

## Jaiotza inguruko asfixiaren ondoriozko modulazio epigenetiko

### *Epigenetic modulation in response to perinatal asphyxia*

Nuria Capdet, Gorane Beldarrain, Jon Ander Alart, Marc Chillida, Antonia Ángeles Álvarez,  
Daniel Alonso-Alconada

Zelulen Biologia eta Histologia Saila (UPV/EHU)

*gorane.beldarrain@ehu.eus*

#### Laburpena

---

Jaiotza inguruko asfixia, jaioberrien heriotza eta arazo neurologikoak eragiten dituen arrazoi nagusietarikoa da. Ezagutzen den tratamendu bakarra hipotermia terapeutikoa da eta hori, asfixia-kasuak bizkortasunez identifikatzeko zailtasunarekin batera, erronka handia da eraginkorrak diren neurri neurobabesleak aplikatzeko. Asfixia gertaera hipoxiko-iskemiko batekin hasten da eta odoljarioaren berrezarpenak jarraitzen dio. Egoera horren aurrean fisiopatologia konplexu bat garatzen da, hainbat ezaugarri berezirekin: eszitotoxikotasuna, mitokondrioen disfuntzioa, hantura, apoptosia eta nekrosia, besteak beste. Garunean garatzen den kaltea denborarekiko mendekoa da eta klinika-arloan entzefalopatia hipoxiko-iskemiko izenarekin ezagutzen da. Kalte horren larritasunaren arabera hipotermia terapeutikoa erabiliko da edo ez. Zelulak egoera hipoxikoetara moldatzen dira eraldaketa epigenetiko bidez. Oro har, geneak isiltzen dira eraldaketa horien ondorioz, baina oxigenoaren erabilgarritasuna eta zelulen metabolismoa moldatzen duten beste zenbait generen espresioa ere areagotu egiten da. Prozesu epigenetiko garrantzitsuen artean hipoxiak eragindako faktorearekin (HIF-1) lotutako prozesuak, DNAREN metilazioa, mikroRNak eta histonen eraldaketak daude. Nahiz eta eraldaketa epigenetiko helburua oxigeno-gabeziara moldatzea izan, garunean gertatutako kalteak handitu ditzakete. Hori dela eta, ikerketa-lan batzuk sendagaiak bilatzen ari dira eraldaketa horiek ekiditeko. Berrikuspen honetan jaiotza inguruko asfixiari buruzko informazio aipagarriena bai eta egoera hipoxiko-iskemikoaren aurrean gertatzen diren eraldaketa epigenetiko nagusiak deskribatzen dira.

Gako-hitzak: Jaiotza inguruko asfixia, epigenetika, HIF-1, DNA metilazioa, mi-RNA, histonak.

#### Abstract

---

*Perinatal asphyxia is one of the leading causes of fetal death and neurological problems among neonates. Currently, the only treatment is therapeutic hypothermia, which is a challenge for medicine to identify possible cases of asphyxia earlier and to apply more efficient neuroprotective measures to minimise the sequelae. Asphyxia is characterised by an initial ischaemic hypoxic event and a subsequent restoration of blood flow, both of which are associated with a complex pathophysiology characterised by excitotoxicity, mitochondrial dysfunction, inflammation, apoptosis and cellular necrosis in immature brains. The brain injury produced is time-dependent and the clinical manifestation of perinatal asphyxia is called hypoxic-ischaemic encephalopathy, which depending on its degree of severity will be a candidate for therapeutic hypothermia or not. In turn, epigenetic*

Nuria Capdet, Gorane Beldarrain, Jon Ander Alart, Marc Chillida, Antonia Ángeles Álvarez, Daniel Alonso-Alconada

*modifications also occur as a measure of cellular adaptation to hypoxic conditions. This leads to an alteration in gene expression in which, at a global level, there is a silencing of genes, but the expression of certain genes involved in cell metabolism or in increasing oxygen availability, for example, through erythropoietin, is enhanced. Among the most relevant epigenetic processes are the hypoxia-inducible factor HIF-1, DNA methylation, microRNAs and histone modifications. Although the epigenetics involved in perinatal asphyxia contribute to adaptation to new oxygen conditions, such changes can also add to brain damage, so studies are currently underway to develop drugs to reverse these epigenetic alterations. In this review, the most important features of perinatal asphyxia, as well as the most relevant epigenetic modifications associated with a hypoxic ischaemic event, are presented.*

*Keywords: Perinatal asphyxia, epigenetics, HIF-1, DNA metilation, mi-RNA, histones.*

Bidalia: 22/11/29

Onartua: 23/03/17

<http://doi.org/10.26876/Osagaiz.1.2023.495>

## 1. Sarrera

---

Espainiako Neonatologia Elkarteak (SENEO) argitaratutako gidaren arabera, jaiotza inguruko asfixia jaiotza inguruan gertatzen den gas-trukearen etetea da eta fetuan edo jaioberrian hipoxemia, hiperkapnia eta azidosi laktikoa eragiten ditu. Odoleko oxigeno-maila gutxitzearen eta perfusioaren murrizketaren ondorio da, hau da, hipoxemia eta iskemiaren ondorio, hurrenez hurren (1).

Hainbat arrisku-faktore identifikatu dira jaiotza inguruko asfixian:

- Amarekin lotutakoak: preeklanpsia, hipertentsioa, diabetesa eta amaren adina.
- Plazentarekin eta zilbor-hestearekin lotutakoak: plazentaren askatzea, fetuaren eta amaren odoljariora, plazenta-gutxiegitasuna eta zilbor-hestearen oklusioa.
- Fetuarekin/jaioberriarekin lotutakoak: umetoki barruko hazkunde atzeratua, fetu-malformazioak eta bihotz-biriketako gaixotasunak.
- Ereditzearekin lotutakoak: sorbaldeen erditze luzea eta distozia.

Jaioberriaren garuna asfixiarekin lotutako gertakari hipoxiko-iskemikoa dela-eta kaltetzen bada, entzefalopatia hipoxiko-iskemikoa (EHI) gara daiteke. Entzefalopatia hori jaioberrien hilkortasunaren kausa nagusietarikoa da 35 astetik gorako haurdunaldietan eta desgaitasun iraunkorra eragin dezake pairatzen dutenen artean, besteak beste, narriadura kognitiboa, adimen-atzerapen larria eta portaera- eta ikaskuntza-arazoak eragiten baititu (2). Horrez gain, EHla garun-paralisia duten haurren % 20ren erantzulea dela estimatzen da (3). Ikerketen arabera, 1.000 jaioberritik 1ek pairatzen du entzefalopatia hipoxiko-iskemikoa herrialde garatuetan (4).

Azken ikerketen arabera, jaiotza inguruko asfixiak Alzheimerren gaixotasuna garatzen ere lagun dezake, animalia-ereduetan tau proteina eta amiloide proteinaren aitzindaria kodetzen duten geneen adierazpen handiagoa ikusi baita (5).

