may be dynamically responsive to environmental conditions in early life and less responsive in adulthood. In addition, environmental influences appear to be a major contributor to epigenetic aging profiles in the largest twin study to date as no evidence for heritability of epigenetic aging was identified [34]. An early dynamism and low heritability of epigenetic aging suggest that the epigenetic aging trajectory may be environmentally sensitive and possibly developmentally tuned [35, 36].

In light of these findings, birthweight (used as a biomarker for prenatal exposures and a potentially damaging phenotype on its own) may be associated with epigenetic aging. However, few studies have focused on an association between birthweight and epigenetic aging in childhood. The most comparable study to ours is a longitudinal study of early life influences on epigenetic age acceleration that analyzed DNA from blood samples.

Simpkin *et al.* [32], found that birthweight was positively associated with epigenetic age acceleration at age 7, but negatively associated at age 17. In longitudinal analyses, no association was found between birthweight and epigenetic age acceleration. Additional work is needed to clarify associations between birthweight and epigenetic age acceleration, especially in early childhood.

The majority of studies on epigenetic age acceleration in children focus on middle to late childhood and adolescence; in other words, longitudinal studies in early childhood are lacking. Furthermore, children from Africa are underrepresented in studies of early life epigenetic age acceleration, which limits the genetic background and range of environmental exposures that can be investigated [37]. In this paper, we report results from a longitudinal study of epigenetic age acceleration from birth to age 3 among children born in the eastern Democratic Republic of Congo (DRC). Thus, our study addresses both of these knowledge gaps. Using low birthweight as a biomarker of adverse prenatal exposures and a potentially damaging phenotype on its own, we hypothesize that low birthweight is associated with accelerated epigenetic aging in the first 3 years of life.

## METHODOLOGY

### Study sample and recruitment

Data from this study come from an ongoing collaboration between the University of Florida (UF) and HEAL Africa Hospital in Goma, DRC that started in 2009. The eastern DRC has a history of violent conflict and high rates of sexual violence [38, 39]. Sixty-seven mother-infant dyads were recruited in the sexual violence unit of the maternity ward at HEAL Africa Hospital. Due to missing data, different analyses had different sample sizes ranging from 61 to 67 infants. Recruitment took place between July 2015 and April 2017. Follow-up visits continued until May 2019. For follow-up visits, mothers were sent reminders to bring their babies to the hospital at approximately 6 months, 1 year, 2 years and 3 years of age.

The study was approved by the Western Institutional Review Board, Olympia, WA ([www.wirb.com](http://www.wirb.com), WIRB Project #20100993), the UF IRB (Project # IRB202001503), the University of Goma and an ethical review committee at HEAL Africa Hospital. Administrators, doctors and laboratory personnel at HEAL Africa Hospital consulted on the study and gave feedback throughout the period of the study. Women were first recruited when they arrived at HEAL Africa Hospital for delivery, although many women already knew of the study through other participating mothers. Before explaining the study, women were given the choice to move to a private setting or remain in the maternity ward—most women chose to remain in the maternity ward

where they felt comfortable with other mothers. The informed consent document and all discussions about the study were conducted in Congolese Swahili, which was the primary language. Women were given the opportunity to ask questions and it was explained that their participation in the study was voluntary and they could withdraw at any time even if they initially gave consent. Once women gave consent, ethnographic interviews and validated surveys were given to the mothers, and blood samples were taken from mothers and babies within 1 day of delivery. Blood samples were also collected from babies at follow-up visits.

### Generation of DNA methylation data

DNA was extracted at the UF from whole blood collected through venipuncture. QIAmp DNA Blood Mini Kits (Qiagen) were used to extract DNA; steps 1–7 were performed at HEAL Africa Hospital to stabilize the DNA sample and kill all infectious agents prior to shipment to UF. Samples with low quantity and/or quality DNA were cleaned and concentrated following a published protocol [40]. Two hundred fifty grams of DNA were shipped to the Hussman Institute for Human Genomics, University of Miami for bisulfite conversion, hybridization to the Infinium MethylationEPIC Beadchip (Illumina), and methylation typing. Samples were randomly placed across Beadchips. At UF, raw.idat files were read into R [41] and noob background corrected [42] using the *SeSAMe* package [43]. Quality control of DNA methylation data, including sex checks, was performed with *meffil* [44]. Technical replicates were averaged. After removing a single DNA methylation age outlier (confirmed with a Grubbs test,  $p = 4.3 \times 10^{-9}$ ), samples that failed quality control checks, and averaging replicates, 155 DNA methylation samples from 67 unique individuals were available for analysis. A custom R script to check genotype data from 59 probes on the EPIC array was used to verify that longitudinal data from baseline and follow-up samples corresponded to the same unique individual.

### Estimation of epigenetic age

Many different epigenetic clocks exist to quantify epigenetic age [16]. We used Horvath's pan-tissue clock because it was trained on samples from people with a wide range of ages (0–100 years old), including samples at birth [18]. Horvath's clock uses methylation at 353 CpG sites to calculate epigenetic age and has been shown to be particularly accurate in children [18]. Epigenetic age acceleration is calculated as the residual of a regression of epigenetic age on chronological age. The Horvath clock and accompanying documentation are freely available at <https://dnamage.genetics.ucla.edu/home>. DNA methylation age estimates were obtained using the advanced analysis option, which

also estimated immune cell type proportions using previously published methods [18, 45].

