VARIANTES GENÉTICAS RARAS ASOCIADAS A INFARTO ARTERIAL CEREBRAL NEONATAL

Dr. Alfredo García Alix
Hospital Sant Joan de Déu - Esplugues de Llobregat

1. Resumen

Hipótesis

La vulnerabilidad al ictus isquémico arterial neonatal (NAIS) esporádico en recién nacidos a término se asocia con variantes raras *de novo* en genes involucrados en la reología endotelial, la coagulación y la adhesión celular. El enfoque genético de tríos WES permitirá la identificación de estas variantes y las vías subyacentes causantes de enfermedades en subgrupos homogéneos de pacientes.

Objetivo

Investigar la contribución de variantes genéticas raras al riesgo de accidente cerebrovascular isquémico arterial neonatal centrándose en las regiones codificadoras de proteínas del genoma humano.

Objetivos secundarios

a) Identificar variantes patogénicas raras *de novo* que puedan derivar en la causa del NAIS. **b**) Descubrir un determinante genético común importante en grupos subclínicos que pueda influir en el desarrollo de la enfermedad. **c**) Evaluar *in silico* el hipotético impacto patogénico de las variantes identificadas como posibles candidatas. **d**) Examinar si un fenotipo clínico homogéneo específico en NAIS podría ser determinado por un factor genético específico. **e**) Descifrar la asociación entre el gen candidato y el NAIS identificando los mecanismos biológicos relevantes implicados.

Diseño, procedimientos y métodos

Diseño

Se trata de un estudio observacional multicéntrico nacional transversal para la identificación y caracterización genética de pacientes con NAIS. Además, los datos clínicos se obtienen prospectivamente de cada hospital involucrado en el estudio.
El estudio se llevó a cabo con el consentimiento entendido y por escrito de los padres de cada paciente, con la aprobación del comité de ética de investigación de cada centro y en cumplimiento de la legislación nacional y la Declaración de Helsinki.

Entorno: 6 hospitales universitarios (España) participarán en el estudio.

Pacientes:

- **Criterios de inclusión**: Recién nacidos (>36 semanas gestacionales) con NAIS sintomático con una lesión isquémica en el territorio de las principales arterias cerebrales confirmada por resonancia magnética (RMN).
- **Criterios de exclusión**: Se excluyen del estudio aquellos lactantes con NAIS asociados con meningitis, malformación vascular, deshidratación, enfermedad metabólica congénita, cardiopatías complejas congénitas, disección arterial, cirugía extracorpórea, necesidad de ECMO o que tengan trombofilia genética (*F5* G1691A, *F2* G20210A u homocigosidad para los genotipos *MTHFR* C677T), así como aquellos cuya familia se negó a participar o continuar en el estudio.

Procedimientos

- **Antecedentes familiares y enfermedades maternas**: La información familiar se obtiene a través de una entrevista específica con ambos padres y de las historias clínicas de los bebés y sus madres. Se están recolectando los siguientes datos maternos: edad, peso y estatura para calcular el índice de masa corporal (IMC), hipertensión, abortos espontáneos, síndrome antifosfolípido, tejido conectivo o enfermedades autoinmunes como lupus o dermatomiositis, trombocitosis, trombocitopenia idiopática, síndrome de ovario poliquístico, migraña, epilepsia e ingestión de anticonceptivos orales. Se obtendrá un pedigrí de tres generaciones para cada familia con respecto a 1) infarto de miocardio, 2) embolia pulmonar, 3) evento cerebrovascular y 4) trombosis venosa profunda.
- **Fenotipo clínico**: Todos los lactantes con NAIS reclutados recibirán una evaluación clínica cuidadosa durante el período neonatal y en el momento del alta. Además, se realizará una evaluación neurofisiológica continua durante los primeros días después del debut clínico, la determinación de biomarcadores de daño cerebral en LCR (enolasa específica de las neuronas) y estudios de neuroimagen multimodal con RM (T1W, T2W, DWI, ADC, DTI, TOF) durante el período neonatal.
- **Adquisición de datos de resonancia magnética**: La resonancia magnética se realizará en un escáner de excitación de señal de 1,5 T de General Electric utilizando una bobina de cabeza neonatal específica siguiendo el protocolo clínico de resonancia magnética para neonatos con sospecha de NAIS. El estudio de resonancia magnética se realiza dentro de los 7 días posteriores a la aparición de los síntomas

neurológicos. Se ha publicado el protocolo, así como el análisis y la segmentación de lesiones.