Hortaz, esan daiteke EHla jaiotza inguruko asfixiaren adierazpen klinikoa dela, betiere hurrengo irizpideak betez gero 35 astetik gorako jaioberrietan (6,7):

- Azidosi metaboliko perinatala ( $\text{pH} \leq 7$  edo baseen defizita  $\geq 12$  mmol/L buruko ile-larruan, zilbor-hestean edo odolean bizitzako lehenengo orduan.
- Bestelako irizpideak (gertakari hipoxiko-iskemikoekiko espezifikoak ez direnak):

- Apgar <5 lehenengo 5 eta 10 minutuetan.
- Gutxiegitasun organiko multisistemikoa.
- Erresonantzia magnetiko bidez detektagarriak diren garuneko lesio akutuak.
- Jaioberrien bestelako entzefalopatiaren etiologiak baztertzea: jaiotze aurretiko infekzioak, traumatismo obstetrikoa, koagulazio-nahasmenduak, gaixotasun metabolikoak eta kausa genetikoak.

Bestalde, EHLa ohikoagoa da jaioberri goiztiarretan, garaiko jaioberrietan baino. Izan ere, garatzen ari diren garunak ahulagoak dira gertakari hipoxiko-iskemikoekiko, autorregulazio-gaitasun mugatua baitute (8).

Hainbat eskala daude EHLaren mailak sailkatzeko eta horien artean Harvey eta Margaret Sarnat-ek garatutakoa dago(9). Eskala horretan, EHLa hiru gradutan sailkatzen da larritasunaren arabera: 1. gradua forma arinenek osatzen dute, 2. gradua forma moderatuagoek eta 3. gradua forma larrienek. Sailkapen hori garrantzitsua da klinikan hipotermia terapeutikoa aplikatuko den ala ez erabakitzeke. Izan ere, oraindik ez dago kasu arinenetan aplikatzea merezi duela dioen adostasunik, kostu/onura balantzea ez baitago argi kasu horietan (10). Larritasuna baloratzeko erabilitako irizpideek, batez ere, honako parametro hauek hartzen dituzte kontuan: kontzientzia-maila, muskulu-tonuaren eta erreflexuen alterazioa eta konbultsioak dauden ala ez (1).

Sarnat-en eskalaz gain, badira pronostiko-balio handia duten proba osagarriak, garuneko kaltea agerian uzten laguntzen dutenak. Horien artean EEG, garuneko ultrasonografia, erresonantzia magnetikoa (gold estandarra) eta odol-likido zefalorakideotik ateratako kalte zerebralaren biomarkatzaileak (enolasa neuronal espezifikoak, S100B proteina, gliaren proteina azido fibrilarra) eta gerneruarenak (S100B eta laktato/kreatinina koizientea) (1).

### 1.1 Fisiopatologia

Umetokian, fetua ingurune hipoxemiko fisiologikoan garatzen da, baina ez hipoxia egoeran. Izan ere, baldintza horietara moldatzen laguntzen dieten mekanismoak dituzte, hala nola afinitate altuko hemoglobina fetala, oxigenoa erraz zabaltzen laguntzen duena amaren odol-likidotik umearen odolera. Fetuen zirkulazioa ere desberdina da, irrigazio handiagoa behar baitute organo jakinetan, garunean eta bihotzean, batez ere (8). Hori horrela, oxigeno falta dagoenean, organo horiek izango dira kaltetuenak fetuaren organismoak defizit hori konpentsatzeko ahaleginak egin arren.

Gertaera hipoxiko-iskemikoak fisiopatologia konplexua du. Lehenengo fasean gertaera hipoxiko-iskemikoaren ondorioz oxigeno eta glukosa falta ematen dira, fosforilazio oxidatiboa eteten da eta metabolismo anaerobikoaren kitzikapena eragiten du. Horren ondorioz, ATParen mendeko  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ponpek huts egiten dute, zelulen mintzen despolarizazioa dakarrena. Despolarizazioaren ondorioz ura eta sodioa zelulan metatzen dira, eta nekrosia eragiten da zenbait zelulatan. Horrez gain, glutamatoak bidezidor metaboliko apoptotikoak aktibatzen ditu. Fase latentean (6-12 ordura), odol-fluxuaren birperfusioak metabolismo oxidatiboaren berreskurapen partziala eragiten du. Hala ere, birperfusioa eta gero erradikalaskeen askapenak gora egiten du eta, ondorioz, mitokondrioren kaltea, energia-gutxiegitasuna eta apoptosis gertatzen dira. Azken fasean (hilabeteak/urteak pasa eta gero) hantura kronikoak garun-ehuna kaltetzen jarraitzen du (11).

Zelulen kaltea eragiten duen prozesu horretan guztian, mitokondrioak gakoa dira. Izan ere, energia ekoizteaz gain, beharrezkoak dira zeluletako gehiegizko kaltzioa arintzeko, oxigeno-espezie erreaktiboen (ROS) maila erregulatzeko eta apoptosis eragiteko ere. EHLaren fisiopatologian duten

Nuria Capdet, Gorane Beldarrain, Jon Ander Alart, Marc Chillida, Antonia Ángeles Álvarez, Daniel Alonso-Alconada

garrantzia ezagututa, azken urteetan funtzio mitokondriala berrezartzeko terapiak ikertzen ari dira (12).

Hirugarren fasean, guztiz definituak ez dauden baina gertakari hipoxiko-iskemikoa eman eta denbora luzera kontserba daitezkeen aldaketa epigenetikoek garrantzia hartzen dute. Aldaketa epigenetiko horiek hipoxiarekiko egokitzapen-erantzun gisa gertatzendira, baina gertatzen diren aldaketak modu iraunkorren eragin diezaioke jaioberriaren burmuinaren egitura edo funtzioari (13). Karraskariekin egindako ikerketa batean garuneko iskemiaren hasieran, 2-metoxiestradiol erabilia hipoxiak eragindako 1 faktorearen (HIF-1) inhibizioa neurobabeslea zela ikusi zen, hesi hematoentzefalikoa babestu eta garuneko edema gutxitzen baitu (14). Beste azterlan batek frogatu zuen DNAREN metilazioak glukokortikoideen hartzailearen aktibazioa murrizten zuela. Horren ondorioz, arratoi jaioberrien garuna zaurgarriagoa da lesio hipoxiko-iskemikoen aurrean (15).

Hori dela eta, hipoxia-iskemiaren ondorioz kalte neurologikoa eragiten duten aldaketa epigenetikoak konpontzen dituzten farmako posibleak ikertzen ari dira. Horien artean histonen desazetilasiak inhibidoreak (HDAC) zein HIF-1-en aktibitatea murrizten dituzten farmakoak daude neurri neurobabesle bezala (16).

## 1.2. Tratamendua

Gaur egun, entzefalopatia hipoxiko-iskemikoa tratatzeko onartua dagoen terapia bakarra hipotermia terapeutikoa (HT) da, 2008tik erabiltzen dena Espainian (10).

Hipotermia terapeutikoa jaioberrien heriotza-tasa eta lesio hipoxiko-iskemikoa erakarritako kalteak murriztea ahalbidetzen du kasu moderatu-larrietan 35 aste baino gutxiagoko haurdunaldietan. Hala ere, askotan ez da erraza kasu ahulak eta moderatuak bereiztea eta, hortaz, egoera horren aurrean ere tratamendua ezarri ohi da. 35 aste baino gutxiagoko haur goiztiarretan, ez dago argi HT tratamenduaren ezarpenak ondorio kaltegarriak eragin ditzakeen edo ez, hala nola koagulazioa, immunitatearen murrizpena eta ondorio arriskutsuak izan ditzakeen oxigeno-hemoglobinaren disoziazio-kurbaren ezkerrean zoko desplazamendua. Ondorio horien artean garezur barruko odoljariora, infekzioak eta oxigenazio okerragoa aurki ditzakegu (10).

