



ACTUALIDAD

Programación epigenética placentaria en restricción del crecimiento intrauterino[☆]



Paola Casanello^{a,b,*}, José A. Castro-Rodríguez^b, Ricardo Uauy^b y Bernardo J. Krause^b

^a División de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

^b División de Pediatría, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

Recibido el 19 de abril de 2016; aceptado el 28 de abril de 2016

Disponible en Internet el 18 de mayo de 2016

PALABRAS CLAVE

Restricción del crecimiento intrauterino;
Placenta;
Óxido nítrico;
Epigenética

Resumen La restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) es una enfermedad perinatal que afecta la trayectoria de crecimiento fetal, llegando a estar bajo el percentil 10 del peso esperado para la edad gestacional. Esta condición se ha asociado con un mayor riesgo cardiovascular, metabólico y de obesidad en la vida posnatal. Junto con ello se observan cambios importantes en la función placentaria, y particularmente en una molécula clave en esta regulación, que es el óxido nítrico. La síntesis del óxido nítrico presenta numerosos mecanismos de control, así como de competencia por su sustrato común, el amino ácido L-arginina, con la arginasa. Esta competencia queda de manifiesto en diversas enfermedades vasculares, y particularmente en el endotelio de los vasos umbilicales de fetos con RCIU. Junto con ello se puede observar una regulación a nivel epigenético, donde la metilación en regiones específicas de los promotores de algunos genes, como el de la sintasa del óxido nítrico regulan su expresión. Es de gran interés en la actualidad conocer los mecanismos por los cuales enfermedades como la RCIU pudieran estar condicionadas particularmente por condiciones nutricionales y metabólicas maternas y los mecanismos epigenéticos que pudieran ser eventualmente modificables y, por tanto, foco de interés para intervenciones en salud.

© 2016 Sociedad Chilena de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la CC BY-NC-ND licencia (<http://creativecommons.org/licencias/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Intrauterine growth restriction;
Placenta;
Nitric oxide;
Epigenetics

Placental epigenetic programming in intrauterine growth restriction (IUGR)

Abstract Intrauterine growth restriction (IUGR) is a perinatal condition affecting foetal growth, with under the 10th percentile of the weight curve expected for gestational age. This condition has been associated with higher cardiovascular and metabolic risk and post-natal obesity. There are also major changes in placental function, and particularly in a key molecule

[☆] Esta *Actualidad* forma parte de un ciclo de 5 actualidades consecutivas sobre el tema de epigenética, a ser publicadas en los números de 1 a 5, Vol. 87 de la Revista Chilena de Pediatría 2016.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pcasane@uc.cl (P. Casanello).

in this regulation, nitric oxide. The synthesis of nitric oxide has numerous control mechanisms and competition with arginase for their common substrate, the amino acid L-arginine. This competition is reflected in various vascular diseases and particularly in the endothelium of the umbilical vessels of babies with IUGR. Along with this, there is regulation at the epigenetic level, where methylation in specific regions of some gene promoters, such as the nitric oxide synthase, regulating their expression. It is currently of great interest to understand the mechanisms by which diseases such as IUGR may be conditioned, particularly by maternal nutritional and metabolic conditions, and epigenetic mechanisms that could eventually be modifiable, and thus a focus of interest for health interventions.

© 2016 Sociedad Chilena de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Programación intrauterina

La asociación entre los estímulos ambientales que ocurren durante el desarrollo embrionario y fetal y la salud en la vida adulta ha pasado a ser una fuente de explicación para la elevada prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles (por ejemplo obesidad, diabetes, dislipidemia e hipertensión). Estudios epidemiológicos en los años 80 en el Reino Unido mostraron una importante correlación entre los resultados perinatales (por ejemplo peso al nacer y ganancia de peso posnatal) con un aumento de riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2¹. A partir de estas observaciones un importante número de estudios donde se usaron modelos animales para simular condiciones de déficit de nutrientes durante la gestación, han evidenciado los efectos deletéreos de la malnutrición materna, la disfunción placentaria, la hipoxia y otros factores (esto es: tabaco, contaminantes ambientales, etc.) sobre el desarrollo temprano y sus consecuencias sobre la salud en la vida adulta². Cabe destacar que como período de desarrollo temprano no solo se considera el período intrauterino, sino también el período periconcepcional y la vida posnatal. Es así que el concepto original «programación fetal» acuñado por el Dr. David Barker (originalmente denominado hipótesis de Barker) es llamado en la actualidad «origen temprano de la salud y enfermedad» o en inglés *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD), y para los fines de esta revisión se denominará programación intrauterina (fig. 1).