- **Análisis de imágenes de resonancia magnética individual y segmentación de lesiones cerebrales**: El proceso de segmentación de lesiones ha sido descrito en detalle en una publicación de nuestro grupo. Lo realizamos a través del análisis multimodal de imágenes de resonancia magnética con el software ITK-Snap, versión 3.0 (http://www.itksnap.org). Para mostrar simultáneamente imágenes de las diferentes modalidades de adquisición, se utiliza la función *flirt* de transformación lineal de la *suite* FSL, versión 5.0 (http://fsl.fmrib.ox.ac.uk). La función de preprocesamiento de la competencia regional de ITK-Snap se aplica utilizando la agrupación de 5 tejidos, la fuerza de competencia de la región 0.5 y la fuerza de suavizado de 0.5. Una vez que se alcanza una segmentación satisfactoria de la lesión en el paso de evolución, se corrige manualmente inspeccionando simultáneamente sus características en todas las modalidades de imagen, así como su visualización 3D. En este paso, se alcanzará el consenso de 3 expertos ciegos al diagnóstico radiológico.
- **Seguimientos**: Se realizará un seguimiento de todos los pacientes y se realizarán visitas sistemáticas a los 6 meses de edad y a los 1, 2, 3 y 6 años en los diferentes centros de estudio que participan en el estudio. A los dos años, se realizan las Escalas Bayley de Desarrollo Infantil (Bayley Scales of Infant Development, BSID) junto con la evaluación de la discapacidad motora. El deterioro motor se clasifica con la Escala de Clasificación de la Función Motora Gruesa (GMFCS), de acuerdo con el nivel de habilidades motoras gruesas del niño. En esta clasificación, los pacientes se gradúan en 5 niveles: los pacientes del nivel 1 caminan sin limitaciones y los del nivel 5 necesitan una silla de ruedas manual. La herramienta Bimanual Fine Motor Function (BFMF) también se utilizará para evaluar la capacidad de agarrar, manipular y sostener objetos para cada mano por separado (nivel 0, sin impedimento; nivel 5, solo capaz de sostener o peor con ambas manos). Cada uno de los pacientes participantes será evaluado con Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence™ - Fourth Edition (WPPSITM - IV) a los 6 años de edad. Para garantizar la homogeneidad en la evaluación clínica del resultado, así como la ausencia de sesgo y la recopilación de bases de datos, tanto un neuropsicólogo que también tenga formación como logopeda como un neurólogo pediátrico, del centro coordinador, viajarán a todos los centros de estudio involucrados en el estudio. Evaluarán a los pacientes a ciegas a la historia desde el período neonatal, el perfil de desarrollo y la información de neuroimagen (volumen y distribución de la lesión isquémica). El encuentro se llevará a cabo

durante medio día entero en un entorno médico cercano a la residencia familiar. Se enviarán boletines anuales para mantener informadas a las familias de los resultados de las evaluaciones (neuroimagen y neurodesarrollo) y de las evaluaciones planificadas. Se pedirá a las familias que inviten a su médico a participar en el estudio a través de una carta de intención que explique las características del estudio.

Este estudio colaborativo multicéntrico involucra a una cohorte ecológica y única de pacientes con NAIS sintomático reclutados de varios centros siguiendo el mismo protocolo. Todos los pacientes fueron ampliamente estudiados desde un enfoque clínico, bioquímico y neurofisiológico y particularmente con el mismo protocolo de resonancia magnética.
Obtuvimos, después del consentimiento de los padres, muestras de sangre del niño que tenía NAIS y de ambos padres.