HTa gorputzaren tenperatura 3-4 °C (33-34°C) jaistean datza. Jaio eta lehenengo 6 orduetan hasi eta gehienez 72 orduko iraupena izan dezake tenperaturaren jaitsiera horrek. Tenperaturaren murrizketak oxigeno-eskaria eta, beraz, kaltea murrizten laguntzen du. Zehazki, gutxitzen den gradu bakoitzeko, oxigeno- eta glukosa-eskaria % 7 murrizten da (17).

Egindako ikerketen arabera, 72 h-tik aurrerako hozte-epeekin eta hozte-tenperatura baxuagoekin ez daemaitza neurobabesle hobeagorik lortu, eta erikortasun-arriskua handitzen dela ikusi da (18-20). Hozte-epe txikiagoek (48h), aldiz, hanturaren berpiztea eragin dezakete birberotze-prozesuan zehar (21).

Hipotermiaren bidez, hantura, estres oxidatiboa eta aminoazido eszitotoxikoen askapena murriztea lortzen da, baina birberotzean zehar prozesu horiek berriz aktiba daitezke. Hori dela eta, birberotzea garai garrantzitsua da eta motel egin behar da. Horrez gain, komeni da garunaren jardura monitorizatzea eta tratatu aurretik, jaioberriak sedatzea.

## 2. Modulazio epigenetikoa

Jarraian, lesio hipoxiko-iskemikoen aurrean gertatzen diren prozesu epigenetiko garrantzitsuenak azaltzen dira, oxigenoaren erabilgarritasun baxuarekiko adaptazio bezalagaratzen direnak.

### 2.1. Hipoxiak eragindako faktorea (HIF-1)

2019an, Fisiologia eta Medikuntzako Nobel saria Gregg L. Semenza (Johns Hopkins Unibertsitatea), Peter J. Ratcliffe (Oxford Unibertsitatea) eta William G. Kaelin Jr. (Harvard Unibertsitatea) medikuek jaso zuten, zelulek oxigeno-eskuragarritasunera egokitzeko ahalmena dutela aurkitu zutelako (22).

90eko hamarkadan, Semenza-k hainbat ikerketa egin zituen oxigenoz erregulatutako eritropoietinaren espresioari buruz. Ikerketa horietan, eritropoietinaren genean sekuentzia bat identifikatu zuen, hipoxiarekiko erantzun-elementua izendatu zuena (HRE, ingelesez). Gainera, HIF-1 identifikatu zuen, HRE sekuentziari lotzen zaiona eta eritropoietinaren genearen transkripzioa eragiten duena hipoxiaren aurrean (23). HIF-1 heterodimero bat zela aurkitu zuen, bi azpiunitatez osatutakoa: HIF-1 $\beta$ , azpiunitate osagarria, eta HIF-1 $\alpha$ , oxigeno-mailaren arabera erregulatzen dena (24). Oro har, HIF-1 hipoxiaren aurrean organismoak duen zelulen egokitze-mekanismo nagusietariko bat da, eta horri esker, hainbat gene transkribatzen dira, hala nola baso berriak eratzeko geneak, burdinaren eta glukosaren metabolismoko geneak, baita zelulen proliferazioan eta biziraupenean eragina duten geneak ere (25). Normoxian, aurretik esan bezala, proteasomak HIF-1 $\alpha$  degradatzen du, baina hipoxian, harenegonkortasuna handiagoa da eta ez da hain erraz degradatzen. Horren ordez, nukleora mugitzen da, HIF-1 $\beta$  azpiunitatearekin lotzen da eta itu-geneen transkripzioa gertatzen da (26). Horrez gain, HIF-1 $\alpha$ -ren transkripzio-aktibitatea emendatu egiten da HIF-1 $\alpha$  fosforilatu egiten denean mitogenoek aktibatutako proteina kinasaren bidearen (MAPK) bidez (27).

Kaelin-ek, bestalde, van Hippel-Lindau gaixotasuna (VHL) aztertu zuen, VHL genean mutazio heredagarriak eragiten dituen zenbait minbizi izateko aukerak handituz. Ikerketa horiek egitean, ikusi zuen gene ugari hipoxiaren bidez erregulatzen zirela eta haien artean hazkunde endotelial baskularren faktorea (VEGF) zegoen (28). Halaber, VHLak proteinak ubikitinatu eta etiketatzeko funtzioa zuela demostratu zuen, ondoren proteasomaren bidez degradatuak izateko. Horrekin batera, Ratcliff-ek egindako zenbait ikerketak agerian utzizuten VHLa HIF-1-era lotzen zela bere burua degradatzeko (29). VHLa lotu egiten da hainbat proteinarekin (C elongina, B elongina, cullin-2 eta Rbx1) eta E3 ligasa konplexua eratzen dute (30) eta konplexu horrek HIF-1 $\alpha$ -ren ubikitinazioa eragiten du. Ubikitinazioaren ondorioz, HIF-1 $\alpha$  degradatu egiten da proteasomaren bidez. Hori horrela izanda, VHLak mutazioen bat pairatzean, HIF-1 $\alpha$  metatu egiten da normoxian eta, beraz, hipoxiak induzitu ditzakeen geneen espresioa gertatzen da, tumoreen agerpena bultzatzen duten faktore angiogenikoena, esaterako (25). E3 ligasa konplexua ehun ezberdinetan aurki daiteke eta zelulen zitoplasman kokatzen da nagusiki, nahiz eta nukleora mugitzeko gaitasuna duen bertan HIF-1 $\alpha$  degradatu ahal izateko (31). Hala ere, HIF-1 $\alpha$  ubikitinatzeko beste modu batzuk deskribatu dira pVHL aparte, esaterako, p53ren mendekoa den *murine double minute 2* (MDM2) proteinaren bidez (32).

Normoxian prolinaren bi hondakin (33,34), lisina-hondakin baten (Lys 532) (35) eta asparagina-hondakin baten (Asn 803) (36,37) inplikazioa ere ezagutzen dira VHL eta HIF-1-en arteko loturarekin erlazionatuta:

### 2.1.1. Prolinen hidroxilazioa

Normoxian HIF-1-en Pro 402 eta Pro 564 hidroxilatzen dira, bi proteinen arteko lotura baimenduz. Ratcliff-en ikerketek determinatu zuten prolin-4-hidroxilasa (PHD) domeinuko proteinak HIF-1 $\alpha$ -ko prolinen hidroxilazioen erantzuleak zirela. PHD proteinak oso sentikorak dira oxigeno-mailarekiko; izan ere, oxigeno-mailak behera egitean oxigeno- eta nitrogeno-espezie erreaktiboek (ROS eta NOS) degradatu egiten dituzte (38). Hipoxia-egoeran, beraz, PHD mailak behera egiten du eta hidroxilazioak ere jaitsi egiten dira. Ondorioz, HIF-1 $\alpha$  ez da VHLarekin lotzen ezta degradatzen ere (22).