La programación intrauterina puede ser considerada como el establecimiento de una respuesta alterada a nivel celular o sistémico, como el resultado de un estímulo anormal que ocurre en un momento del desarrollo (período periconcepcional, embrionario, fetal o posnatal)³. Estos estímulos anormales inducen cambios fisiológicos fetales, los cuales son considerados respuestas adaptativas que le permiten al sujeto enfrentar posibles condiciones ambientales en el momento de nacer⁴. La persistencia y reproducibilidad de los fenotipos cardiometabólicos inducidos por condiciones adversas durante la vida perinatal han permitido evidenciar que habría mecanismos epigenéticos que participarían en esta programación a nivel celular⁵. Existe creciente evidencia que destaca la presencia de marcadores epigenéticos en genes cuya transcripción está alterada (regulada positiva o negativamente) en sujetos con intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2⁶. No existe en la



Figura 1 Propuesta de la programación epigenética de la función vascular en la RCIU. Se propone que, en un ambiente intrauterino alterado, que cursa con alteración en la función placentaria e hipoxia fetal crónica, el feto responde redistribuyendo sus flujos sistémicos y limitando el crecimiento fetal. En estas condiciones se ha visto que existen cambios en la estructura de la cromatina que alteran la expresión de genes clave para la función vascular. Estos cambios determinan la flexibilidad fenotípica de estos tipos celulares que condicionarían la capacidad de respuesta a una noxa posnatal, como la hipoxia.

actualidad muchos grupos, aparte del nuestro, que hayan contribuido con evidencia de la programación epigenética a nivel vascular secundario a un ambiente intrauterino adverso⁷, a pesar del alto impacto de los procesos epigenéticos en el desarrollo vascular, su fisiología y fisiopatología⁸.

La programación intrauterina se ha asociado al bajo peso de nacimiento, particularmente la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU). La RCIU se define como aquel feto que no alcanza su potencial de crecimiento, y clínicamente se diagnostica cuando el peso estimado fetal cae bajo el percentil 10 para la edad gestacional, de acuerdo a

la curva de referencia nacional⁹. Sin embargo, en los últimos años se ha hecho un esfuerzo por afinar esta definición, considerando la influencia en la salud materna pregestacional y gestacional, el crecimiento potencial del feto por etnicidad, la función placentaria y otros factores que afectan el tamaño fetal¹⁰. Como factor independiente, el bajo peso al nacer, que en Chile alcanza el 3-10% de los recién nacidos¹¹, se asocia a un aumento en la tasa de morbilidad perinatal¹². La etiología de la RCIU sigue siendo desconocida, sin embargo existen determinantes maternos, fetales y placentarios entre los cuales destaca la malnutrición materna, el tabaquismo, el estrés y la disfunción vascular placentaria¹³. La RCIU no tiene solo efectos deletéreos sobre la salud perinatal, sino que particularmente aumenta el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles en la adultez¹⁴.

El patrón de crecimiento fetal es determinado por las condiciones de salud materna y la función placentaria. La placenta es el órgano principal encargado de percibir las señales maternas y ambientales y señaliza hacia el feto liberando factores de crecimiento y regulando la disponibilidad de nutrientes¹⁵. Tan pronto como ocurre la concepción, la nutrición materna y la hipoxia a la que está expuesta el blastocisto regulan su crecimiento, limitando el número de células del trofoblasto y el desarrollo placentario posterior¹⁶. En este contexto el desarrollo y función de la placenta, como órgano clave en el transporte de nutrientes y oxígeno al feto en desarrollo, y el transporte inverso de los desechos metabólicos hacia la circulación materna, se convierten en un aspecto central para el crecimiento y desarrollo fetal normal con importantes consecuencias en la edad adulta.

Función placentaria en restricción del crecimiento intrauterino

Durante la gestación una adecuada función placentaria representa un factor crucial para el desarrollo fetal¹⁷. De hecho, la disfunción placentaria representa la principal causa de restricción del crecimiento fetal¹⁸, parto prematuro y preeclampsia, entre otras enfermedades perinatales. En la medida que el embarazo avanza ocurre un constante ajuste en el flujo sanguíneo hacia la placenta, con el fin de garantizar un adecuado crecimiento fetal¹⁹. La estructura vascular de la placenta representa una circulación de baja presión y alto flujo, cuyo principal punto de regulación es el lecho arterial coriónico²⁰. La mayor parte de la biología celular y molecular, así como la fisiología del endotelio placentario se ha estudiado en la vena umbilical, que transporta la sangre arterial desde la placenta hacia el feto. Sin embargo, el lecho placentario arterial es el principal sistema comprometido en la regulación del índice de intercambio vellosos y la resistencia vascular asociada a disfunción placentaria²¹. Además, la función anormal de los vasos de resistencia placentaria se asocia con una alterada estructura y función de los vasos umbilicales, haciéndose clínicamente evidente en las arterias umbilicales²². Por consiguiente, sería interesante estudiar los mecanismos de regulación involucrados en la programación intrauterina del endotelio de la arteria umbilical y coriónica en condiciones perinatales asociados a la disfunción placentaria.