Metodología

- Extracción de ADN
- Secuenciación del exoma completo (WES)
- Anotación, filtrado y predicción de patogenicidad de las variantes
- Detección de variantes raras *de novo*
- Identificación de genes candidatos al NAIS
  - o Análisis basado en el conocimiento
  - o Ontología génica y enriquecimiento de rutas
  - o Puntuación y priorización
- Estudios funcionales del gen candidato identificado
  - o Clonación
  - o Transferencia Western
  - o Imágenes con microscopía confocal
- Análisis estadístico

2. Resultados

Hemos realizado una secuenciación del exoma completo (WES) en 23 tríos (madre-padre-hijo). En total, 1.966 variantes de los 23 tríos WES con una media de 85,5 ± 20,4 por niño cumplieron los criterios para un análisis adicional como posibles variantes *de novo* (dnv). Al aplicar la selección por la lista de genes candidatos según la fisiopatología del NAIS, ningún probando tenía variantes. Esta lista incluía genes para la adhesión celular, la coagulación, la inflamación, el accidente cerebrovascular y el endotelio. A continuación, realizamos la secuenciación Sanger de los tríos para verificar que las variantes aparecían en el paciente pero no en sus padres. De los 23 casos índice analizados, 17 (74%) portaban al menos una dnv que cumplía nuestros criterios de filtrado. Más de un caso índice tenía más de una dnv. En cinco (21,7%) niños no identificamos variantes que cumplieran nuestros criterios de filtrado (sinónimos, ubicados en regiones reguladoras o intrónicas profundas), y uno (4,3%) no tenía dnv identificadas. Posteriormente, para confirmar estos resultados en los cinco niños sin variantes que cumplían los criterios y en el niño sin dnv, se realizó un nuevo análisis menos restrictivo para garantizar que ninguna variante quedara excluida por variables bioinformáticas o errores manuales durante el flujo de trabajo de filtrado. Los resultados de los nuevos análisis corroboraron nuestros resultados anteriores. Siguiendo con el análisis de variantes, confirmamos 28 dnv únicas en 28 genes que no se incluyeron en nuestra lista de genes primarios. Además, estos 28 genes identificados eran únicos, lo que significa que los probandos no compartían ningún gen común con la variante dnv entre ellos.

Debido a estos resultados parcialmente negativos, decidimos volver a analizar los datos de los tríos WES a partir de una nueva hipótesis de una herencia recesiva asociada con NAIS. Con la hipótesis recesiva, pudimos estudiar variantes homocigotas y heterocigotas compuestas en los casos índice. La identificación y el filtrado de variantes se llevaron a cabo siguiendo los mismos criterios que en el flujo de trabajo de identificación de variantes *de novo*. De los 23 tríos WES analizados encontramos una media de 10,4 ± 4,8 y 7,3 ± 4,5 variantes homocigotas y heterocigotas compuestas, respectivamente, por niño. Sin embargo, después del filtrado posterior al análisis, ninguna de las 168 variantes homocigotas y 240 heterocigotas compuestas cumplió los criterios de filtrado ni fue relevante para un estudio más exhaustivo y futura asociación con NAIS.

Posteriormente, para identificar un determinante genético común importante, realizamos un análisis de red de interacción génica y un análisis genético de pacientes clínicamente homogéneos de acuerdo con la definición del territorio arterial afectado de la arteria cerebral media (MCA). Ninguno de los enfoques tuvo la capacidad de identificar genes con una relación potencial con NAIS. Sin embargo, el uso del análisis basado en el conocimiento para la identificación de genes candidatos identificó el gen *PIK3CD* y su variante c.1292A>G/p.Gln431Arg como un posible gen candidato a NAIS en un paciente con accidente cerebrovascular perforante. El *PIK3CD* codifica un PI3K de clase I que se une a las proteínas adaptadoras p85 y RAS unidas a GTP. Una característica relevante de esta proteína es que se fosforila a sí misma y convierte el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que recluta y activa proteínas *downstream* que contienen los dominios de homología de plecstrina. Además, el PIK3CD actúa como un segundo mensajero a través de PIP3 que ayuda a activar la alfa serina/treonina-proteína quinasa AKT. El PIK3CD forma parte de la vía de señalización celular fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3K)-Akt, que es una vía activada por muchos tipos de estímulos celulares o agresiones tóxicas y está involucrada en muchos mecanismos moleculares relevantes en el NAIS, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la tensión cortante en líquidos y las vías de activación plaquetaria.