Nuria Capdet, Gorane Beldarrain, Jon Ander Alart, Marc Chillida, Antonia Ángeles Álvarez, Daniel Alonso-Alconada

PHD domeinuaz gain, HIF protil hidroxilasa (HPH) eta *Egg-laying Nine* (EGLN) ere ezagutzen dira, hidroxilazioekin lotura dutenak. Dioxigenasa horiek 3 isoforma dituzte: PHD1/HPH3/EGLN2, PHD2/HPH2/EGLN1 eta PHD3/HPH1/EGLN3 (39) eta Huang eta kolaboratzaileek *in vitro* egindako ikerketetan ikusi zuten isoforma ezberdinek gaitasun ezberdina zutela HIF-1 $\alpha$  hidroxilatzen. Ikertzaile horien emaitzek agerian utzi zuten PHD2 isoforma aktiboena zela eta PHD1, aldiz, hidroxilazio-gaitasun baxuena zuena zela. Horrez gain, PHD2 hidroxilazio-prozesuaren entzima mugatzailea zela ere frogatu zuten (40).

PHD2 zitoplasman aurki daiteke nagusiki, PHD1 nukleoan eta PHD3, aldiz, bai nukleoan zein zitoplasman. Hala ere, PHD2k nukleora mugitzeko gaitasuna du bertan HIF-1 $\alpha$ -ren degradazioari ekiteko. Hiru isoformak aurkitu dira organismoko ehun gehienetan, hala ere, PHD2k espresio altuagoa erakutsi du ehun adiposoan, PHD3k bihotzean eta plazentan (41) eta PHD1ek testikuluetan (42). Hortaz, isoforma hauen aktibitate entzimatikoa, zelula barneko kokalekuan eta ehunetako espresioan behatu diren desberdintasunak direla eta, jakina da ehunek modu espezifikoan erantzuten dutela hipoxia-egoeretan (25).

### 2.1.2. Lisina-hondakinaren azetilazioa

HIF-1 $\alpha$ -n ARD-1 azetiltransferasak lisinaren 532 hondakina azetilatu du. Lisina azetilatuak, hidroxilazioek bezala, HIF-1 $\alpha$  eta VHLaren lotura errazten du eta, beraz, haren degradazioa ere. ARD-1 azetiltransferasaren aktibitatea ez da oxigenoaren mendekoa, baina ikusi da hipoxia-egoeran haren sintesiak behera egiten duela (35).

### 2.1.3. Asparagina-hondakinaren hidroxilazioa

HIF-1 $\alpha$ -k bi domeinu ditu transkripzioaren estimulaziorako C-terminalaren erdialdean: N-TAD eta C-TAD. C-TADak CBP/p300 transkripzio-geneen koaktibatzaileekin interakzioan dihardu. Ikusi da normoxia-egoeretan asparagina-hondakin baten (Asn 803) hidroxilazioa ere gertatzen dela C-TADan asparaginil hidroxilasa FIH-1 entzimak katalizatuta. Hidroxilazio horrek CBP/p300 koaktibadoreen eta HIF-1 $\alpha$ -ren arteko elkarrekintza ekiditen du eta, beraz, itu-geneak inhibitzen dira (36,37). Hipoxian, aldiz, ez da hidroxilaziorik gertatzen eta, beraz, HIF-1 $\alpha$ -k bere koaktibatzaileekin interakzioan jardun dezake eta itu-geneen transkripzioari ekin.

## 2.2. DNAREN metilazio/desmetilazioa

DNAREN metilazioa CpG dinukleotidoaren 5. karbonoko zitosinari metilo talde bat gehitzean datza eta horrela 5-metilzitosina lortzen da. CpG irletan C+Gren edukia gutxienez % 50ekoa izan ohi da. Sekuentzia laburrak dira eta geneen promotoreetan edo promotoreetatik gertu kokatzen dira (42). Genoman, CpG irlak promotoreen % 60ri lotuta doaz eta ez dira metilatuta egoten. Aldiz, irla horien parte ez diren CpGak metilatuta egon ohi dira kasuen % 80an (43,44).

Metilazioak DNA metiltransferasa (DNMT) entzimek katalizatzen dituzte. DNMTek S-adenil metioninaren metilo-talde bat zitosina-hondakin baten 5. karbonora transferitzen dute. Berez, 5 DNMT mota ezagutzen dira, baina horietako hiruk besterik ez dute metilazio aktibitate hori eta, DNMT *de novo* (DNMT3a eta DNMT3b) eta mantenuzko DNMT (DNMT1) deritze (45). DNMT3a eta DNMT3b batez ere zelula ama enbrionarioetan espresatzen dira eta metilazio-patroiak zehazten dituzte, metilatu gabeko CpGak metilatuz. Bestalde, DNMT1 zelulen DNA metiltransferasa nagusia da eta aurreko biek ezarritako metilazio-patroia mantentzea bermatzen du garapenean eta zatiketa zelularrean zehar. Izan ere, DNAREN erreplikazioa erdikontserbakorra denez, hemimetilazioak gertatzen dira eta DNMT1ak guztiz metilatzen ditu (46).

DNA metilatzeak geneen transkripzioa eteten du hainbat modutan. Kasu batzuetan, metilo-taldeek zuzenean oztopatu egiten dute transkripzio-faktoreen eta promotoreen arteko lotura. Beste kasu

batzuetan, aldiz, proteinak metil-CpG-etara lotzen dira eta bestelako prozesu epigenetikoetan esku hartzen dute, hala nola histonen eraldaketan (47).

Bestalde, DNAREN desmetilazioa metilazioaren kontrako prozesuari deritzo. Prozesu hori modu pasiboan edo aktiboan gerta daiteke eta haren ondorioz, transkripzio genikoaren aktibazioa gertatzen da. Desmetilazio pasiboa prozesu garrantzitsua da azkar zatitzen diren zeluletan, zelula ama enbrionarioetan, adibidez. DNAREN erreplikazioan DNMT1en presentziarik ez dagoenean edo hura inhibituta dagoenean gertatzen da eta, beraz, gune hemimetilatueta ez da harizpietako baten metilazioa erreplikatzeko. Desmetilazio aktiboa, aldiz, 5-metilzitosinen metilo-taldea kendu edo aldatzean gertatzen da (48). Hala ere, oraindik ez da DNA desmetilaziorik ezagutzen eta, beraz, hainbat proposamen daude desmetilazioak azaltzeko. Ikertzaile batzuen arabera, desmetilazio oxidatiboa gerta daiteke TET (*ten-eleven translocation*) proteinen bidez. TET proteinek hidroxilo-talde bat gehitzen dute eta 5-metilzitosina 5-hidroximetilzitosina bilakatzen dute, azkenik zitosina biluzi bilakatzeko beste bide batzuen bidez. TET proteinen familia TET1, TET2 eta TET3 proteinek osatzen dute eta hainbat ehunetan aurki daitezke. Hala ere, TET1 nagusiki zelula ama enbrionarioetan kokatzen da (49,50).

Baldintza hipoxikoetan induzitzen diren HIF-1 $\alpha$  bezalako transkripzio-faktoreak metilazioaren gisako prozesu epigenetikoek erregulatzen dituzte. Ikusi da DNAREN aldaketa epigenetikoek HIF-1 $\alpha$ -ren espresioa, haren lotura promotoreekin eta molekularen egonkortasuna bera ere erregulatzen dituztela (51). HIF-1 $\alpha$ -ren promotoreak CpG irlak ditu eta, beraz, horien metilazioak faktorearen espresioa erregula dezake. Erregulazio hori frogatu zuten zelula hematopoietikoekin egindako lan batean, zeinean HIF-1 $\alpha$ -ren transkripzioak behera egin zuen promotorea metilatuta zegoenean (52). Koslowski eta kolaboratzaileek zelula tumoraletan egindako lanean ere agerian geratu zen HIF-1 $\alpha$  positiboki autorregulatzen zela, hau da, promotorearekin lotzen zela beraudemetilaturik zegoenean eta, beraz, haren espresioa emendatzen zela (53).

