

Análisis de datos de *single cell RNA-seq* para evaluar la eficacia de la terapia hormonal en el tratamiento del dolor en la endometriosis

TRABAJO FIN DE MÁSTER



Universidad
Internacional
de Valencia

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOINFORMÁTICA

Alumna: Dodu, Madalina Alexandra

Director/a: Nieto Sachicha, Juan

De:

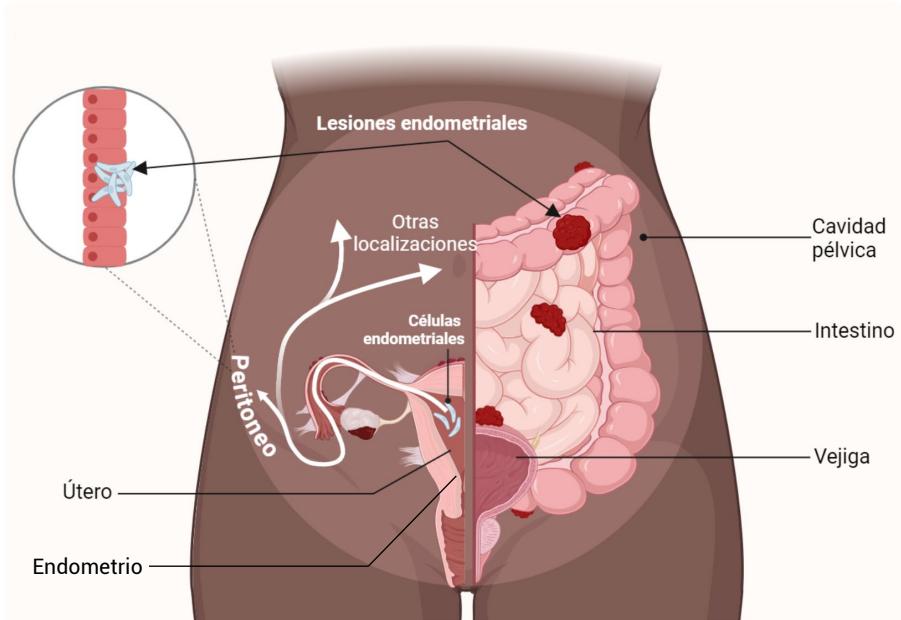
Planeta Formación y Universidades

Endometriosis: definición

La **endometriosis** es un síndrome **inflamatorio** complejo y dependiente de **estrógenos**, caracterizado por el crecimiento de tejido funcional similar al endometrial fuera del endometrio, causando las denominadas **lesiones**.

■ Localización

- *cavidad pélvica* (paredes externas del útero y ovarios)
- *casos raros*: intestino, pulmones, hígado, vejiga, recto, ojos, entre otros.



Elaborada con BioRender.com

En este trabajo se usará el término "mujeres", pero hay que resaltar que la endometriosis puede afectar a cualquier persona con órganos del aparato reproductor femenino, incluidos hombres trans y personas no binarias.

Prevalencia de la endometriosis



en edad reproductiva (15-54 años)