### Measurement of birthweight

Birthweight was measured twice and averaged. The World Health Organization (WHO) criterion of low birthweight was used to dichotomize birthweight into <2500 g and  $\geq$ 2500 g categories [46]. Two babies were high birthweight according to the WHO criterion of 4000 g (i.e. 4040 and 4080 g), which was too few individuals to create a high birthweight category so they were combined with the normal birthweight babies since their epigenetic age acceleration plots were similar. A sensitivity analysis of birthweight as a continuous variable is presented in [Supplementary Materials](#).

### Collection of covariate data

Local members of the research team conducted semi-structured interviews with mothers in the Congolese dialect of Swahili. The interview was designed to construct a personal history and to elicit information about maternal psychosocial stressors because pilot studies had demonstrated the importance of these factors for birthweight and DNA methylation [47, 48]. Data on behaviors known to affect perinatal outcomes, such as smoking and alcohol consumption, were also collected during the interview. Interviews were conducted within 1 day of delivery.

The two maternal psychosocial stress measures used in this study, war trauma and chronic stress, have been previously described [47]. Briefly, ethnographic interview methods [49] were used to elicit salient stressors for women living in this community. War trauma captured experiences related to violence associated with living in a zone of conflict and was an unweighted sum of items such as being a refugee in the past and having family members killed (theoretical range = 0–5). Chronic stress captured day-to-day experiences such as emotional abuse, a lack of help cleaning, and unhappy marriage and was an unweighted sum (theoretical range = 0–16). Factor analyses were used to construct these scales, and both showed good internal consistency [47]. In the cohort from which our sample is drawn from, war trauma had a Cronbach's  $\alpha = 0.55$  and chronic stress had a Cronbach's  $\alpha = 0.75$ .

Anthropometric data were collected during interviews. Parity was dichotomized to distinguish primigravida and multigravida women. Delivery method (i.e. vaginal or cesarean section) was recorded. Maternal age and infant sex were also used as covariates in analyses. Smoking cigarettes was not included as a covariate because no mothers reported smoking during pregnancy.

Gestational age is a key confounder in studies of birthweight, but is difficult to assess in low-resource settings. A recently

published method used DNA methylation data to construct a gestational age epigenetic clock for newborns [50]. This gestational age epigenetic clock uses DNA methylation at 176 CpG sites to estimate gestational age, with a median absolute deviation of 3.7 days [50] and has been validated in assisted reproductive settings with known embryo transfer dates. This gestational age epigenetic clock was used to estimate gestational ages for all infants included in our study.

Immune cell type distributions in blood change with time and are thus associated with age [51]. Importantly, epigenetic age acceleration has been associated with the distribution of immune cell types [33]. These findings suggest that controlling for immune cell types is critical in studies of epigenetic aging. Immune cell type abundances and proportions were estimated as previously described [18, 45] and included in the multilevel model as covariates. Specifically, estimates of naïve CD8<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>, plasma blasts, CD4<sup>+</sup> T cells, natural killer cells, monocytes and granulocytes were included in the models.

### Statistical analyses

Two measures were used to assess the accuracy of the epigenetic clock in the analyses: the median absolute difference (MAD) and repeated measures correlation coefficient [52]. The MAD refers to the median of the absolute values of the differences between chronological age and epigenetic age. A modified Pitman's test [53] was used to formally assess differences in the variance of DNA methylation age at different timepoints. This is a paired test so only two timepoints were compared at a time. Sample sizes are indicated for each analysis. Bias resulting from attrition was probed by testing for differences in covariates between those who had no follow-up data compared to those with at least one follow-up visit. These two groups were compared using *t*-tests for continuous variables and chi-square tests for categorical variables.

Repeated measurements require specific statistical methods to account for the lack of independence of measures from the same person. Multilevel models that nest observations within participants represent a robust method that accounts for correlated outcomes. In addition, multilevel models are robust to bias resulting from missing data [54]. A null multilevel model was fit to calculate the intraclass correlation coefficient of epigenetic age acceleration, which was used to guide the modeling strategy. The intraclass correlation coefficient was 0.79, meaning that on average the correlation between any two observations of epigenetic age acceleration within an individual was 0.79. This result suggested substantial correlation within individuals in outcome (epigenetic age acceleration), clearly indicating a need for multilevel modeling.

A multilevel model with a fixed intercept and random slope was adjusted for the covariates described above: war trauma, chronic stress, maternal body mass index (BMI), maternal age, parity, alcohol use in pregnancy, delivery method, gestational age, infant sex and cell type distribution. All analyses were completed in R [41] and  $\alpha = 0.05$  was used for all tests.

## RESULTS

Characteristics of mothers and infants across five time points (birth, 6 months, 1, 2 and 3 years) are reported (Table 1). Sixty-seven individuals had a total of 155 observations of DNA methylation age (average of 2.3 observations/individual). Average birthweight was 2890 g (standard deviation = 553 g). More than 25% ( $n = 17$ ) of the infants weighed less than 2500 g at birth, that is they were low birthweight. Fifty-two percent of the infants represented at birth were female and there was a majority of female infants at all follow-up visits. On average, the gestational age of infants represented at birth was full term (39.6 weeks) and remained constant in follow-up visits. Average maternal age ranged from 17.2 to 18.6 years for infants represented at birth and all follow-up visits. First-time pregnancy (i.e. primigravida) and vaginal delivery were reported for a majority of mothers. Only a small proportion of mothers reported using alcohol during pregnancy (10.9%,  $n = 7$ ). Maternal BMI varied between 25.2 and 25.9 for infants represented at birth and all follow-up visits. With the exception of the 6-month follow-up visit that only had eight infants, mean war trauma ranged from 1.63 to 2.00 and mean chronic stress ranged from 7.83 to 9.06, indicating fairly high levels of chronic stress. A comparison of infants with and without follow-up data found no differences in all variables (all  $p > 0.05$ ).