HIF-1 $\alpha$ -ren egonkortasuna, hainbat ikerketaren arabera, aldaketa epigenetikoek erregulaziopean dago. Zehazki, HIF-1 $\alpha$ -ren degradazioan parte hartzen duten agenteengan eragina duten aldaketa epigenetikoek erregulatzen dute molekularen egonkortasuna, hala nola pVHL eta PHD3 geneen promotoreen metilazio-egoerak hipoxia-baldintzetan (54,55).

Azkenik, HIF-1 $\alpha$ -ren aktibitateari dagokionez, HIF-1 $\alpha$  lotu egiten zaie haren itu-geneetako promotoreetan dauden HRE-ek, beraz, horiek metilatuta egonez gero, HIF-1 $\alpha$ -ren aktibitatean aldaketak gertatuko lirateke.

### 2.3. miRNA

Giza genomaren % 1-2k proteinak kodetzen ditu eta gertatzen diren gainerako transkripzioak RNA ez-kodifikatzaileak (ncRNAs) sortzeko izaten dira, proteinarik eratzen ez dutenak. ncRNA-en funtzioa espresio genikoaren erregulazio postranskripzionala da. ncRNA horien artean mikroRNAk (miRNA) daude, itu-geneen ezabapena eragiten dutenak (56).

miRNAk kate bakarreko eta 18-25 nukleotidoko RNA kateak dira. Haien funtzioa bete ahal izan baino lehen, hainbat eraldaketa jasaten dituzte miRNA heldu bilakatuko diren sekuentziak. Behin eraldaketa horiek jasanda eta molekula helduak direnean, zitoplasman, miRNAk RISC izeneko konplexu isiltzaile batekin lotzen dira eta RISC konplexua, aldi berean, itu RNAm-arekin lotzen da. Horrela, itu RNAm-aren degradazioa eta, beraz, itzulpena ere eragiten da eta, beraz, harekin lotutako proteinen sintesia inhibitzen da (48).

Nuria Capdet, Gorane Beldarrain, Jon Ander Alart, Marc Chillida, Antonia Ángeles Álvarez, Daniel Alonso-Alconada

Hipoxiak hainbat miRNA erregulatzen ditu eta horien artean miRNA-210 da garrantzitsuenak; izan ere, zelula mota desberdinetan progresiboki handitzen da (57). Goranzko erregulazio hori HIF-1-ekiko mendekoak eta ez-mendekoak diren bideen bidez erregulatzen da.

Mendeko bidea HIF-1 $\alpha$ -ren eta HREaren arteko loturan oinarritzen da. Ez-mendeko bidea, aldiz, bi mekanismok osatzen dute: alde batetik, faktore nuklearrak (NF-kB) miRNA-210-aren espresioa eragiten du haren promotorearekin lotzen denean. Bestetik, hipoxiak CpG irlen desmetilazioa eragiten du DNAREN metiltransferasak (DNMT) inaktibatzen dituelako eta, ondorioz, miRNA-210-aren espresioa handitzen. Behin zitoplasman, miRNA-210-a itzuli ez den ARNm-aren 3' muturrearekin lotzen da eta itu-geneen espresioa erreprimitzen du. Horrela, metabolismo mitokondrialaren eta DNAREN konponketaren murrizketa gertatzen da eta zelulen biziraupena eta angiogenesisia bermatzen dira, besteak beste (48).

Hipoxia-baldintzetan, miRNA-210-ak metabolismo mitokondrialia inhibitzen du adaptazio zelular gisa. ISCU1/ISCU2 eta COX10 proteinen inhibizioaren bidez mitokondrioetan dagoen elektroien garraio-katea gelditzen da eta energia azido trikarboxilikoaren ziklotik lortu beharrean bide glukolitikoen bidez lortzen da (58). Alternatiba hau ez da hain eraginkorra, ATP gutxiago lortzen baita eta azidosia eragiten baitu laktatoaren pilaketa dela eta (58).

Horrez gain, miRNA-210-ak RAD52-aren espresioa inhibitzen duenean, DNAREN konponketa ere gelditzen da, egoera hipoxikoetan ezegonkortasun genetikoa eragin dezakeena (48).

Bestalde, miRNA-210-aren goranzko erregulazioak, angiogenesisiaren geneen espresioa handitzen du zelula endotelialean, hau da, odol-baso berrien eraketa eragiten du biziraupena bermatzeko (48).

Apoptosiarekin ere lotu izan dira mRNak. Izan ere, ikerketa ezberdinek emaitza desberdinak lortu dituzte: 2013. urtean Wang eta kolaboratzaileek egindako ikerketak agerian utzi zuen miRNA-210-ak apoptosis txikitzen zuela BNIP3 proteina-aren inhibizioaren ondorioz, eta horrela zelulen biziraupena bermatu (59). Bestalde, Chio eta kolaboratzaileek 2013. urtean miRNA-210-ak Bcl proteina antiapoptotikoa inhibitzen zuela ikusi zuten eta, ondorioz, egoera hipoxikoetan tratatutako neuroblastoma-zelulen apoptosis handitzen zela (60). Hortaz, izan liteke miRNA horrek funtzio desberdinak betetzea zelula motaren arabera (48).

## 2.4. Histonen eraldaketak

Histonak nukleoaren barnean DNA paketatzen duten proteinak dira, baita DNAREN transkripzioa, erreplikazioa eta konponketa erregulatzen dituztenak ere (61). DNAREN 147 base pare histonen oktameroko baten inguruan biribiltzen dira eta kromatinaren oinarritzko egitura diren nukleosomak eratzen dituzte. Oktameroko H2A, H2B, H3 eta H4 proteinen bi kopiaz osatuta dago eta nukleosomen artean DNA agertzen da H1 eta H5 proteinetara lotuta (62).

Histonak prozesu epigenetikoetan garrantzitsuak dira, DNAREN metilazioarekin batera kromatina birmoldatzen dutelako eta geneen espresioa inhibitzen dutelako (63). H3 eta H4 histonek N-isatsak dituzte eta bertan ohikoak dira eraldaketa epigenetiko transdukzionalak, hala nola metilazioa, azetilazioa, glikosilazioa edo ubikitinazioa. Histonen hondakinen kargak eraldatzen dira eta kromatina eraldatzen da, horrela, eukromatina, transkripzioa egiteko gai izango dena, edo, aldiz, heterokromatina lortuko dira (64).

Hipoxia-iskemiaren ondorioz histonen eraldaketa ikertuenak metilazioa eta azetilazioa dira (13):

### 2.4.1. Histonen metilazioa

Oro har, histonen metilazioa histona metiltransferasa (HMT) entzimaren bidez gertatzen da H3 eta H4 histonen lisina-hondakinetan. Hiru metilazio mota daude metilazio kopuruaren arabera; izan ere, bat,



bi edo hiru gerta daitezke. Metilazio bat gertatzen denean, lisina mono-(me1) hondakina sortzen da, bi metilazio gertatuz gero di-(me2), eta hirugarren metilazio bat egotekotan tri-(me3). Metilazioa arginina-hondakinetan ere gerta daiteke arginina metiltransferasa entzimaren bidez, eta kasu horretan ere metilazio bat edo bi gerta daitezke (49).