10%



5.000
casos/año

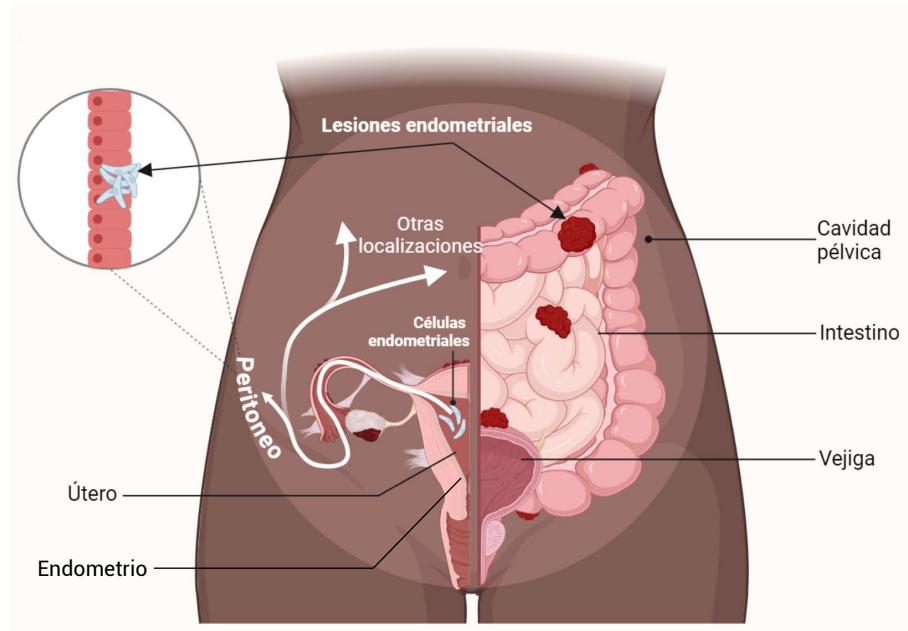


Subestimación de datos

- *Raza/etnia*
- *Retraso en diagnóstico*
 - Complejidad del síndrome
 - Sesgo de género y normalización del dolor