Debido a la falta de inervación de la placenta, factores hormonales y locales, como los derivados de endotelio, ejercen un control efectivo sobre el tono vascular local²⁰. El vasodilatador clave en el lecho vascular placentario es el óxido nítrico (NO), un radical libre sintetizado principalmente por la sintasa del NO endotelial (eNOS), cuya actividad se incrementa en respuesta a estrés tangencial y, en menor grado, por moléculas vasoactivas como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina²³. El flujo sanguíneo feto-placentario es esencial para el intercambio de nutrientes entre la madre y el feto en crecimiento, para lo cual la regulación de la reactividad vascular de arterias y venas de la placa coriónica son de la mayor importancia²⁴. El lecho vascular placentario es muy distinto al de otras circulaciones sistémicas, no solo en su estructura²⁵, la carencia de inervación, sino también en su capacidad de respuesta a agentes vasoactivos exógenos. Evidencias experimentales provenientes de cotiledones placentarios perfundidos demuestran el importante papel del NO en el lecho vascular placentario, donde la inhibición del NO conduce a un aumento del tono vascular placentario²⁴. Sin embargo, las venas y arterias de placa coriónica responden mal a agonistas clásicos dependientes de endotelio, tales como la acetilcolina y la bradiquinina, y presentan respuestas mínimas a histamina²⁰. Es así como existe una fuerte dependencia de la vasodilatación mediada por flujo en el lecho vascular placentario²⁶. El flujo sanguíneo a través de una arteria produce estrés tangencial sobre el endotelio, conocida como estrés de roce. Esto conduce a la fosforilación de la proteína eNOS en residuos activadores, promoviendo la síntesis de NO, y en el largo plazo a una mayor expresión de la eNOS a través de la activación de factores de transcripción que se unen a un elemento de respuesta al estrés tangencial en la región promotora del gen de eNOS^{27,28}.

Los datos clínicos han demostrado que en embarazos con RCIU la función vascular placentaria está deteriorada: el flujo placentario está disminuido y existe un aumento en la resistencia vascular en las arterias umbilicales²⁹. En este contexto los cultivos primarios de células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC), derivadas de fetos con RCIU, presentan una expresión alterada de proteínas relacionadas con la vía L-arginina/NO. HUVEC de RCIU presentan baja expresión y actividad de eNOS y del transportador de aminoácidos catiónicos-1 (hCAT1)^{30,31}. Este patrón de expresión puede ser inducido exponiendo HUVEC de gestaciones normales a hipoxia experimental (2% de O₂). Nuestro grupo ha mostrado que en el endotelio derivado de arterias coriónicas y umbilicales se puede observar además cambios en la respuesta vasodilatadora a agonistas dependientes del endotelio³².

Regulación de la síntesis de óxido nítrico

El óxido nítrico es una de las moléculas de señalización más pleiotrópicas a nivel sistémico y celular; participa en la regulación del tono vascular, neurotransmisión, respuesta inmune, respiración celular, proliferación, apoptosis y en la expresión de genes³³. Estos efectos son altamente dependientes de la concentración de NO y, por lo tanto, fuertemente relacionados con la regulación de la actividad de la NOS³⁴. Esta molécula de señalización es generada por la oxidación del aminoácido catiónico L-arginina a L-citrulina

y NO en una reacción que requiere cofactores tales como calmodulina, NADPH, FAD, FMN y tetrahidrobiopterina. Esta reacción es catalizada por la familia de las NOS codificadas por 3 genes diferentes, cuyas proteínas comparten ~ 60% de identidad. La fuente principal de NO a nivel vascular es la eNOS, cuya actividad está regulada por interacciones proteína-proteína, ubicación celular, modificaciones postraduccionales y la disponibilidad de sustrato y cofactores³⁵. Todos estos mecanismos se producen de manera concertada generando respuestas mediadas por NO a estímulos específicos.

Fosforilación de sintasas de óxido nítrico endotelial

Las modificaciones postraduccionales de la eNOS representan uno de los más importantes mecanismos de regulación de esta enzima. La eNOS puede ser fosforilada en 4 residuos de serina (Ser 114, 615, 635 y 1177) y 2 de treonina (Thr 81 y 495). El estado de fosforilación de estos sitios es bajo control de las proteinquinas AMPK, CAMKII, PKA, Akt y PKC, y de las fosfatasa PP2A y PP2B, que se regulan en respuesta a estrés tangencial, insulina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina y VEGF³⁵. Cabe mencionar que la fosforilación en Thr-495 y Ser-1177 son las modificaciones postraduccionales más importantes, induciendo inhibición de eNOS a largo plazo³⁶ o su activación³⁷, respectivamente. Estudios iniciales sugirieron que la localización de eNOS regula fuertemente su actividad permitiendo el acceso a diferentes «pools de L-arginina»³⁸. Sin embargo, Boo et al.³⁹ mostraron que las fosforilaciones activadoras de eNOS aumentan la síntesis de NO independientemente de la localización celular. Al parecer, dirigir la eNOS a diferentes compartimentos celulares controlaría el acceso de las quinasas y fosfatasas que regulan la eNOS y que pueden activar la enzima de un modo independiente de calcio^{40,41}. En conjunto estos resultados demuestran que el estado de fosforilación de eNOS puede reflejar la actividad *in vivo* de esta enzima.