Para investigar el impacto de la mutación en la proteína y para una mayor asociación con la fisiopatología NAIS, hemos realizado análisis *in silico* junto con la generación de un modelo de vector de expresión de mamíferos de PIK3CD salvaje y un modelo mutante (c.1292A>G/p.Gln431Arg). Los análisis *in silico* utilizando el predictor DynaMut2, tanto para el salvaje como para la variante p.Gln431Arg, demostraron que, según la energía libre de Gibbs (en Kcal/mol), la sustitución del residuo de glutamina por una arginina en la posición 431 tiene un cambio de estabilidad previsto de -0,4 Kcal/mol (ΔΔGStability) que indica una desestabilización de la proteína. El mecanismo por el cual esta variante desestabiliza la proteína se debe a la alteración de la diferente interacción entre residuos en comparación con el salvaje (Gln431). En concreto, estas alteraciones son: adquisición de una interacción hidrofóbica extra entre Arg431 y Tyr484, sustitución de un enlace de hidrógeno con Val483 por dos interacciones polares, y sustitución de un enlace de hidrógeno por una interacción iónica con Asp427 y eliminación de dos interacciones polares.

En cuanto a los vectores de expresión generados, tanto el salvaje como el mutante fueron transfectados en la línea celular COS-7 para realizar estudios funcionales basados en la localización subcelular de proteínas, la expresión de proteínas y el análisis de la vía de señalización Akt a través de la cuantificación de la relación pAKT/tAKT. Nuestros resultados demostraron que, en las condiciones probadas, no hay diferencias significativas al comparar el WT con el mutante (p = 0,700 WT vs. Gln431Arg, p = 0,609 Mock vs. Gln431Arg, p = 0,992 Mock vs. WT).

Además, la transfección celular de COS-7 indicó que la sobreexpresión de PIK3CD presenta un patrón puntiforme y un agregado grosero como localización subcelular tanto en $PIK3CD^{WT}$ como en $PIK3CD^{Gln431Arg}$. Además, la cuantificación de ambos patrones de localización subcelular mostró una diferencia significativa al comparar ambos patrones en ambos vectores de expresión. El agregado puntiforme es el patrón más predominante en $PIK3CD^{WT}$ (64%, p = 0,006), mientras que el agregado grosero es el patrón principal en $PIK3CD^{Gln431Arg}$ (64%, p = 0,006). Se necesitan más análisis y enfoques para aclarar el impacto patogénico de esta variante en PIK3CD.

El exhaustivo análisis genético de nuestra investigación, bajo herencia autosómica dominante *de novo* y autosómica recesiva de las regiones codificadoras de 23 tríos padres-índice con NAIS idiopático y el análisis subclínico homogéneo no ha permitido identificar un gen o vía común importante que pudiera explicar, o explicar parcialmente, la causa genética de la enfermedad. Además, no podemos excluir absolutamente la posibilidad de que la presencia de variaciones genéticas en el genoma sea la causa del NAIS idiopático debido a la posibilidad de que estas variantes se encuentren fuera de las regiones codificadoras, pero para explorar esto son necesarias otras estrategias y enfoques tecnológicos diseñados para analizar las regiones de ADN no codificadoras.

En un paciente con ictus perforante, el estudio funcional del gen candidato *PIK3CD* y su variante c.1292A>G/p.Gln431Arg ha demostrado que esta variante podría afectar a la función de la proteína; sin embargo, se necesitan más estudios y enfoques para dilucidar si este gen pudiese estar asociado con el NAIS.