Histonen metilazioek kromatinaren egitura eraldatzen dute. Horrela, proteina erregulatuzaileen lotura ahalbidetzen dute eta transkripzioa inhibitu edo aktibatzen da. Esaterako, H3K4-ren trimetilazioak transkripzio genikoa baimentzen du; ordea, H3K9-ren, H3K27-ren eta H4K20-ren metilazioek kromatina kondentsatzea eragiten dute eta, hortaz, transkripzioa inhibitzen da (63).

Desmetilazioari dagokionez, bi histona desmetilasa daude (HDM), lisina desmetilasa (KMD) eta Jumonji C domeinua (JmjC) (65). Jumonji domeinuak histona desmetilasen familia garrantzitsua biltzen du (JDHM),  $O_2$ ,  $Fe^{+2}$  eta 2-oxoglutaratoa behar dituztenak histonak desmetilatzen. Oxigenoa beharrezkoa denez, hipoxiak proteina horien funtzioa murriztu dezake, baina kasu horietan JDHMaren espresioa handitzen da histonen metilazioen homeostasia mantentzeko (66).

HIF-1-en, VEGFaren eta EGR1-en itu-geneen transkripzioa handitu egiten da haien promotoreen histonak azetilatu eta metilatzen direnean. Zehazki, H3K9ac-ren azetilazioa eta H3K4me3-ren metilazioa handitzen da JARID1A-ren (JmjC) inhibizioa dela eta, H3K27me3-rena murrizten den bitartean. Beste eraldaketa epigenetiko batzuk ikusi dira hipoxiak eragindako geneen promotoreetan, hala nola EPO (eritropoietina) eta HMOX1 (hemo oxigenasa 1) proteinen promotoreetan (67).

#### 2.4.2. Histonen azetilazioa

Histonen azetilazioa histona azetiltransferasek (HAT) eramaten dute aurrera. Horiek azetil-koAren azetilo-talde bat histonen lisina-hondakinetara transferitzen dute. Histona desazetilasek (HDAC), aldiz, kontrako prozesua egiten dute (49).

Azetilazioak kromatinaren konpaktazioa murriztea eragiten du eta, hortaz, transkripzioa errazten du. Desazetilazioak, aldiz, kontrako efektua du, kromatina kondentsatzea eragiten baitu (68).

Transkripzio-prozesuan oso garrantzitsua da kromatinaren konformazioa. Izan ere, transkripzioa gerta dadin, beharrezkoa da RNA polimerasa IIa eta transkripzio-faktoreak kromatinako gunetik jakinetara heltzea eta, horretarako, ezinbestekoa da kromatinak konformazioa aldatzea. Ikerketen arabera, HIF-1 $\alpha$  kromatinaren konformazio hori transkripziorako egokia izan dadin laguntzen duten koaktibatzaileekin asoziatuta dago. Koaktibatzaile horien artean, 2.1.3. atalean azaldu bezala, p300 eta CBP proteina aurki daitezke (69), bai eta hainbat histona desazetilasa ere (70,71). p300 eta CBP proteinek histona azetiltransferasa aktibatzen dute eta, gainera, transkripzio-faktoreen eta transkripziorako makineriaren arteko lotura bezala jarduten dute (72). Koaktibatzaile horiek HIF-1-i lotzen zaizkie transaktibazio-domeinuen bidez: CH1 C-TADan eta CH3 N-TADan (73). 2.1. atalean azaldu bezala, HIF-1 eta C-TADen arteko lotura gertatzeko Asn hondakin bat hidroxilatu behar da. Hidroxilazio horrek koaktibatzailearen lotura inhibitzen du, baina baldintza hipoxikoetan, ez denez hidroxilaziorik gertatzen, p300/CBP eta HIF-1-en arteko lotura gertatzen da eta itu-geneen transkripzioa piztu (61). p300/CBPren CH3 eta HIF-1-en N-TAD domeinuen arteko lotura, aldiz, ez da oxigenoaren mendekoa eta ahulagoa dela ere ezagutzen da (73).

#### 2.4.3. Hipoxia

##### 2.4.3.1. HIF-1-ek induzitutako geneak

Orain arte aipatutako eraldaketez gain, hipoxian HIF-1ek HDAC4, HDAC5 eta HDAC7 histona desazetilasekin ere interakzioan dihardu eta horiek transkripzio-aktibitatea areagotzen dute (61).

Nuria Capdet, Gorane Beldarrain, Jon Ander Alart, Marc Chillida, Antonia Ángeles Álvarez, Daniel Alonso-Alconada

Hipoxiak JMJD1A histona desmetilasa aktibatzea ere eragiten du eta desmetilasa horrek H3K9me2 maila jaitea eragiten du. Aldi berean, JARID1A izeneko beste histona desmetilasa bat inhibititu egiten da eta azken horrek H3K4me2 maila igotzea eragiten du. Bi aldaketa horiek batera HIFaren itu-geneen espresioa emendatzea eragiten dute. Horrez gain, H3K4me3 emendatu eta H3K27me3 gutxiagotu egiten dira, baina ez da ondo ezagutzen azken bi aldaketa horien zergatia (61).

#### 2.4.3.2. Geneen errepresioa

Hipoxian hainbat generen errepresioa ere gertatzen da, Reptin/HDAC1 eta HIF-1-en elkarrekintzak histonen azetilazioa murriztea eragiten duelako. Beste gene batzuk ere, HIF-1-en mendekoak ez direnak, erreprimitu egiten dira hipoxia-egoeretan. Gene horien promotoreek H3K9ac maila baxua edo/eta H3K9me2 maila altua izan ohi dute G9a metiltransferasaren indukzioa dela eta (74).

Oro har, hipoxiak transkripzio genikoa murrizten duela ikusi da (75). H3K9ren dimetilazioa eta trimetilazioaren emendioa, bai eta haren desazetilazioa ere ikusi izan dira hipoxia-egoeretan, eta aldaketa horiek transkripzioaren inhibizioarekin lotu izan ohi dira. Hortaz, izan liteke metilo-taldeek azetilo-taldeek lekua hartzea baldintza hipoxikoetan eta horregatik transkripzio genikoaren errepresio orokorra gertatzea (61).

### 3. Ondorioak

---

Eragiten dituen heriotza eta ondorio neurologikoak direla eta, jaiotza inguruko asfixiak kezagarria izaten jarraitzen du. Gainera, onartuta dagoen tratamendu bakarra hipotermia terapeutikoa da, EHI kasu moderatu-larrietan erabiltzen dena eta kasuen erdian bakarrik eraginkorra izaten dena. Hori dela eta, tratamendu berrien ikerketak garrantzi handia hartu du.