Arginasa-2, una enzima que contrarresta la actividad de sintasa del óxido nítrico endotelial

Como se mencionó anteriormente, la actividad de eNOS depende en gran medida de la disponibilidad de su sustrato L-arginina. Las enzimas relacionadas con el metabolismo de este aminoácido, como las arginasas, han aparecido en la última década como factores determinantes que podrían regular la síntesis de NO por el endotelio modulando la función vascular⁴². Se han descrito 2 isoformas de arginasas, arginasa-1 y -2, que catalizan la conversión de L-arginina a L-ornitina y urea. La arginasa-2 es la isoforma principal expresada en ratón y en células endoteliales humanas de varios lechos vasculares, incluyendo los vasos umbilicales^{43,44}, mientras que la arginasa-1 se expresa en el endotelio de la rata. Su expresión es inducida por hipoxia^{43,45}, una condición asociada a enfermedades del embarazo tales como la RCIU y preeclampsia⁴⁶. Sin embargo, no se ha descrito si arginasa-2 desempeña un papel fisiológico en la modulación de la síntesis de NO por el endotelio en la microcirculación placentaria. Dado que un aumento en la actividad de arginasa contrarresta la actividad de eNOS, y

la actividad catalítica máxima (V_{max}/K_m) de las arginasas es mayor que los valores reportados para eNOS, se ha afirmado que la síntesis de NO está limitada por privación de sustrato cuando aumenta la actividad y/o expresión de las arginasas mediante la llamada regulación recíproca eNOS-arginasa⁴². Existe contundente y creciente evidencia que muestra que la expresión de arginasa-2 puede tener un impacto sobre la reactividad vascular, y en arterias coriónicas de placentas de RCIU se observa un aumento en el tono vascular y una menor vasorelajación en respuesta a estímulos dependientes de endotelio, un mecanismo en el que participa arginasa-2³².

Participación de la hipoxia en la disfunción placentaria-umbilical en restricción del crecimiento intrauterino

La hipoxia y el estrés oxidativo son estímulos que están interrelacionados y controlan el desarrollo embrionario y fetal, la función placentaria y la fisiología vascular. La RCIU se caracteriza por hipoxia crónica feto-placentaria y estrés oxidativo, los cuales conducen a disfunción vascular placentaria y a programación intrauterina de enfermedades vasculares y metabólicas⁴⁷. La hipoxia es un factor importante que regula el desarrollo placentario estimulando la invasión del trofoblasto y la diferenciación, la angiogénesis y la vasculogénesis⁴⁸. El mecanismo celular gatillado por la hipoxia incluye la acumulación de factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α o 2 α , que constantemente son degradados en normoxia y la translocación de los heterodímeros de HIF (HIF-1 α /HIF-1 β o HIF-2 α /HIF-1 β) al núcleo, activando genes específicos para hacer frente a la deficiencia de oxígeno⁴⁹. La activación de la expresión génica por hipoxia se produce a través de la unión de los heterodímeros de HIF a una secuencia consenso en la región promotora de estos llamada elemento de respuesta a hipoxia (HRE), caracterizado por una alta presencia de dinucleótidos CpG⁴⁹, determinando que la unión de heterodímeros de HIF al ADN podría estar sujeta a la metilación del ADN⁵⁰. A pesar que la hipoxia aguda está relacionada con el desarrollo embrionario y vascular placentario temprano, la hipoxia crónica se asocia a menor desarrollo fetal y placentario¹³. En el embrión de ratón la mayor señalización por hipoxia, a través de HIF- α , induce un desarrollo defectuoso de las vellosidades coriónicas y del lecho vascular placentario⁵¹. Por otra parte, la hipoxia prolongada también está relacionada con apoptosis de las células endoteliales, que se produce por la activación de p53⁵² y del factor nuclear κ B (NF κ B)⁵³. La hipoxia crónica regula, en el largo plazo, la expresión de enzimas relacionadas con la vía L-arginina/NO en células endoteliales de diferentes lechos vasculares, incluyendo la placenta. Células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) normales, expuestas a hipoxia, presentan una reducción en la expresión de eNOS y CAT-1³¹, pero mayor expresión y actividad de iNOS⁵⁴, mientras que las HUVEC IUGR muestran un fenotipo persistente similar a hipoxia, incluso después de varios días de cultivo en normoxia³¹. Giannubilo et al.⁵⁵ demostraron en placenta RCIU una correlación negativa entre la expresión de eNOS y el índice de pulsatilidad de la arteria umbilical, mientras que este mismo parámetro se correlacionó positivamente con la expresión de iNOS. Estos datos refuerzan que la sobreexpresión iNOS está implicada en

