

Introducción

En la actualidad, la sepsis representa uno de los retos más significativos en el campo de la medicina, afectando a millones de pacientes anualmente, y presentando una alta tasa de morbilidad y mortalidad. La sepsis induce una serie de respuestas inflamatorias complejas y rápidas, cuyo manejo clínico sigue siendo un desafío debido a la falta de tratamientos específicos más allá de la administración de antibióticos y medidas de soporte. Dando prioridad al flujo de trabajo, condicionado al tiempo disponible, iniciaremos con el análisis de RNAseq, seguido por la exploración de datos metagenómicos y scRNAseq. Posteriormente, intentaremos realizar una integración de estos tres conjuntos de datos.

Objetivos del Trabajo

Análisis de RNAseq: Investigar los mecanismos moleculares y celulares implicados en la neurodegeneración y neuroinflamación en un modelo murino de sepsis. Se utilizarán datos RNAseq para identificar vías de muerte e inflamación y genes nodales relevantes en distintos tiempos post-infección, con especial atención a las diferencias entre machos y hembras.

Análisis de scRNAseq: Centrarse en la respuesta celular detallada a la sepsis, aislando y analizando células específicas como macrófagos microgliales y células linfoides. Este análisis permitirá comprender las diferencias en la activación celular y la dinámica de las poblaciones celulares en respuesta a la sepsis.

Análisis Metagenómico: Dado que se observaron diferencias significativas en la respuesta a la sepsis entre machos y hembras, así como entre diferentes poblaciones animales, este análisis busca explorar si la microbiota de partida puede influir en la respuesta del sistema nervioso central a la inflamación sistémica. Aunque los datos metagenómicos no provienen de secuenciación por Illumina y ya están procesados, se intentará integrar este análisis con los anteriores para obtener una visión holística de la respuesta a la sepsis.

Integración Multiómica: Si viene el caso implementaremos una estrategia de integración multiómica para combinar y analizar conjuntamente los datos obtenidos de los análisis de RNAseq, scRNAseq y metagenómica. Este enfoque nos permitirá identificar interacciones complejas entre los niveles transcriptómico, celular y microbiótico, facilitando la identificación de mecanismos subyacentes y posibles dianas terapéuticas específicas para la sepsis.

Datos y Justificación

Los datos para este estudio provienen del grupo de Oftalmología Experimental de la Universidad de Murcia, incluyendo datasets de RNAseq y scRNAseq en formato FASTQ crudo, y datos metagenómicos procesados por la casa comercial. La elección de estos datasets se basa en su relevancia para investigar las complejas respuestas biológicas a la sepsis y la capacidad de proporcionar conocimientos detallados sobre la interacción entre los componentes genómicos, celulares y microbióticos. La integración

de estos análisis promete avanzar significativamente en la comprensión de la sepsis y en la identificación de nuevas dianas terapéuticas potenciales.

A continuación, vamos a hablar un poco más en profundidad de los datos que tenemos:

1. RNAseq:

Utilizaremos un modelo murino de sepsis para investigar los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la neurodegeneración y la neuroinflamación. Nos centraremos en componentes del inflammasoma y emplearemos RNAseq para ampliar nuestra comprensión de la respuesta del SNC a la inflamación sistémica y sus diferencias entre géneros, según se describe en estudios previos. Este enfoque ómico se realizará en diferentes momentos:

Fase temprana (24 horas post-infección): Estudio de la respuesta inmediata antes de la muerte neuronal, con énfasis en machos y hembras para identificar posibles dianas terapéuticas específicas a corto plazo.

Fase media (3 días post-infección): Análisis durante el inicio de la muerte neuronal para comprender las vías de muerte e inflamación y los genes nodales relevantes.

Fase estable (7 días post-infección): Evaluación de la estabilización de la muerte neuronal con glía activa para identificar objetivos a largo plazo.