DNA methylation age was highly correlated with chronological age in a repeated measures correlation analysis ( $r_m = 0.95$ ,  $p < 2.2e-16$ ; Fig. 1A). The MAD between DNA methylation age and chronological age became larger across all five-time points (Supplementary Table 1), ranging from a difference of 0.29 years at birth to a difference of 2.15 years at 3 years of age. Variance in DNA methylation age increased significantly between all time periods except from 1 to 2 years of age (Supplementary Table 2).

The increasing variance in DNA methylation age estimates became evident when estimates of epigenetic age acceleration were plotted (Fig. 1B). Estimates of epigenetic age acceleration were tightly clustered around zero at birth and variation in epigenetic age acceleration emerged over time. We found no evidence for differences in epigenetic age acceleration by birthweight ( $p = 0.73$ ) or by sex ( $p = 0.21$ ) at birth.

Multilevel models were used to determine the source(s) of variation in epigenetic age acceleration that emerged over time. There was no evidence for an association between epigenetic

age acceleration and war trauma ( $b = -0.09$ ,  $p = 0.10$ ) or chronic stress ( $b = 0.02$ ,  $p = 0.29$ ) (Table 2). Several immune cell types predicted epigenetic age acceleration (Table 2). Plasma blasts ( $b = 1.32$ ,  $p = 0.004$ ) and naïve CD8<sup>+</sup> T cells ( $b = 0.003$ ,  $p = 0.006$ ) were positively associated with epigenetic age acceleration and granulocytes were negatively associated with epigenetic age acceleration ( $b = -1.39$ ,  $p = 0.01$ ). When cell type correction was removed and three other epigenetic clocks were tested, the significance of infant age disappeared with two of the clocks, and maternal age and delivery mode became significant with two clocks (Supplementary Table 4).

There was also evidence for a highly significant interaction between birthweight (dichotomized around 2500 g) and age that predicted variation in epigenetic age acceleration ( $b = -0.39$ ,  $p = 0.005$ ). When birthweight was analyzed as a continuous variable, the interaction effect remained significant ( $b = -0.28$ ,  $p = 0.01$ ; Supplementary Table 3). The interaction between birthweight and age was investigated further by plotting epigenetic age acceleration over time with birthweight dichotomized around 2500 g (Fig. 2). Low birthweight infants showed increasing epigenetic age acceleration in the first 3 years of life ( $b = 0.40$ ,  $p < 0.01$ ). On average, a low birthweight infant was age accelerated by 0.69 years at chronological age 3. There was no evidence for epigenetic age acceleration among infants with birthweights  $\geq 2500$  g ( $b = -0.06$ ,  $p = 0.49$ ).

## DISCUSSION

Early life adversity is known to impact adult health through increased risk of disease, increased mortality, and poor mental and physical health [55, 56]. Low birthweight is an example of early life adversity and is associated with increased morbidity and mortality decades later (i.e. in adulthood). The mechanism for associations between low birthweight and adult health is unclear, but our study suggests that accelerated epigenetic aging may serve as a link between low birthweight and adult health. An epigenetic signature of early life adversity and low birthweight may have evolved as a way to retain important information about the early life environment as an adaptive (or maladaptive) mechanism.

Here, we test low birthweight for associations with epigenetic age acceleration. To the best of our knowledge, this is the first longitudinal study to identify a link between low birthweight and epigenetic age acceleration between birth and age 3 (Fig. 2). Our findings suggest there may be an epigenetic link between low birthweight and biological aging.

We observed a high correlation between chronological age and epigenetic age in children from the eastern DRC (Fig. 1A). High correlations between chronological age and epigenetic age have been reported among children and adolescents in a