En conclusión, nuestros resultados no han identificado la necesidad de estudios genéticos de variantes *de novo* o de herencia autosómica recesiva en este tipo de

pacientes. En el futuro es necesario considerar estrategias de hipótesis alternativas que puedan implicar un desequilibrio en la susceptibilidad y protección de factores genéticos, herencia oligogénica o poligénica y/o estímulos externos desconocidos con influencia epigenética. En última instancia, se justifican más opciones de investigación y análisis adicionales para lograr una mejor comprensión de la etiología del NAIS y profundizar en otros aspectos moleculares involucrados en la enfermedad.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Muchas investigaciones basadas en la aplicación de la secuenciación de última generación han permitido la identificación de varios genes y su asociación con enfermedades complejas. Sin embargo, la heredabilidad de muchas enfermedades todavía no se ha encontrado y una causa podría ser la evaluación insuficiente de variantes genéticas raras. Además, cuando se trata de estudios de accidentes cerebrovasculares, estos se centran principalmente en el adulto y el adulto joven.

La aplicación de estos métodos modernos de biología molecular para descifrar las causas de las principales enfermedades neonatales con un impacto en el neurodesarrollo ha permitido establecer la causa genética subyacente en un número creciente de trastornos inicialmente considerados no genéticos. Concomitantemente, el conocimiento de la etiopatogenia de los principales trastornos del desarrollo en la población neonatal es relevante porque podría permitir generar y ofrecer terapias específicas y potenciales que favorezcan el desarrollo de la medicina de precisión como un objetivo realista para los bebés con NAIS. En esto se basa la pertinencia de nuestro estudio, ya que el desciframiento de esta brecha genética existente en el NAIS, junto con la búsqueda de una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el NAIS idiopático, es algo que responde al anhelo actual de identificar perfiles individuales, objetivos terapéuticos específicos y terapias personalizadas más seguras.

Asimismo, permitiría el cribado genómico, el pronóstico preciso y el uso de una adecuada rehabilitación y profilaxis de comorbilidades. Por último, pero no menos importante, nuestro estudio es crucial para las familias, ya que proporciona un asesoramiento prenatal y posnatal confiable.

4. Bibliografía científica generada

Núñez C, Stephan-Otto C, Arca G, Agut T, Arnáez J, Cordeiro M, Benavente-Fernández I, Boronat N, Lubián-López SP, Valverde E, Hortigüela M, García-Alix A. (2021). *Neonatal arterial stroke location is associated with outcome at 2 years: a voxel-based lesion-symptom mapping study*. Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition. https://doi.org/10.1136/archdischild-2020-320400.

François C, García-Alix A, Bosch L, Rodríguez-Fornells A. (2021). *Signatures of brain plasticity supporting language recovery after perinatal arterial ischemic stroke*. Brain and Language, 212, 104880. https://doi.org/10.1016/j.bandl.2020.104880.

Núñez C, Arca G, Agut T, Stephan-Otto C, García-Alix A. (2020). *Precise neonatal arterial ischemic stroke classification with a three-dimensional map of the arterial territories of the neonatal brain*. Pediatric Research. 87(7), 1231-1236. https://doi.org/10.1038/s41390-019-0724-x.

Arca G, Arnáez J, Agut T, Núñez C, Stephan-Otto C, Valls A, García-Alix A. (2020). *Neuron-specific enolase is correlated with lesion topology, relative infarct volume and outcome of symptomatic NAIS*. Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition. 105(2), 132-137. https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-316680.

Garrido-Barbero M, Arnáez J, Loureiro B, Arca G, Agut T, García-Alix A. (2019). *The Role of Factor V Leiden, Prothrombin G20210A, and MTHFR C677T Mutations in Neonatal Cerebral Sinovenous Thrombosis*. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 25, 1076029619834352. https://doi.org/10.1177/1076029619834352.

Olival J, Hoenicka J, Arca G, Arnáez J, Agut T, Stephan-Otto C, Núñez C, Benavente-Fernández I, Lubián-López S, Palau F, García-Alix A. *Exome sequencing does not reveal genetic causes in infants with perinatal arterial ischemic stroke* (en preparación).

Tesis doctoral: "Application of Next Generation Sequencing to Study the Genetic behind Idiopathic Neonatal Arterial Ischemic Stroke".

Investigador: Jonathan Olival
Directores: Alfredo García Alix y Francesc Palau
Facultad de Biología. Programa de doctorado de Genética. Universitat de Barcelona
Fecha de defensa pública: 9 de septiembre de 2022