Con este análisis detallado en seis muestras distintas (machos y hembras en cada uno de los tres tiempos post-infección) pretendemos identificar dianas terapéuticas específicas y desarrollar estrategias de reposición y descubrimiento de fármacos para futuros proyectos.

2. Metagenómica:

La evidencia acumulada sugiere que existen diferencias significativas en la respuesta retiniana al lipopolisacárido (LPS) sistémico entre géneros en modelos murinos de la Universidad de Murcia (UM), así como variaciones interspecíficas entre las cohortes murinas de la UM y aquellas provenientes de instituciones en Bélgica, donde se reporta ausencia de muerte neuronal post-exposición al LPS. Esta disparidad en la respuesta neuroinflamatoria y la subsiguiente neurodegeneración plantea la hipótesis de que la microbiota intestinal basal podría desempeñar un papel crítico en la modulación de la respuesta del sistema nervioso central (SNC) ante la inflamación sistémica inducida.

Dada la relevancia de la microbiota en la modulación de las respuestas inmunitarias y su potencial impacto en la susceptibilidad a diversas patologías, incluida la neuroinflamación, se propone realizar un análisis metagenómico comparativo. Este análisis se enfocará en caracterizar la composición y diversidad

de la microbiota intestinal de las cohortes murinas pre-exposición al LPS, con el objetivo de identificar diferencias microbióticas que puedan correlacionar con la variabilidad observada en la respuesta neuroinflamatoria y neurodegenerativa.

Aunque idealmente se realizaría este análisis metagenómico utilizando muestras de tejido intestinal de los mismos animales post-exposición al LPS para evaluar cambios en la microbiota como consecuencia de la inflamación sistémica, las limitaciones presupuestarias restringen este enfoque. Sin embargo, el análisis de las muestras basales disponibles proporcionará una ventana invaluable a la comprensión de cómo las variaciones en la microbiota pueden influir en la respuesta del SNC a desafíos inmunológicos sistémicos, potencialmente revelando objetivos terapéuticos microbiota-dependientes para la mitigación de la neuroinflamación y la neurodegeneración en el contexto de la sepsis.

3. Single Cell RNA-seq

En nuestro estudio, el análisis scRNAseq se centró exclusivamente en modelos murinos machos, a fin de desentrañar las respuestas celulares específicas involucradas en la sepsis. Para ello, se aislaron células positivas para CD11b (indicativas de macrófagos y microglia) y CD45 (marcador de células linfoides), utilizando estas marcaciones para diferenciar el estado de activación y el tipo celular dentro del contexto inflamatorio de la sepsis.

La selección de células positivas tanto para CD11b como para CD45 nos permitió enfocarnos en macrófagos de microglia activados, células que desempeñan roles cruciales en la respuesta inmunitaria y en la mediación de la neuroinflamación dentro del SNC. Estos macrófagos activados son indicativos de una respuesta inmune intensificada y juegan un papel fundamental en la patogénesis de la sepsis, facilitando tanto la defensa contra patógenos como la potencial contribución al daño tisular asociado.

Por otro lado, las células que presentaban positividad exclusiva para CD11b fueron consideradas como microglia en un estado de activación menos pronunciado. Estas células, aunque participan en la respuesta inmune, se encuentran en un estado de activación menos agresivo comparado con los macrófagos microgliales activados, lo que sugiere una respuesta inmunitaria más modulada o en etapas iniciales de activación.

Finalmente, las células exclusivamente positivas para CD45 se interpretaron como componentes restantes del compartimento linfoides, englobando una variedad de células inmunitarias implicadas en la respuesta a la sepsis. Esta fracción representa una gama diversa de células inmunológicas, incluyendo linfocitos T, B, y otras células linfoides, que participan en la coordinación y ejecución de la respuesta inmunitaria adaptativa y que pueden jugar un papel en la progresión de la neuroinflamación y neurodegeneración en el contexto de la sepsis.