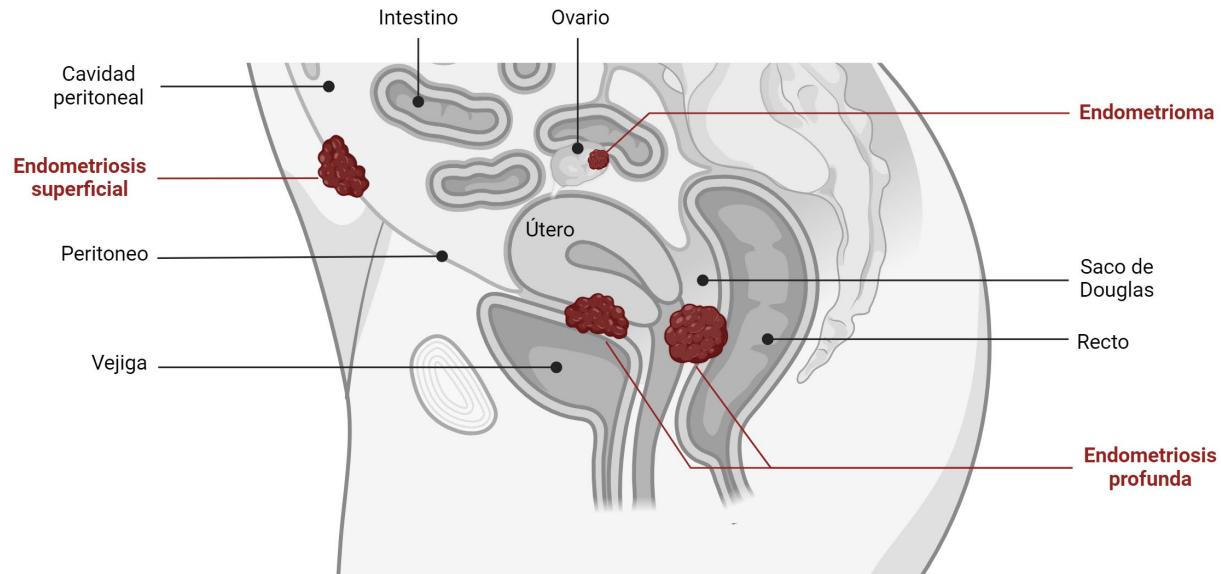
Origen de la endometriosis

Teoría de la menstruación retrógrada de Sampson

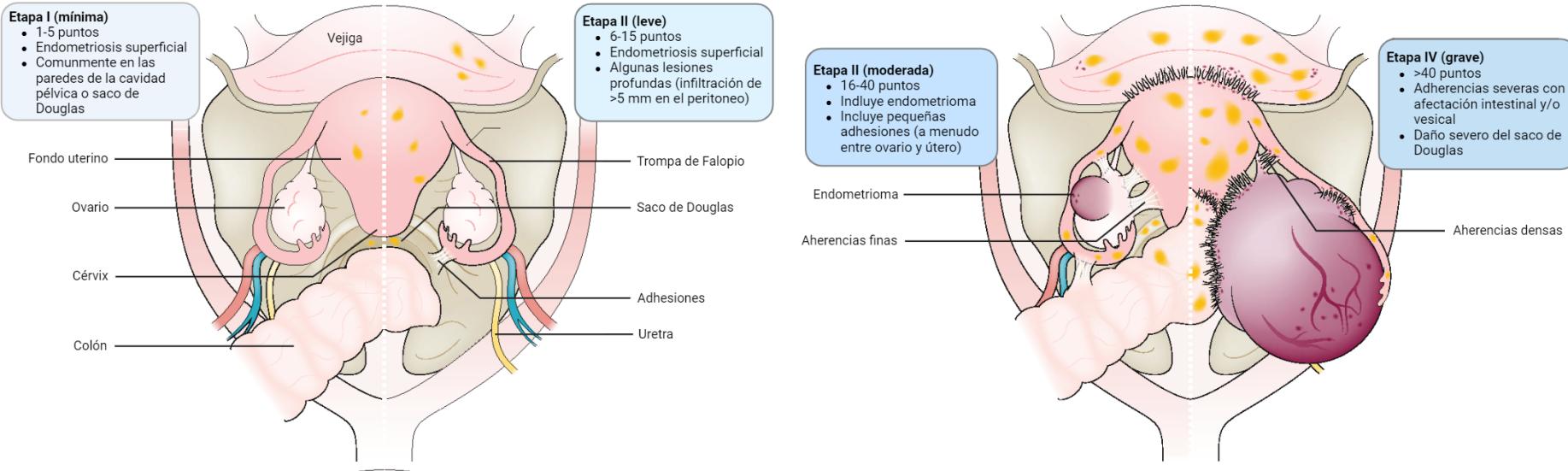


Elaborada con BioRender.com

Clasificación de la endometriosis

Elaborada con [BioRender.com](#)