**Table 1.** Descriptive statistics across time points

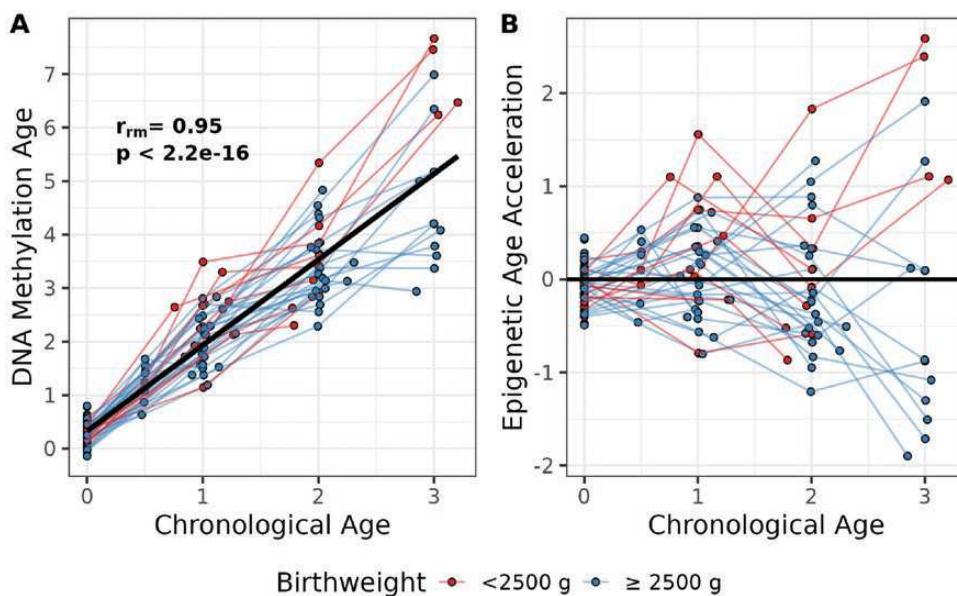
Variables	Birth (N = 64)	6 months (N = 8)	1 year (N = 35)	2 years (N = 32)	3 years (N = 16)
DNA methylation age					
Mean (SD)	0.29 (0.21)	1.24 (0.36)	2.12 (0.57)	3.43 (0.72)	5.17 (1.52)
Birthweight					
Mean (SD)	2890 (553)	2850 (546)	2920 (586)	2890 (588)	2910 (613)
Low birthweight					
<2500 g	17 (26.6%)	3 (37.5%)	10 (28.6%)	9 (28.1%)	4 (25.0%)
≥2500 g	47 (73.4%)	5 (62.5%)	25 (71.4%)	23 (71.9%)	12 (75.0%)
Sex					
Female	33 (51.6%)	6 (75.0%)	22 (62.9%)	21 (65.6%)	10 (62.5%)
Male	31 (48.4%)	2 (25.0%)	13 (37.1%)	11 (34.4%)	6 (37.5%)
Gestational age <sup>1</sup> (weeks)					
Mean (SD)	39.6 (1.45)	39.3 (1.37)	39.8 (1.16)	39.7 (1.21)	39.6 (1.16)
Missing	0 (0%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	0 (0%)
Maternal age					
Mean (SD)	17.2 (3.60)	18.6 (3.87)	18.5 (4.69)	18.3 (4.79)	18.5 (5.29)
Missing	3 (4.7%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	0 (0%)
Parity					
Primigravida	53 (82.8%)	6 (75.0%)	26 (74.3%)	24 (75.0%)	14 (87.5%)
Multigravida	8 (12.5%)	1 (12.5%)	7 (20.0%)	6 (18.8%)	2 (12.5%)
Missing	3 (4.7%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	0 (0%)
Delivery method					
Cesarean	19 (29.7%)	1 (12.5%)	10 (28.6%)	8 (25.0%)	5 (31.3%)
Vaginal	45 (70.3%)	7 (87.5%)	25 (71.4%)	24 (75.0%)	11 (68.8%)
Alcohol in pregnancy					
Alcohol	7 (10.9%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	1 (6.3%)
No alcohol	54 (84.4%)	6 (75.0%)	31 (88.6%)	28 (87.5%)	15 (93.8%)
Missing	3 (4.7%)	1 (12.5%)	2 (5.7%)	2 (6.3%)	0 (0%)
Maternal BMI					
Mean (SD)	25.9 (2.83)	25.9 (2.41)	25.9 (3.09)	25.9 (3.10)	25.2 (3.19)
Missing	1 (1.6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
War trauma					
Mean (SD)	2.00 (1.07)	1.13 (0.991)	1.71 (0.987)	1.72 (0.958)	1.63 (0.885)
Chronic stress					
Mean (SD)	7.83 (3.15)	6.38 (3.38)	7.89 (3.38)	8.22 (3.41)	9.06 (3.09)

<sup>1</sup>Calculated using DNA methylation data and a gestational age epigenetic clock.

SD: Standard deviation.

cross-sectional study with an age range of 2–17 in the Republic of Congo [57] and among adults in other African populations [58, 59]. These data suggest that Horvath's epigenetic clock is accurate in populations that were underrepresented in the original training data set used to construct the epigenetic clock [18], providing evidence for the transportability and validity of Horvath's epigenetic clock [17].

In our study, epigenetic age acceleration gradually emerged over the first 3 years of life. The lowest amount of variation in epigenetic age was observed at birth, and the highest amount of variation was observed at 3 years, the oldest time point in this study (Fig. 1B and Supplementary Table 2). This pattern of findings, where increasing age in children corresponds to increasing variation in epigenetic age, has been previously reported in



**Figure 1.** Spaghetti plot of DNA methylation age (A) and epigenetic age acceleration (B) of each infant over the first 3 years of life ( $N_{\text{individuals}} = 67$ ,  $N_{\text{observations}} = 155$ ). Panel A plots DNA methylation age and chronological age. A repeated measures correlation analysis revealed a high correlation between DNA methylation age and chronological age ( $r_{\text{rm}} = 0.95$ ,  $p < 2.2e-16$ ). Panel B plots epigenetic age acceleration (and deceleration), which is the residual from a regression of DNA methylation age on chronological age. There is an increasing variance in epigenetic age acceleration over time. Red color corresponds to birthweight  $< 2500$  g and blue color corresponds to birthweight  $\geq 2500$  g

older children and adolescents [29–31]. Our study extends this pattern to the time between birth and age 3 for the first time. Given evidence that profiles of epigenetic age become more stable as adolescents approach adulthood [32], and throughout adulthood [33], early childhood may be a critically important time to capture the initial programming of the aging trajectory. The importance of the developmental milieu in shaping the trajectory of epigenetic age acceleration is indicated by null findings for heritability of epigenetic age in the largest twin study to date [34]. Remarkably, the twin study found that epigenetic age was not correlated within families at the start of cohabitation, but became correlated within families with greater time spent living together [34].