Berrikuspen honetan ikusi bezala, jaiotza inguruko asfixia pairatzen duten jaioberrien baldintzetan, epigenetikak garrantzi handia du. Zelulek, oxigeno-gabeziaren aurrean, hainbat eraldaketa martxan jartzen dituzte baldintza hipoxikoetara moldatzeko asmoz. Hala ere, moldakuntza horiek denboran asko luzatuz gero, kalte neurologikoa areagotu dezakete. Hori dela eta, azken ikerketek aldaketa epigenetikoaren moldakuntza proposatzen dute hipoxia-iskemiak jaioberrietan dituen eraginak tratatzeko. HIF-1 $\alpha$ -ren inhibizioak, DNA metilazioen murrizketak, hantura edo apoptosia eragiten dituzten bidezidorrak inhibitzen dituzten miRNaren indukzioak eta histonen eraldaketek eragin terapeutikoa erakutsi dute hipoxia-iskemia eta gero egindako hainbat ikerketatan. Hala ere, oraindik ez da lortu tratamendu horiek entseguklikoetan ezartzeko ebidentzia nahikorik, eta, beraz, ikerketa gehiago beharrezkoak dira, argi baitago modulazio epigenetikoak abantaila handia ekar dezakeela jaiotza inguruko asfixiaren tratamenduan.

### 4. Erreferentziak

---

1. Sociedad Española de Neonatología (SENEO). Guía de Práctica Clínica sobre Encefalopatía Hipóxico-Isquémica Perinatal en el Recién Nacido. [Internet]. Sociedad Española de Neonatología (SENEO). 2015. Eskuragarri: GPC\_EHI\_2015.pdf
2. Martinello K, Hart AR, Yap S, Mitra S, Robertson NJ. Management and investigation of neonatal encephalopathy: 2017 update. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2017 Uzt; 102(4):F346-58.
3. Paneth N, Stark RI. Cerebral palsy and mental retardation in relation to indicators of perinatal asphyxia. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1983 Abe; 147(8):960-6.
4. Arnaez J, García-Alix A, Arca G, Caserío S, Valverde E, Moral MT, et al. Population-Based Study of the National Implementation of Therapeutic Hypothermia in Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Therapeutic Hypothermia and Temperature Management. 2018 Mar; 8(1):24-9.

5. Tarkowska A. Hypoxic-Ischemic Brain Injury after Perinatal Asphyxia as a Possible Factor in the Pathology of Alzheimer's Disease. In: Laboratory of Ischemic and Neurodegenerative Brain Research, Mossakowski Medical Research Institute, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland, Ryszard P, argitaratzaileak. Cerebral Ischemia [Internet]. Exon Publications; 2021 [aipatua 2022ko azaroaren 21]. or. 45-60. Eskuragarri: <https://exonpublications.com/index.php/exon/article/view/cerebral-ischemia-perinatal-asphyxia>
6. Neonatal Encephalopathy and Cerebral Palsy: Executive Summary\*: Obstetrics & Gynecology. 2004 Api; 103(4):780-1.
7. MacLennan A. A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statement. BMJ. 1999 Urr 16; 319(7216):1054-9.
8. Mota-Rojas D, Villanueva-García D, Solimano A, Muns R, Ibarra-Ríos D, Mota-Reyes A. Pathophysiology of Perinatal Asphyxia in Humans and Animal Models. Biomedicines. 2022 Ots 1; 10(2):347.
9. Sarnat HB. Neonatal Encephalopathy Following Fetal Distress: A Clinical and Electroencephalographic Study. Arch Neurol. 1976 Urr 1; 33(10):696.
10. Garcia-Alix A, Arnaez J, Herranz-Rubia N, Alarcón A, Arca G, Valverde E, et al. Ten years since the introduction of therapeutic hypothermia in neonates with perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy in Spain. Neurología (English Edition). 2022 Mar; S2173580822000189.
11. Martini S, Castellini L, Parladori R, Paoletti V, Aceti A, Corvaglia L. Free Radicals and Neonatal Brain Injury: From Underlying Pathophysiology to Antioxidant Treatment Perspectives. Antioxidants. 2021 Abe 18; 10(12):2012.
12. Jones A, Thornton C. Mitochondrial dynamics in the neonatal brain – a potential target following injury? Bioscience Reports. 2022 Mar 31; 42(3):BSR20211696.
13. Bustelo M, Barkhuizen M, van den Hove DLA, Steinbusch HWilhelmM, Bruno MA, Loidl CF, et al. Clinical Implications of Epigenetic Dysregulation in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. Front Neurol. 2020 Eka 9; 11:483.
14. Chen W, Jadhav V, Tang J, Zhang JH. HIF-1 alpha inhibition ameliorates neonatal brain damage after hypoxic-ischemic injury. In: Steiger HJ, argitaratzailea. Acta Neurochirurgica Supplements [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2008 [aipatua 2022ko azaroaren 3]. or. 395-9. (Acta Neurochirurgica Supplementum; libk. 102). Eskuragarri: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-211-85578-2\\_77](http://link.springer.com/10.1007/978-3-211-85578-2_77)
15. Gonzalez-Rodriguez PJ, Xiong F, Li Y, Zhou J, Zhang L. Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: Role of glucocorticoid receptors. Neurobiology of Disease. 2014Mai; 65:172-9.
16. Kim SH, Jeong JW, Park J, Lee JW, Seo J, Jung BK, et al. Regulation of the HIF-1 $\alpha$  stability by histone deacetylases. Oncol Rep [Internet]. 2007 Mar1 [aipatua 2022ko azaroaren 21]; Eskuragarri: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.17.3.647>
17. Newnam KM, DeLoach DL. Neonatal Hypothermia: A Method to Provide Neuroprotection After Hypoxic Ischemic Encephalopathy. Newborn and Infant Nursing Reviews. 2011 Ira;11(3):113-24.
18. Shankaran S. Hypoxic-ischemic Encephalopathy and Novel Strategies for Neuroprotection. Clinics in Perinatology. 2012 Abe;39(4):919-29.
19. Alonso-Alconada D, Broad KD, Bainbridge A, Chandrasekaran M, Faulkner SD, Kerenyi Á, et al. Brain Cell Death Is Reduced With Cooling by 3.5°C to 5°C but Increased With Cooling by 8.5°C in a Piglet Asphyxia Model. Stroke. 2015 Urt;46(1):275-8.
20. Wood T, Osredkar D, Puchades M, Maes E, Falck M, Flatebø T, et al. Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. Sci Rep. 2016 Mar;6(1):23430.