Clasificación rASMR



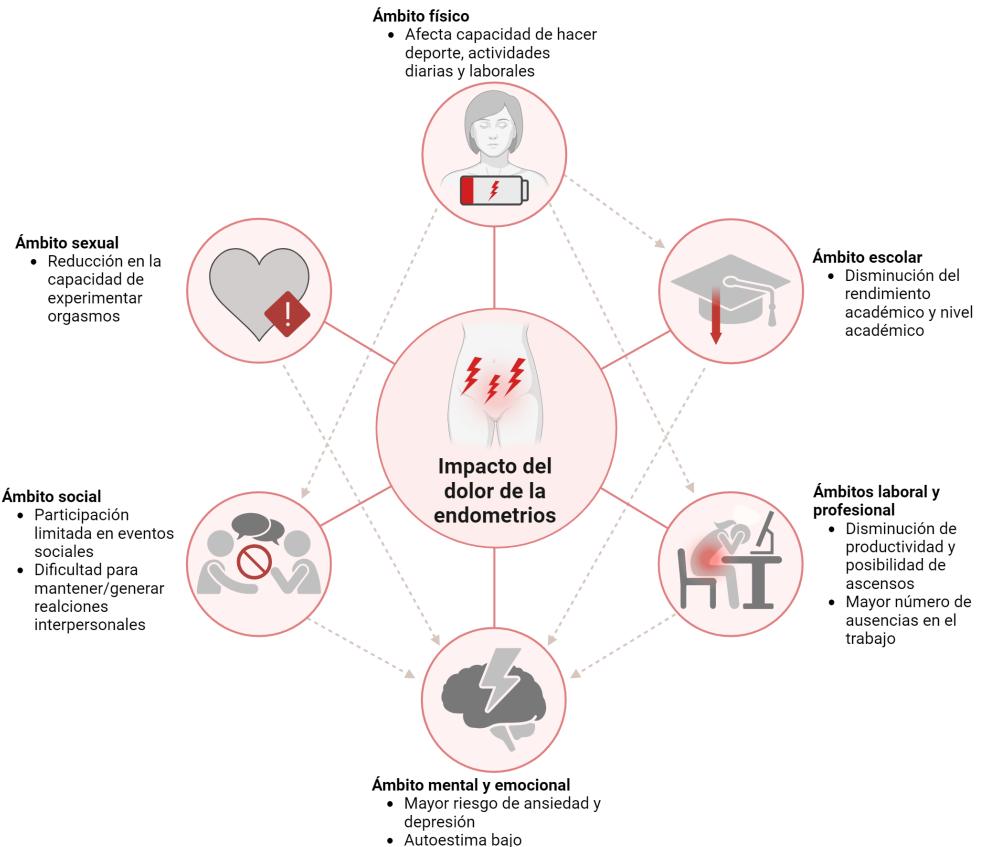
Modificado de Zondervan et al., 2018

Sintomatología

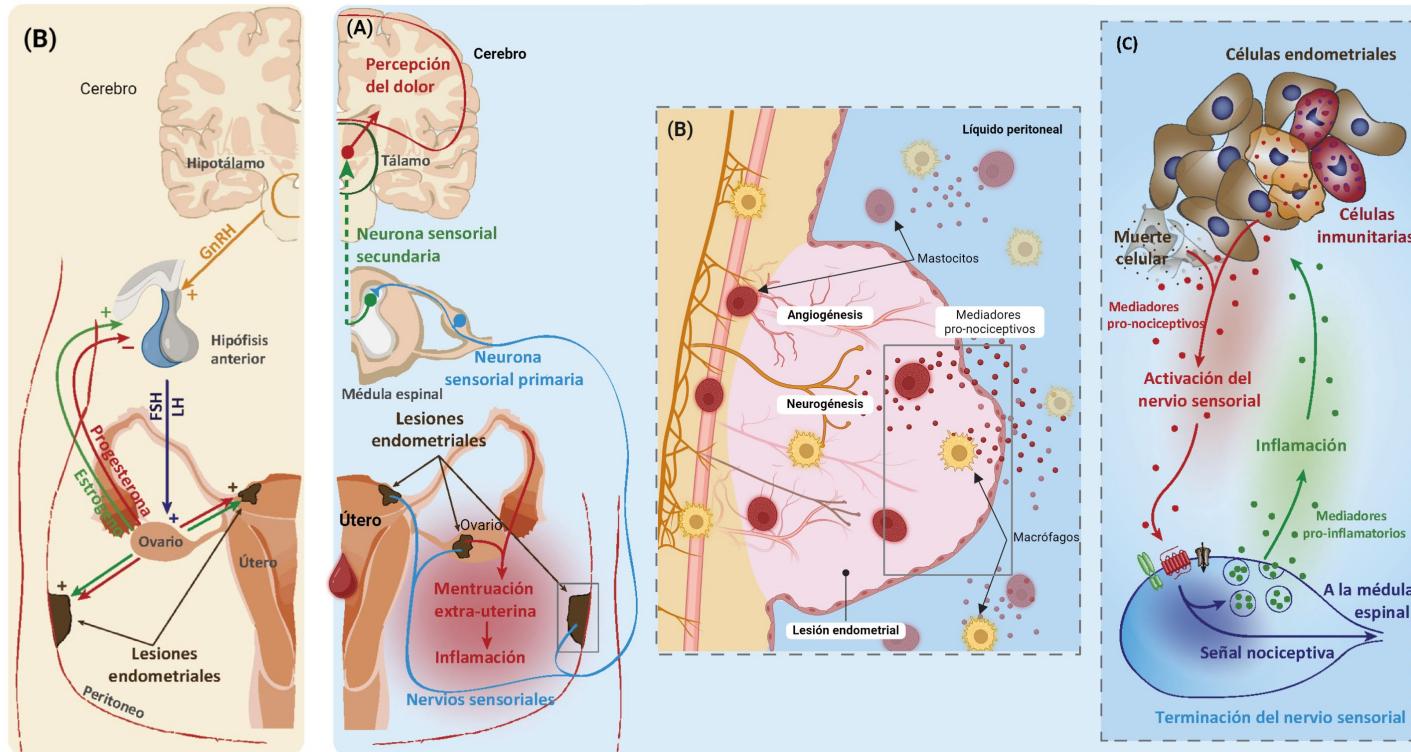
Infertilidad

Dolor

- Dismenorrea
- Dolor crónico pélvico
- Dispareunia
- Disuria
- Disquecia
- Dolor de espalda
- Migrañas