Our study sheds new light on predictors of the trajectory of epigenetic age acceleration in early childhood. Specifically, several immune cell types and an interaction between low birthweight and age were significant predictors of epigenetic age acceleration (Table 2). Birthweight  $\geq 2500$  g was not associated with epigenetic age acceleration or deceleration (Fig. 2). Recent studies suggest that accelerated epigenetic aging is associated with a greater risk of chronic disease and mortality [22, 23]. Consistent with low birthweight as a predictor of accelerated epigenetic aging is the strong association between low birthweight and mortality [7].

These data support a model where low birthweight is associated with accelerated epigenetic aging, which in turn is associated with a faster life history schedule and increased mortality.

There is support for such a model in the literature on epigenetic aging in children. For example, several studies have found that accelerated epigenetic aging in childhood predicted faster pubertal development [20, 21]. Simpkin *et al.* [29] found conflicting evidence within their study for an association between accelerated epigenetic aging and pubertal development, but they did find associations with higher fat mass at birth and greater height at age 7. Associations between greater height and epigenetic age acceleration in children have been replicated across different populations [21, 29, 57]. Collectively, these data point to epigenetic age as a marker of adaptation to faster or slower life history schedules [21, 36, 60, 61].

Findings from our study support a model where early life experiences may have an effect on the aging trajectory and associated life history events, such as reproduction and mortality [36]. This type of model construes epigenetic age acceleration as a marker of adaptation to early-life environmental signals, such as nutrient deprivation. Thus, low birthweight may be reflective of environmental signals of limitations in energetic resources, which in turn result in adaptation through a faster life history schedule. Such an adjustment in life history schedule is interpreted as adaptive under both a constraint model and a predictive adaptive response model. Integrating these two models, Berghänel *et al.* [62] suggest that reduced maternal energetic investment in pregnancy may be adaptively counteracted by an acceleration of life history schedule by the developing fetus. Evidence for this kind of adaptation may be detected using epigenetic clocks.



**Table 2.** Multilevel model predicting epigenetic age acceleration using Horvath's pan-tissue clock

Predictor	<i>b</i> [95% Confidence interval]
Age	0.30* [0.06, 0.54]
Birthweight ( $\geq 2500$ g)	0.02 [-0.22, 0.26]
Sex (male)	-0.03 [-0.21, 0.16]
Gestational age	0.02 [-0.06, 0.10]
Maternal age	0.00 [-0.03, 0.03]
Maternal BMI	0.00 [-0.04, 0.04]
Parity (multigravida)	-0.20 [-0.52, 0.13]
Delivery mode (vaginal)	-0.02 [-0.24, 0.19]
Alcohol (none)	0.19 [-0.10, 0.49]
Naïve CD8 <sup>+</sup> T	0.003** [0.001, 0.006]
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup>	0.02 [-0.02, 0.05]
Plasma blast	1.32** [0.44, 2.20]
CD4 <sup>+</sup> T	-0.79 [-3.23, 1.66]
Natural killer	1.67 [-1.74, 5.09]
Monocytes	-1.95 [-4.50, 0.61]
Granulocytes	-1.39* [-2.48, -0.30]
War trauma	-0.09 [-0.19, 0.02]
Chronic stress	0.02 [-0.02, 0.05]
Age $\times$ birthweight (dichotomized around 2500 g)	-0.39** [-0.64, -0.13]
<i>N</i> (observations)	141
<i>N</i> (individuals)	61
<i>R</i> <sup>2</sup> (fixed) <sup>1</sup>	0.24
<i>R</i> <sup>2</sup> (marginal) <sup>2</sup>	0.62

\*\**p* < 0.01; \**p* < 0.05.

<sup>1</sup>Fixed *R*<sup>2</sup> quantifies variance explained by fixed effects alone.

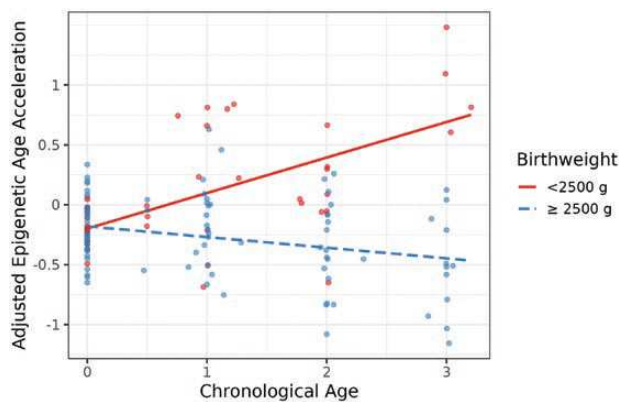
<sup>2</sup>Marginal *R*<sup>2</sup> quantifies variance explained by fixed and random effects combined.

Sensitivity of the clock to signals of resource availability is supported by a recent *in vitro* study using human cells that found associations between epigenetic aging and markers of energy reserve, such as nutrient sensing and mitochondrial activity [63].