Nuria Capdet, Gorane Beldarrain, Jon Ander Alart, Marc Chillida, Antonia Ángeles Álvarez, Daniel Alonso-Alconada

21. Davidson JO, Wassink G, Draghi V, Dhillon SK, Bennet L, Gunn AJ. Limited benefit of slow rewarming after cerebral hypothermia for global cerebral ischemia in near-term fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Aza;39(11):2246-57.
22. Prabhakar NR. 2019 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Physiology.* 2020 Mar1;35(2):81-3.
23. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992 Abe;12(12):5447-54.
24. Wang GL, Semenza GL. Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry.* 1995 Urt;270(3):1230-7.
25. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 2006 Aza;70(5):1469-80.
26. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Mai27;94(11):5667-72.
27. Richard DE, Berra E, Gothi e E, Roux D, Pouyssegur J. p42/p44 Mitogen-activated Protein Kinases Phosphorylate Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and Enhance the Transcriptional Activity of HIF-1. *Journal of Biological Chemistry.* 1999 Aza;274(46):32631-7.
28. Busti F, Marchi G, Vianello A, Girelli D. Practical implications of the 2019 Nobel Prize in Physiology or Medicine: from molecular adaptation to hypoxia to novel anti-anemic drugs in the clinic. *Intern Emerg Med.* 2020 Ira;15(6):911-5.
29. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999 Mai;399(6733):271-5.
30. Ivan M, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2001 Ots;11(1):27-34.
31. Groulx I, Lee S. Oxygen-Dependent Ubiquitination and Degradation of Hypoxia-Inducible Factor Requires Nuclear-Cytoplasmic Trafficking of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Mol Cell Biol.* 2002 Abu;22(15):5319-36.
32. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev.* 2000 Urt1;14(1):34-44.
33. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF $\alpha$  Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> Sensing. *Science.* 2001 Api20;292(5516):464-8.
34. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O<sub>2</sub>-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science.* 2001 Api20;292(5516):468-72.
35. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, Bae MH, et al. Regulation and Destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-Mediated Acetylation. *Cell.* 2002 Aza;111(5):709-20.
36. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Functional Analysis of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ -mediated Transactivation. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 Urr;277(41):38723-30.
37. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine Hydroxylation of the HIF Transactivation Domain: A Hypoxic Switch. *Science.* 2002 Ots;295(5556):858-61.
38. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Eka6;92(12):5510-4.
39. Masson N, Ratcliffe PJ. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O<sub>2</sub> levels. *Journal of Cell Science.* 2003 Abu1;116(15):3041-9.
40. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. Sequence Determinants in Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  for Hydroxylation by the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *Journal of Biological Chemistry.* 2002 Urr;277(42):39792-800.

41. Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, Smith TJ, Ramakrishnan S, Hütter J, et al. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002 Abu;296(2):343-9.
42. Lieb ME, Menzies K, Moschella MC, Ni R, Taubman MB. Mammalian *EGLN* genes have distinct patterns of mRNA expression and regulation. *Biochem Cell Biol*. 2002 Abu1;80(4):421-6.
43. Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Mai;16(5):564-71.
44. Trasler JM. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. *Reprod Fertil Dev*. 2006;18(2):63.
45. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Urr;28(10):1057-68.
46. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006 Ots;31(2):89-97.
47. Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer*. 2008 Eka;98(12):1881-5.
48. Ma Q, Xiong F, Zhang L. Gestational hypoxia and epigenetic programming of brain development disorders. *Drug Discovery Today*. 2014 Abe;19(12):1883-96.
49. Ma Q, Zhang L. Epigenetic programming of hypoxic-ischemic encephalopathy in response to fetal hypoxia. *Progress in Neurobiology*. 2015 Urt;124:28-48.
50. Mohr F, Döhner K, Buske C, Rawat VPS. TET Genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Experimental Hematology*. 2011 Mar;39(3):272-81.
51. Watson JA, Watson CJ, McCann A, Baugh J. Epigenetics: The epicenter of the hypoxic response. *Epigenetics*. 2010 Mai16;5(4):293-6.
52. Walczak-Drzewiecka A, Ratajewski M, Pułaski Ł, Dastyk J. DNA methylation-dependent suppression of HIF1A in an immature hematopoietic cell line HMC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010 Urt;391(1):1028-32.
53. Koslowski M, Luxemburger U, Türeci Ö, Sahin U. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1 $\alpha$ . *Oncogene*. 2011 Ots17;30(7):876-82.
54. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Urr11;91(21):9700-4.
55. Place TL, Fitzgerald MP, Venkataraman S, Vorrink SU, Case AJ, Teoh MLT, et al. Aberrant Promoter CpG Methylation Is a Mechanism for Impaired PHD3 Expression in a Diverse Set of Malignant Cells. *Sturtevant J, argitaratzailea. PLoS ONE*. 2011 Urt28;6(1):e14617.
56. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Uzt1;5(7):522-31.
57. Chan YC, Banerjee J, Choi SY, Sen CK. miR-210: The Master Hypoxamir: miR-210: The Master Hypoxamir. *Microcirculation*. 2012 Api;19(3):215-23.
58. Miller MA, Zachary JF. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease [Internet]*. Elsevier; 2017 [aipatua 2022ko azaroaren 3]. or. 2-43.e19. Eskuragarri: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323357753000011>
59. Wang F, Xiong L, Huang X, Zhao T, Wu L ying, Liu Z hui, et al. miR-210 suppresses BNIP3 to protect against the apoptosis of neural progenitor cells. *Stem Cell Research*. 2013 Uzt;11(1):657-67.

Nuria Capdet, Gorane Beldarrain, Jon Ander Alart, Marc Chillida, Antonia Ángeles Álvarez, Daniel Alonso-Alconada

60. Chio CC, Lin JW, Cheng HA, Chiu WT, Wang YH, Wang JJ, et al. MicroRNA-210 targets antiapoptotic Bcl-2 expression and mediates hypoxia-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Arch Toxicol.* 2013 Mar;87(3):459-68.
61. Perez-Perri JI, Acevedo JM, Wappner P. Epigenetics: New Questions on the Response to Hypoxia. *IJMS.* 2011 Uzt21;12(7):4705-21.
62. Hayes JJ, Hansen JC. Nucleosomes and the chromatin fiber. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2001 Api;11(2):124-9.
63. Kouzarides T. SnapShot: Histone-Modifying Enzymes. *Cell.* 2007 Aza;131(4):822-822.e1.
64. Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics.* 2016 Urt;32(1):42-56.
65. Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Mai;13(5):297-311.
66. Xia X, Lemieux ME, Li W, Carroll JS, Brown M, Liu XS, et al. Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Mar17;106(11):4260-5.
67. Zhou X, Sun H, Chen H, Zavadil J, Kluz T, Arita A, et al. Hypoxia Induces Trimethylated H3 Lysine 4 by Inhibition of JARID1A Demethylase. *Cancer Research.* 2010 Mai15;70(10):4214-21.
68. Brandl A, Heinzl T, Krämer OH. Histone deacetylases: salesmen and customers in the post-translational modification market. *Biology of the Cell.* 2009 Api;101(4):193-205.
69. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, et al. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Aza12;93(23):12969-73.
70. Kato H, Tamamizu-Kato S, Shibasaki F. Histone Deacetylase 7 Associates with Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  and Increases Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Urr;279(40):41966-74.
71. Seo HW, Kim EJ, Na H, Lee MO. Transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by HDAC4 and HDAC5 involves differential recruitment of p300 and FIH-1. *FEBS Letters.* 2009 Urt5;583(1):55-60.
72. Kalkhoven E. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochemical Pharmacology.* 2004 Ira;68(6):1145-55.
73. Ruas JL, Berchner-Pfannschmidt U, Malik S, Gradin K, Fandrey J, Roeder RG, et al. Complex Regulation of the Transactivation Function of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  by Direct Interaction with Two Distinct Domains of the CREB-binding Protein/p300. *Journal of Biological Chemistry.* 2010 Urt;285(4):2601-9.
74. Chen H, Yan Y, Davidson TL, Shinkai Y, Costa M. Hypoxic Stress Induces Dimethylated Histone H3 Lysine 9 through Histone Methyltransferase G9a in Mammalian Cells. *Cancer Research.* 2006 Ira15;66(18):9009-16.
75. Johnson AB, Denko N, Barton MC. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2008 Api;640(1-2):174-9.