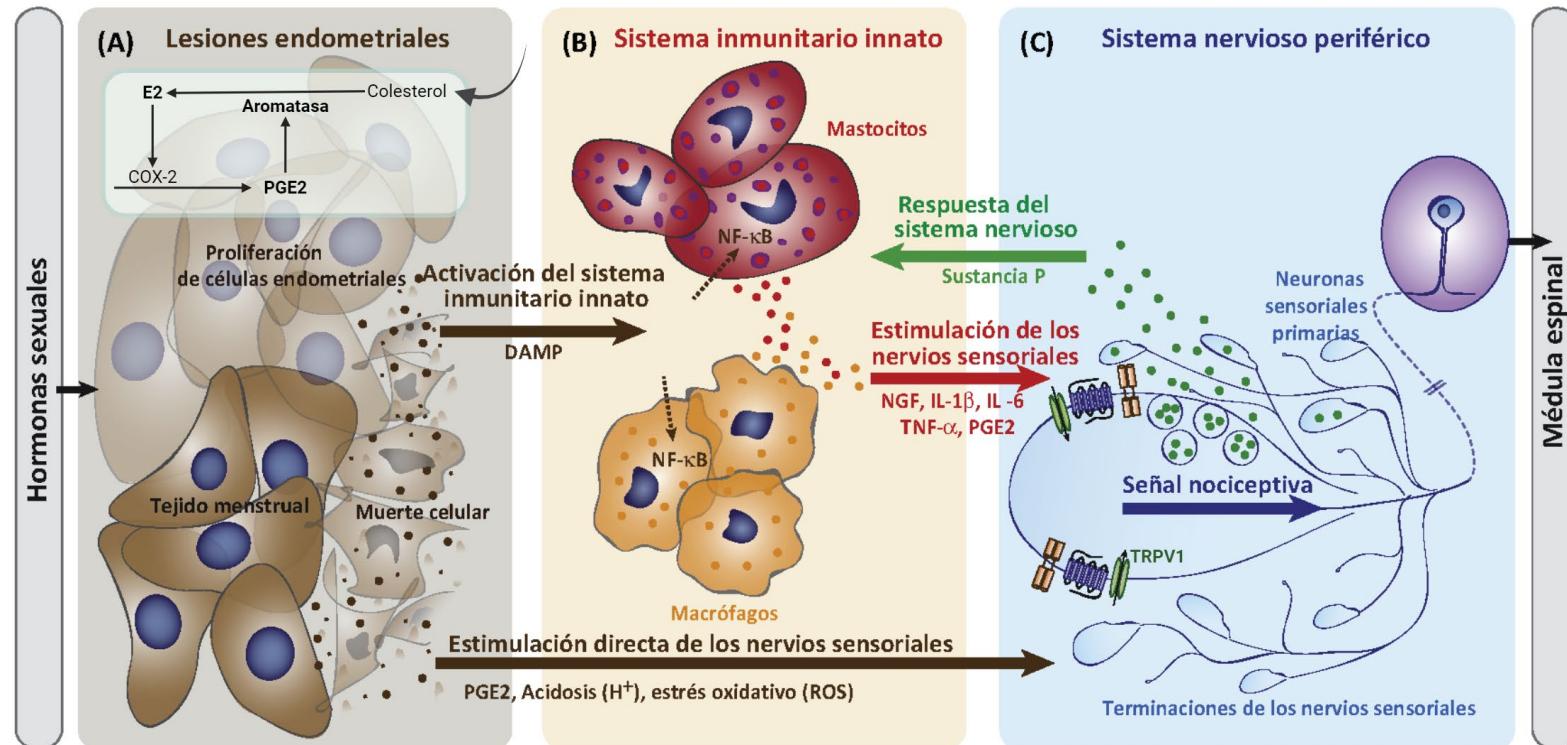
Biología del dolor



Análisis de datos de *single cell RNA-seq* para evaluar la eficacia de la terapia hormonal en el tratamiento del dolor en la endometriosis