If epigenetic age acceleration associates with a faster life history schedule, and this faster life history schedule is predicted by low birthweight, one might expect differences in epigenetic aging predicted by birthweight to persist into adulthood. Large cohort studies in adults have found no association between birthweight and Horvath epigenetic age acceleration, but have identified associations between birthweight and other epigenetic clocks that were trained on clinical biomarkers associated with aging and telomere length [61, 64]. These results suggest that tracking the impact of low birthweight on epigenetic age acceleration may require different clocks at different ages. Several [21, 25–28], but not all [24], studies of epigenetic age acceleration in children and adolescents report associations with negative health outcomes, suggesting that epigenetic age acceleration in childhood and adolescence may be comparable to epigenetic age acceleration in

adulthood, but more studies are needed to establish this equivalency. Low birthweight-associated epigenetic age acceleration could indicate an adaptive recalibration of life history scheduling in response to reduced maternal investment [62].

Our findings should be considered in the context of several limitations. We did not control for postnatal adverse exposures known to be associated with epigenetic aging in children, such as psychosocial stress and exposure to violence [57, 65–67], but we did control for prenatal exposure to violence. This is an important consideration given evidence for sensitive periods in early childhood for longitudinal effects of childhood adversity on DNA methylation patterns [66, 68]. Another limitation is our cell type estimation methods, which are based on adult references. The availability of cord blood cell type references is useful for studies at birth [69], but difficult to apply in longitudinal studies that extend beyond birth, as previously noted [29]. Strengths of the study include the longitudinal design and sampling from a theoretically important and underrepresented age and geographic group in the epigenomics literature. The epigenetic clock we



**Figure 2.** Low birthweight predicts epigenetic age acceleration. Birthweight was dichotomized at 2500 g, the WHO cutoff for low birthweight. A significant interaction ( $b = -0.39$ ,  $p = 0.005$ ) between age and birthweight was identified in a model adjusted for all covariates and immune cell type proportions (Table 2). The interaction effect is plotted here. A simple slopes analysis revealed that infants with birthweights  $<2500$  g, that is low birthweight, exhibited accelerated epigenetic aging in the first 3 years of life ( $b = 0.40$ ,  $p < 0.01$ ), while infants with birthweights  $\geq 2500$  g showed no significant change in epigenetic age acceleration ( $b = -0.06$ ,  $p = 0.49$ ).  $N_{\text{individuals}} = 61$ ,  $N_{\text{observations}} = 141$ . Red color corresponds to birthweight  $<2500$  g and blue color corresponds to birthweight  $\geq 2500$  g

used is known to be more accurate in children than other commonly used clocks [32, 70]. Answering a call for greater diversity in participants in epigenomic research [37], we describe variation in epigenetic aging among an underrepresented African population.

## CONCLUSIONS

Our study lends support for an epigenetic theory of aging, where the aging process is an outcome of early developmental processes [70]. Epigenetic age acceleration emerged within the first 3 years of life and was predicted by low birthweight. These results suggest that early life experiences, such as low birthweight, may shape the trajectory of epigenetic age acceleration in early childhood. Furthermore, accelerated epigenetic aging may be a pathway that links low birthweight and poor adult health outcomes.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *EMPH* online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the mothers and children who participated in this study. The authors acknowledge the invaluable contributions of the doctors (Drs. Justin Paluku, Luc Malemo, and Aurelien Mahamba) and research team (Bisho Mushagalusa, Georgette Kamate, Chantal Nyaramugisha, Anne Marie Rutega, and

Bernard Kitumaini) at HEAL Africa Hospital who made this study possible. Sonile Peck processed survey data.

## DATA AVAILABILITY

DNA methylation data are available at gene expression omnibus under record GSE224573. The R script used to conduct analyses is available at [github.com/edward-quinn/congo\\_birthweight](https://github.com/edward-quinn/congo_birthweight).

## FUNDING

This work was supported by the National Science Foundation under BCS1231264 and BCS1719866. CJH was funded by the National Institutes of Health (NCATS Clinical and Translational Science Awards to the University of Florida, UL1TR001427, KL2TR001429 and TL1TR001428; NICHD F30HD097935).

**Conflict of interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Bianco-Miotto T, Craig JM, Gasser YP *et al.* Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond. *J Dev Orig Health Dis* 2017;**8**:513–9.
2. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007;**261**:412–7.
3. Risnes KR, Vatten LJ, Baker JL *et al.* Birthweight and mortality in adulthood: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol* 2011;**40**:647–61.
4. Hoy WE, Nicol JL. The Barker hypothesis confirmed: association of low birth weight with all-cause natural deaths in young adult life in a remote Australian Aboriginal community. *J Dev Orig Health Dis* 2019;**10**:55–62.
5. Zanetti D, Tikkanen E, Gustafsson S *et al.* Birthweight, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease: addressing the barker hypothesis with mendelian randomization. *Circ Genom Precis Med* 2018;**11**:e002054.
6. Moen G-H, Brumpton B, Willer C *et al.* Mendelian randomization study of maternal influences on birthweight and future cardiometabolic risk in the HUNT cohort. *Nat Commun* 2020;**11**:5404.
7. Belbasis L, Savvidou MD, Kanu C *et al.* Birth weight in relation to health and disease in later life: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *BMC Med* 2016;**14**:147.
8. D'Urso S, Wang G, Hwang L-D *et al.* A cautionary note on using Mendelian randomization to examine the Barker hypothesis and Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *J Dev Orig Health Dis* 2021;**12**:688–93.
9. Kuzawa CW, Kim AW. Early environments, developmental plasticity, and chronic degenerative disease. In: Cameron NC, Schell LM (eds.). *Human growth and development*. Cambridge, MA: Elsevier/Academic Press, 2022, 449–468.
10. Horikoshi M, Beaumont RN, Day FR *et al.*; CHARGE Consortium Hematology Working Group. Genome-wide associations for birth weight and correlations with adult disease. *Nature* 2016;**538**:248–52.