la disfunción vascular placentaria, como se ha demostrado en otros lechos vasculares. Cabe destacar que en HUVEC provenientes de gestaciones que cursaron con diabetes gestacional se ha descrito una mayor expresión y la actividad de eNOS⁵⁶, sin embargo un aumento en la expresión/actividad de eNOS no se relaciona necesariamente con una mejor función vascular, especialmente en una condición que cursa con un aumento en los niveles de estrés oxidativo⁵⁷. Por otra parte, la expresión de la arginasa-2 es mayor en las células endoteliales placentarias de pacientes con preeclampsia⁵⁸ y en HUVEC de RCIU⁵⁹, y es inducido por hipoxia en HUVEC normales⁴⁵.

Mecanismos epigenéticos

La epigenética puede considerarse como «un mecanismo basado en cromosoma que cambia la plasticidad fenotípica de una célula u organismo»⁶⁰. Está claro que los mecanismos epigenéticos desempeñan un papel clave en el desarrollo, no solo controlando la diferenciación celular, sino que pueden grabar señales ambientales bajo condiciones fisiológicas⁸ y patológicas⁶¹. A la fecha los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y la sumoilación), modificaciones de la cromatina dependiente de ATP y ARN no codificantes. Estas modificaciones son controladas por actividades enzimáticas gatilladas en respuesta a diversos estímulos que determinan la fisiología celular a largo plazo. Para una revisión completa de los mecanismos epigenéticos se sugiere revisar el primer artículo de esta serie por Krause et al.⁶².

Epigenética en la fisiología endotelial

Existe limitada evidencia de la existencia de una programación epigenética de la fisiología cardiovascular durante la gestación. Por otra parte, se ha mostrado que el desarrollo vascular y la diferenciación y función endotelial requieren un fino calibre epigenético. Las primeras etapas de desarrollo vascular están determinadas por factores genéticos⁶³; sin embargo, en una segunda etapa la estructura de los vasos sanguíneos, su identidad y función están fuertemente influenciadas por factores hemodinámicos e hipoxia^{64,65}, destacando el papel de los mecanismos epigenéticos que podrían dar cuenta del transcriptoma y proteoma vascular. Las células endoteliales expresan varias proteínas célula-específica esenciales para su función fisiológica, como eNOS, el receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular 1 y el 2, y el factor von Willebrand, Tie1 y 2, entre otros. En contraste con la visión clásica que los genes específicos para cierto tipo celular estarían bajo el control de factores de transcripción específicos de esas células, las regiones promotoras de genes endoteliales específicos responden a factores de transcripción ubicuos, como las familias Sp y familias de Ets, GATA-2, AP-1 y proteínas octámeras. Por otra parte, los factores de transcripción endoteliales específicos como KLF2 y HoxA9 no explican por sí mismos los niveles de expresión de proteínas presentes en este tipo celular⁶⁶, por lo que se ha sugerido la presencia de un «código epigenético» que regularía la expresión

de genes cruciales para la función endotelial⁶⁷. Los mecanismos epigenéticos son cruciales para el desarrollo normal y la plasticidad de las células endoteliales. La actividad de las deacetilasas de histonas (HDAC) median la angiogénesis en respuesta a hipoxia, el estrés de roce tangencial y la diferenciación de células troncales por VEGF y su inhibición impide la respuesta proliferativa a VEGF. Además, la acetilación de histonas controla la expresión de vWF, NOTCH4 y eNOS^{60,65}. Por otra parte, una elevación transitoria en los niveles de D-glucosa puede generar cambios epigenéticos en cultivos de células endoteliales de ratón, relacionadas con la sobreexpresión de moléculas proinflamatorias y NfκB⁶⁸. Se ha estudiado la presencia de marcas epigenéticas en la región promotora del gen *enos* en células endoteliales y no endoteliales. Estos estudios han mostrado que las células endoteliales tienen un patrón distintivo de metilación del ADN y de modificaciones postraduccionales de histonas⁶⁶ que se asemejan a la diferenciación endotelial de células embrionarias humanas⁶⁹. Fish et al. demostraron que la disminuida expresión de eNOS en HUVEC expuesto a hipoxia es controlada por la sobreexpresión de un ARN natural cis-antisentido no codificante llamado sONE⁷⁰, y en cambio en las modificaciones postraduccionales de las histonas, las que ocurren específicamente en el promotor de eNOS⁷¹. En conjunto, estos datos demuestran que la expresión específica de eNOS en las células endoteliales es controlado por múltiples mecanismos epigenéticos.