11. Grote NK, Bridge JA, Gavin AR *et al.* A meta-analysis of depression during pregnancy and the risk of preterm birth, low birth weight, and intrauterine growth restriction. *Arch Gen Psychiatry* 2010;**67**:1012–24.
12. Rosen D, Seng JS, Tolman RM *et al.* Intimate partner violence, depression, and posttraumatic stress disorder as additional predictors of low birth weight infants among low-income mothers. *J Interpers Violence* 2007;**22**:1305–14.
13. Kramer MS. Determinants of low birth weight: methodological assessment and meta-analysis. *Bull World Health Organ* 1987;**65**:663–737.
14. Lea AJ, Tung J, Archie EA *et al.* Developmental plasticity: Bridging research in evolution and human health. *Evol Med Public Health* 2017;**2017**:162–75.
15. Shalev I, Belsky J. Early-life stress and reproductive cost: a two-hit developmental model of accelerated aging? *Med Hypotheses* 2016;**90**:41–7.
16. Simpson DJ, Chandra T. Epigenetic age prediction. *Aging Cell* 2021;**20**:1–20.
17. Binder AM, Horvath S. Epigenetic clocks. In: Michels KB (ed) *Epigenetic Epidemiology*. Cham: Springer International Publishing, 2022, 261–276.
18. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 2013;**14**:R115.
19. Hannum G, Guinney J, Zhao L *et al.* Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell* 2013;**49**:359–67.
20. Binder AM, Corvalan C, Mericq V *et al.* Faster ticking rate of the epigenetic clock is associated with faster pubertal development in girls. *Epigenetics* 2018;**13**:85–94.
21. Suarez A, Lahti J, Czamara D *et al.* The epigenetic clock and pubertal, neuroendocrine, psychiatric, and cognitive outcomes in adolescents. *Clin Epigenetics* 2018;**10**:96.
22. Oblak L, van der Zaag J, Higgins-Chen AT *et al.* A systematic review of biological, social and environmental factors associated with epigenetic clock acceleration. *Ageing Res Rev* 2021;**69**:101348.
23. Marioni RE, Shah S, McRae AF *et al.* DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol* 2015;**16**:1–12.
24. Monasso GS, Jaddoe VWV, Küpers LK *et al.* Epigenetic age acceleration and cardiovascular outcomes in school-age children: the Generation R Study. *Clin Epigenetics* 2021;**13**:205.
25. Huang R-C, Lillycrop KA, Beilin LJ *et al.* Epigenetic age acceleration in adolescence associates with BMI, inflammation, and risk score for middle age cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;**104**:3012–24.
26. Hoare J, Stein DJ, Heany SJ *et al.* Accelerated epigenetic aging in adolescents from low-income households is associated with altered development of brain structures. *Metab Brain Dis* 2020;**35**:1287–98.
27. Davis EG, Humphreys KL, McEwen LM *et al.* Accelerated DNA methylation age in adolescent girls: associations with elevated diurnal cortisol and reduced hippocampal volume. *Transl Psychiatry* 2017;**7**:e1223.
28. Sumner JA, Colich NL, Uddin M *et al.* Early experiences of threat, but not deprivation, are associated with accelerated biological aging in children and adolescents. *Biol Psychiatry* 2019;**85**:268–78.
29. Simpkin AJ, Howe LD, Tilling K *et al.* The epigenetic clock and physical development during childhood and adolescence: longitudinal analysis from a UK birth cohort. *Int J Epidemiol* 2017;**46**:549–58.
30. McGill MG, Pokhvisneva I, Clappison AS *et al.* Maternal prenatal anxiety and the fetal origins of epigenetic aging. *Biol Psychiatry* 2022;**91**:303–12.
31. Nwanaji-Enwerem JC, Van Der Laan L, Kogut K *et al.* Maternal adverse childhood experiences before pregnancy are associated with epigenetic aging changes in their children. *Aging (Albany NY)* 2021;**13**:25653–69.
32. Simpkin AJ, Hemani G, Suderman M *et al.* Prenatal and early life influences on epigenetic age in children: a study of mother-offspring pairs from two cohort studies. *Hum Mol Genet* 2016;**25**:191–201.
33. Kananen L, Marttila S, Nevalainen T *et al.* The trajectory of the blood DNA methylome ageing rate is largely set before adulthood: evidence from two longitudinal studies. *Age (Dordr)* 2016;**38**:65.
34. Li S, Nguyen TL, Wong EM *et al.* Genetic and environmental causes of variation in epigenetic aging across the lifespan. *Clin Epigenetics* 2020;**12**:158.
35. Vaiserman A. Developmental tuning of epigenetic clock. *Front Genet* 2018;**9**:584.
36. Parrott BB, Bertucci EM. Epigenetic aging clocks in ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 2019;**34**:767–70.
37. Non AL. Social epigenomics: are we at an impasse? *Epigenomics* 2021;**13**:1747–59.
38. Johnson K, Scott J, Rughita B *et al.* Association of sexual violence and human rights violations with physical and mental health in territories of the Eastern Democratic Republic of the Congo. *JAMA* 2010;**304**:553–62.
39. Mukwege DM, Nangini C. Rape with extreme violence: the new pathology in South Kivu, Democratic Republic of Congo. *PLoS Med* 2009;**6**:e1000204.
40. Green MR, Sambrook J. Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harb Protoc* 2016:1116–1120. doi:10.1101/pdb.prot093377.
41. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Computer Software, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2021.
42. Triche TJ, Weisenberger DJ, Van Den Berg D *et al.* Low-level processing of Illumina Infinium DNA methylation beadarrays. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:e90.
43. Zhou W, Triche TJ, Laird PW *et al.* SeSAMe: reducing artifactual detection of DNA methylation by Infinium BeadChips in genomic deletions. *Nucleic Acids Res* 2018;**46**:e123.
44. Min JL, Hemani G, Davey Smith G *et al.* Meffil: efficient normalization and analysis of very large DNA methylation datasets. *Bioinformatics* 2018;**34**:3983–9.
45. Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC *et al.* DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinf* 2012;**13**:86.
46. World Health Organization. *Global Nutrition Targets 2025: Low birth weight policy brief*. 2014. WHO Reference Number: WHO/NMH/NHD/14.5. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-NMH-NHD-14.5>.
47. Kertes DA, Kamin HS, Hughes DA *et al.* Prenatal maternal stress predicts methylation of genes regulating the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in mothers and newborns in the Democratic Republic of Congo. *Child Dev* 2016;**87**:61–72.
48. Mulligan CJ, D'Errico NC, Stees J *et al.* Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. *Epigenetics* 2012;**7**:853–7.
49. Spradley J. *The Ethnographic Interview*. Wadsworth: Cengage Learning.
50. Haftorn KL, Lee Y, Denault WRP *et al.* An EPIC predictor of gestational age and its application to newborns conceived by assisted reproductive technologies. *Clin Epigenetics* 2021;**13**:82.

51. Jaffe AE, Irizarry RA. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biol* 2014;**15**:R31.
52. Bakdash JZ, Marusich LR. Repeated measures correlation. *Front Psychol* 2017;**8**:456.
53. Grambsch PM. Simple robust tests for scale differences in paired data. *Biometrika* 1994;**81**:359–72.
54. Bell ML, Kenward MG, Fairclough DL et al. Differential dropout and bias in randomised controlled trials: when it matters and when it may not. *BMJ* 2013;**346**:e8668.
55. Jakubowski KP, Cundiff JM, Matthews KA. Cumulative childhood adversity and adult cardiometabolic disease: a meta-analysis. *Health Psychol* 2018;**37**:701–15.
56. De Rooij SR, Bleker LS, Painter RC et al. Lessons learned from 25 years of research into long term consequences of prenatal exposure to the Dutch famine 1944–45: the Dutch famine birth cohort. *Int J Environ Health Res* 2021;**32**:1432–46.
57. Gettler LT, Lin DTS, Miegakanda V et al. Epigenetic aging in children from a small-scale farming society in The Congo Basin: associations with child growth and family conflict. *Dev Psychobiol* 2020;**62**:138–53.
58. Horvath S, Gurven M, Levine ME et al. An epigenetic clock analysis of race/ethnicity, sex, and coronary heart disease. *Genome Biol* 2016;**17**:1–22.
59. Gopalan S, Carja O, Fagny M et al. Trends in DNA methylation with age replicate across diverse human populations. *Genetics* 2017;**206**:1659–74.
60. Ryan CP. “Epigenetic clocks”: theory and applications in human biology. *Am J Hum Biol* 2021;**33**:e23488.
61. Kuzawa CW, Ryan CP, Adair LS et al. Birth weight and maternal energy status during pregnancy as predictors of epigenetic age acceleration in young adults from metropolitan Cebu, Philippines. *Epigenetics* 2022;**17**:1535–45.
62. Berghänel A, Heistermann M, Schülke O et al. Prenatal stress accelerates offspring growth to compensate for reduced maternal investment across mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;**114**:E10658–66.
63. Kabacik S, Lowe D, Fransen L et al. The relationship between epigenetic age and the hallmarks of aging in human cells. *Nat Aging* 2022;**2**:484–93.
64. Madden RA, McCartney DL, Walker RM et al. Birth weight associations with DNA methylation differences in an adult population. *Epigenetics* 2021;**16**:783–96.
65. Clausing ES, Binder AM, Non AL. Epigenetic age associates with psychosocial stress and resilience in children of Latinx immigrants. *Epigenomics* 2021;**13**:1677–99.
66. Marini S, Davis KA, Soare TW et al. Adversity exposure during sensitive periods predicts accelerated epigenetic aging in children. *Psychoneuroendocrinology* 2020;**113**:104484.
67. Jovanovic T, Vance LA, Cross D et al. Exposure to violence accelerates epigenetic aging in children. *Sci Rep* 2017;**7**:8962.
68. Dunn EC, Soare TW, Zhu Y et al. Sensitive periods for the effect of childhood adversity on DNA methylation: results from a prospective, longitudinal study. *Biol Psychiatry* 2019;**85**:838–49.
69. Gervin K, Salas LA, Bakulski KM et al. Systematic evaluation and validation of reference and library selection methods for deconvolution of cord blood DNA methylation data. *Clin Epigenetics* 2019;**11**:125.
70. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* 2018;**19**:371–84.