Regulación epigenética de genes relacionados con la vía L-arginina/óxido nítrico

Como se dijo anteriormente, la expresión de proteínas relacionadas con la vía L-arginina/NO en células endoteliales está fuertemente influenciada por hipoxia y estrés oxidativo, que desempeñan un papel clave en la disfunción vascular placentaria y sistémica^{23,31,32}. La respuesta celular a estos estímulos está mediada, en parte, por la activación de HIF, NFκB y NRF2, que translocan al núcleo y se unen a sus elementos de respuesta consenso situados en las regiones promotoras de genes específicos. Cabe destacar que el motivo canónico presente en los elementos de respuesta para estos 3 factores de transcripción son secuencias de ADN ricas en CpG, por lo tanto, es concebible proponer que el estatus de metilación del ADN es un factor crítico en la regulación de la respuesta a hipoxia y estrés oxidativo.

Además, debido a la interacción entre la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas, no se puede descartar el papel de estas últimas. De hecho, la transcripción activa de eritropoyetina por HIF⁷² y de iNOS⁷³ por NFκB se relacionan inversamente con el estado de la metilación de las CpG en sus elementos de respuesta específicos. Los bajos niveles de expresión de iNOS en HUVEC normales están determinados por la alta tasa de metilación de CpG, junto con modificaciones postraduccionales de histonas represivos en la región promotora de este gen⁷⁴. Hay escasa información sobre el papel de una regulación epigenética en la expresión de eNOS, arginasa-2⁷ y genes de respuesta al estrés oxidativo en endotelio umbilical/placentario normal. Si estos mecanismos epigenéticos participan en la programación intrauterina de la función vascular en fetos con patrones de crecimiento anormales, como

RCIU, no se conoce en la actualidad. Conocer con más detalle cómo los mecanismos epigenéticos están participando en la programación vascular temprana en condiciones perinatales como la RCIU abriría la oportunidad de hacer prevención y diagnósticos tempranos, reduciendo el riesgo cardiovascular en sujetos vulnerables⁷⁵.

Epigenética y restricción del crecimiento intrauterino

Diversos estudios han mostrado expresión diferencial de marcas epigenéticas en RCIU, tanto en la placenta⁷⁶, células progenitoras/troncales hematopoiéticas CD 24⁷⁷, músculo esquelético e hígado⁷⁸, entre otros.

Particular interés tienen los estudios que se han realizado en la cohorte de sujetos que fueron expuestos *in utero* a restricción calórica de sus madres durante el invierno de 1944-1945, conocida como la cohorte de la hambruna de Holanda⁷⁹.

Este bloqueo político, ejercido a través de la restricción en el acceso a alimentos de Holanda por el gobierno alemán, duró 6 meses, los cuales afectaron a mujeres en diversas etapas de sus embarazos, algunas en la primera mitad y otras en la segunda mitad de la gestación. Las últimas tuvieron hijos que pesaron entre 400-500 g menos al nacer, las primeras, sin embargo, no tuvieron efectos importantes en el peso, pero se han descrito significativos efectos sobre la metilación de factor de crecimiento similar a insulina, que es determinante para el crecimiento fetal y de la placenta, y que tiene una impronta materna que presenta cambios significativos en su estado de metilación, y este cambio persiste hasta la edad adulta. Más estudios prospectivos son requeridos para limpiar variables que sin lugar a dudas son confundentes en estos estudios, como son el estrés físico y psicológico materno, la actividad física y la respuesta al frío, entre otros. Adicionalmente será interesante estudiar este tipo de variables en las condiciones sociodemográficas presentes en nuestro país, como es la obesidad materna pregestacional, la excesiva ganancia de peso durante la gestación, la baja ingesta de pescado (por tanto, de ácidos grasos esenciales), el sedentarismo, el estrés, etc.

Financiación

Financiado por Fondecyt Regular 1120928 (PC), 1141195 (JAC), 1130277 (RU) y 1130801 (BJK).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001;60:5-20.
- Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm Res.* 2007;68:113-23.
- Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: Causes and consequences. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:29-37.
- Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5:401-8.
- Solomons NW. Developmental origins of health and disease: Concepts, caveats, and consequences for public health nutrition. *Nutr Rev.* 2009;67 Suppl 1:S12-6.
- Devaskar SU, Thamocharan M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8:105-13.
- Krause BJ, Costello PM, Munoz-Urrutia E, Lillycrop KA, Hanson MA, Casanello P. Role of DNA methyltransferase 1 on the altered eNOS expression in human umbilical endothelium from intrauterine growth restricted fetuses. *Epigenetics.* 2013;8:944-52.
- Ohtani K, Dimmeler S. Epigenetic regulation of cardiovascular differentiation. *Cardiovasc Res.* 2011;90:404-12.
- Alarcón J, Alarcón Y, Hering E, Buccioni R. Curvas antropométricas de recién nacidos chilenos. *Rev Chil Pediatr.* 2008;79:364-72.
- Zhang J, Merialdi M, Platt LD, Kramer MS. Defining normal and abnormal fetal growth: Promises and challenges. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202:522-8.
- Carvajal JA, Vera C, Vargas P, Jordan F, Patillo A, Oyarzun E. [Under diagnosis of fetal growth restriction by the new growth curves of the Chilean Ministry of Health]. *Rev Med Chil.* 2007;135:436-42.
- Pallotto EK, Kilbride HW. Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006;49:257-69.
- Hendrix N, Berghella V. Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol.* 2008;32:161-5.
- Crispi F, Bijnens B, Figueras F, et al. Fetal growth restriction results in remodeled and less efficient hearts in children. *Circulation.* 2010;121:2427-36.
- Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: Underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond).* 2007;113:1-13.
- Gagnon R. An obstetric point of view on fetal adaptation and reprogramming. *NeoReviews.* 2006;7:e189-94.
- Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. *J Neuroendocrinol.* 2008;20:439-50.
- Gatford KL, Simmons RA, de Blasio MJ, Robinson JS, Owens JA. Review: Placental programming of postnatal diabetes and impaired insulin action after IUGR. *Placenta.* 2010;31 Suppl:S60-5.
- Sutton MS, Theard MA, Bhatia SJ, Plappert T, Saltzman DH, Doubilet P. Changes in placental blood flow in the normal human fetus with gestational age. *Pediatr Res.* 1990;28:383-7.
- Poston L. The control of blood flow to the placenta. *Exp Physiol.* 1997;82:377-87.
- Adamson SL. Arterial pressure, vascular input impedance, and resistance as determinants of pulsatile blood flow in the umbilical artery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;84:119-25.
- Raio L, Ghezzi F, Di Naro E, Duwe DG, Cromi A, Schneider H. Umbilical cord morphologic characteristics and umbilical artery Doppler parameters in intrauterine growth-restricted fetuses. *J Ultrasound Med.* 2003;22:1341-7.
- Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta.* 2011;32:797-805.
- Myatt L. Control of vascular resistance in the human placenta. *Placenta.* 1992;13:329-41.
- Sweeney M, Jones CJ, Greenwood SL, Baker PN, Taggart MJ. Ultrastructural features of smooth muscle and endothelial cells of isolated isobaric human placental and maternal arteries. *Placenta.* 2006;27:635-47.

26. Learthmont JG, Poston L. Nitric oxide is involved in flow-induced dilation of isolated human small fetoplacental arteries. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:583–8.
27. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: Role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285:C499–508.
28. Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Mechanisms of shear stress-induced endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod.* 2004;70:785–96.
29. Pardi G, Marconi AM, Cetin I. Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses—a review. *Placenta.* 2002;23 Suppl A:S136–41.
30. Casanello P, Sobrevia L. Intrauterine growth retardation is associated with reduced activity and expression of the cationic amino acid transport systems $y^+/hCAT-1$ and $y^+/hCAT-2B$ and lower activity of nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res.* 2002;91:127–34.
31. Casanello P, Krause B, Torres E, et al. Reduced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells from intrauterine growth restriction pregnancies is not further altered by hypoxia. *Placenta.* 2009;30:625–33.
32. Krause BJ, Carrasco-Wong I, Caniguier A, Carvajal J, Farias M, Casanello P. Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta.* 2013;34:20–8.
33. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S193–201.
34. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:18–31.
35. Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev.* 2009;89:481–534.
36. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 2001;88:E68–75.
37. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601–5.
38. Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Forstermann U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: Role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol.* 2000;57:68–74.
39. Boo YC, Kim HJ, Song H, Fulton D, Sessa W, Jo H. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:144–53.
40. Boo YC, Sorescu GP, Bauer PM, et al. Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase. *Free Radical Biology and Medicine.* 2003;35:729–41.
41. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, et al. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 2000;275:5179–87.
42. Santhanam L, Christianson DW, Nyhan D, Berkowitz DE. Arginase and vascular aging. *J Appl Physiol.* 2008;105:1632–42.
43. Prieto CP, Krause BJ, Quezada C, San Martin R, Sobrevia L, Casanello P. Hypoxia-reduced nitric oxide synthase activity is partially explained by higher arginase-2 activity and cellular redistribution in human umbilical vein endothelium. *Placenta.* 2011;32:932–40.
44. Krause BJ, Prieto CP, Munoz-Urrutia E, San Martin S, Sobrevia L, Casanello P. Role of arginase-2 and eNOS in the differential vascular reactivity and hypoxia-induced endothelial response in umbilical arteries and veins. *Placenta.* 2012;33:360–6.
45. Prieto CP, Krause B, Sobrevia L, Casanello P. Hypoxia-reduced eNOS activity could be explained by higher arginase II activity and cellular redistribution in human umbilical vein endothelial cells. *Reprod Sci.* 2010;17, 298a–298a.
46. Casanello P, Escudero C, Sobrevia L. Equilibrative nucleoside (ENTs) and cationic amino acid (CATs) transporters: Implications in foetal endothelial dysfunction in human pregnancy diseases. *Curr Vasc Pharmacol.* 2007;5:69–84.
47. Herrera EA, Krause B, Ebensperger G, et al. The placental pursuit for an adequate oxidant balance between the mother and the fetus. *Front Pharmacol.* 2014;5:149.
48. Burton GJ. Oxygen the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat.* 2009;215:27–35.
49. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors—similar but not identical. *Mol Cells.* 2010;29:435–42.
50. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: The mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006;31:89–97.
51. Takeda N, O’Dea EL, Doedens A, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 2010;24:491–501.
52. Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, et al. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:8039–45.
53. Matsushita H, Morishita R, Nata T, et al. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: In vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation. *Circ Res.* 2000;86:974–81.
54. Ock CY, Hong KS, Choi KS, et al. A novel approach for stress-induced gastritis based on paradoxical anti-oxidative and anti-inflammatory action of exogenous 8-hydroxydeoxyguanosine. *Biochem Pharmacol.* 2011;81:111–22.
55. Giannubilo SR, Menegazzi M, Tedeschi E, Bezzeccheri V, Suzuki H, Tranquilli AL. Doppler analysis and placental nitric oxide synthase expression during fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonat.* 2008;21:617–22.
56. Sobrevia L, Abarzua F, Nien JK, et al. Review: Differential placental macrovascular and microvascular endothelial dysfunction in gestational diabetes. *Placenta.* 2011;32 Suppl 2:S159–64.
57. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta.* 2010;31 Suppl:S66–9.
58. Noris M, Todeschini M, Cassis P, et al. L-arginine depletion in pre-eclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species. *Hypertension.* 2004;43:614–22.
59. Munoz E, Krause B, Prieto C, Lavin C, Sobrevia L, Casanello P. Participation of arginases in the vascular tone in umbilical vein from iugr placentae: Role of the endothelium and hypoxia. *Placenta.* 2010;31. A82–A82.
60. Krause B, Sobrevia L, Casanello P. Epigenetics: New concepts of old phenomena in vascular physiology. *Curr Vasc Pharmacol.* 2009;7:513–20.
61. Ordovas JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7:510–9.
62. Krause BJ, Castro-Rodriguez JA, Uauy R, Casanello P. [General concepts of epigenetics: Projections in paediatrics]. *Rev Chil Pediatr.* 2016;87:4–10.
63. Hamik A, Wang B, Jain MK. Transcriptional regulators of angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1936–47.
64. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis.* 2009;12:101–11.

65. Casanello P, Schneider D, Herrera EA, Uauy R, Krause BJ. Endothelial heterogeneity in the umbilico-placental unit: DNA methylation as an inuendo of epigenetic diversity. *Front Pharmacol.* 2014;5:49.
66. Fish JE, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:144–62.
67. Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res.* 2008;102:873–87.
68. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med.* 2008;205:2409–17.
69. Lagarkova MA, Volchkov PY, Philonenko ES, Kiselev SL. Efficient differentiation of hESCs into endothelial cells in vitro is secured by epigenetic changes. *Cell Cycle.* 2008;7:2929–35.
70. Fish JE, Matouk CC, Yeboah E, et al. Hypoxia-inducible expression of a natural cis-antisense transcript inhibits endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2007;282:15652–66.
71. Fish JE, Yan MS, Matouk CC, et al. Hypoxic repression of endothelial nitric-oxide synthase transcription is coupled with eviction of promoter histones. *J Biol Chem.* 2010;285:810–26.
72. Rossler J, Stolze I, Frede S, et al. Hypoxia-induced erythropoietin expression in human neuroblastoma requires a methylation free HIF-1 binding site. *J Cell Biochem.* 2004;93:153–61.
73. Yu Z, Kone BC. Hypermethylation of the inducible nitric-oxide synthase gene promoter inhibits its transcription. *J Biol Chem.* 2004;279:46954–61.
74. Chan GC, Fish JE, Mawji IA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA. Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J Immunol.* 2005;175:3846–61.
75. Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: Theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011;106(1):272–80.
76. Banister CE, Koestler DC, Maccani MA, Padbury JF, Houseman EA, Marsit CJ. Infant growth restriction is associated with distinct patterns of DNA methylation in human placentas. *Epi-genetics.* 2011;6:920–7.
77. Delahaye F, Wijetunga NA, Heo HJ, et al. Sexual dimorphism in epigenomic responses of stem cells to extreme fetal growth. *Nat Commun.* 2014;5:5187.
78. Martinez D, Pentinat T, Ribo S, et al. In utero undernutrition in male mice programs liver lipid metabolism in the second-generation offspring involving altered Lxra DNA methylation. *Cell Metab.* 2014;19:941–51.
79. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:17046–9.