Modificado de Laux-Biehlmann et al., 2015

Biología del dolor



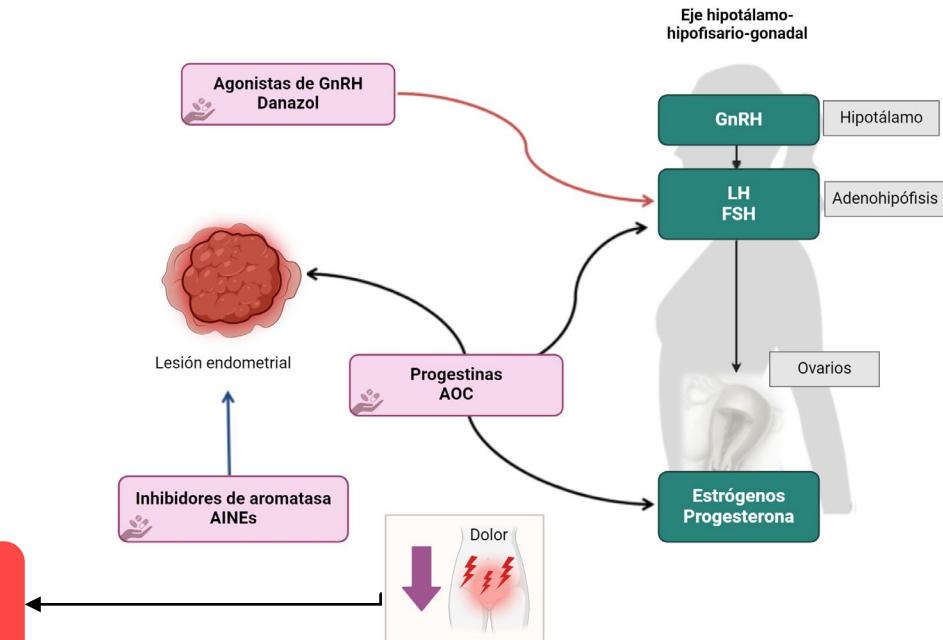
Tratamiento del dolor: enfoque en el tratamiento farmacológico

Recomendación

cirugía + terapia farmacológica

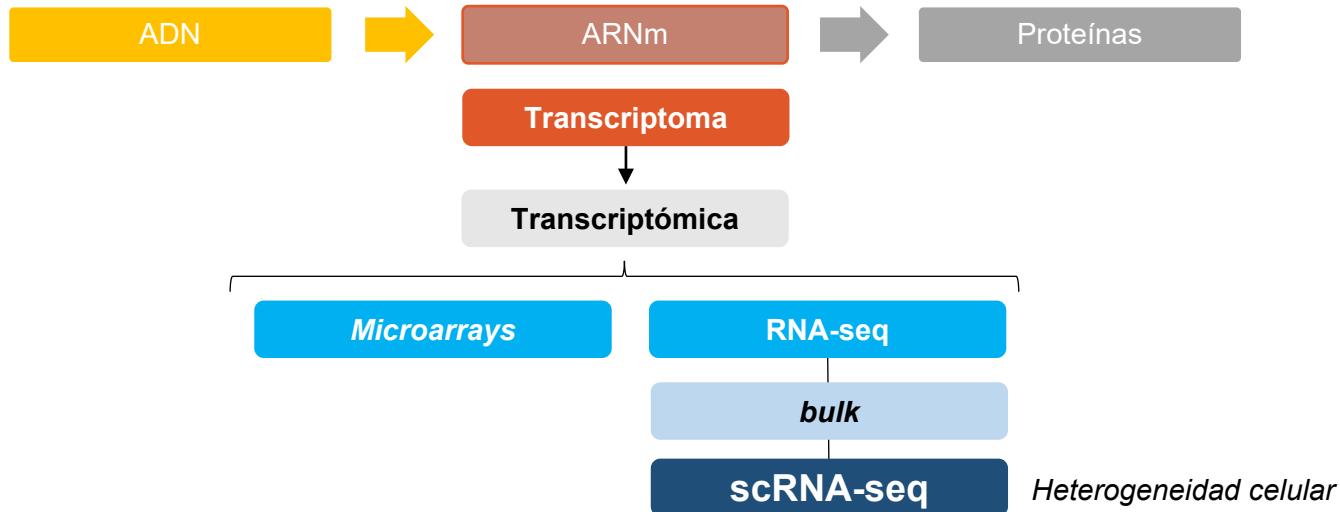
- terapias hormonales
- inhibidores de la producción de aromatasa
- fármacos antiinflamatorios no-esteroideos (AINE)

Expresión de genes implicados en la vía el dolor (*TRPV1, NGF, IL1 β , BDNF, NTRK1*, entre otros)

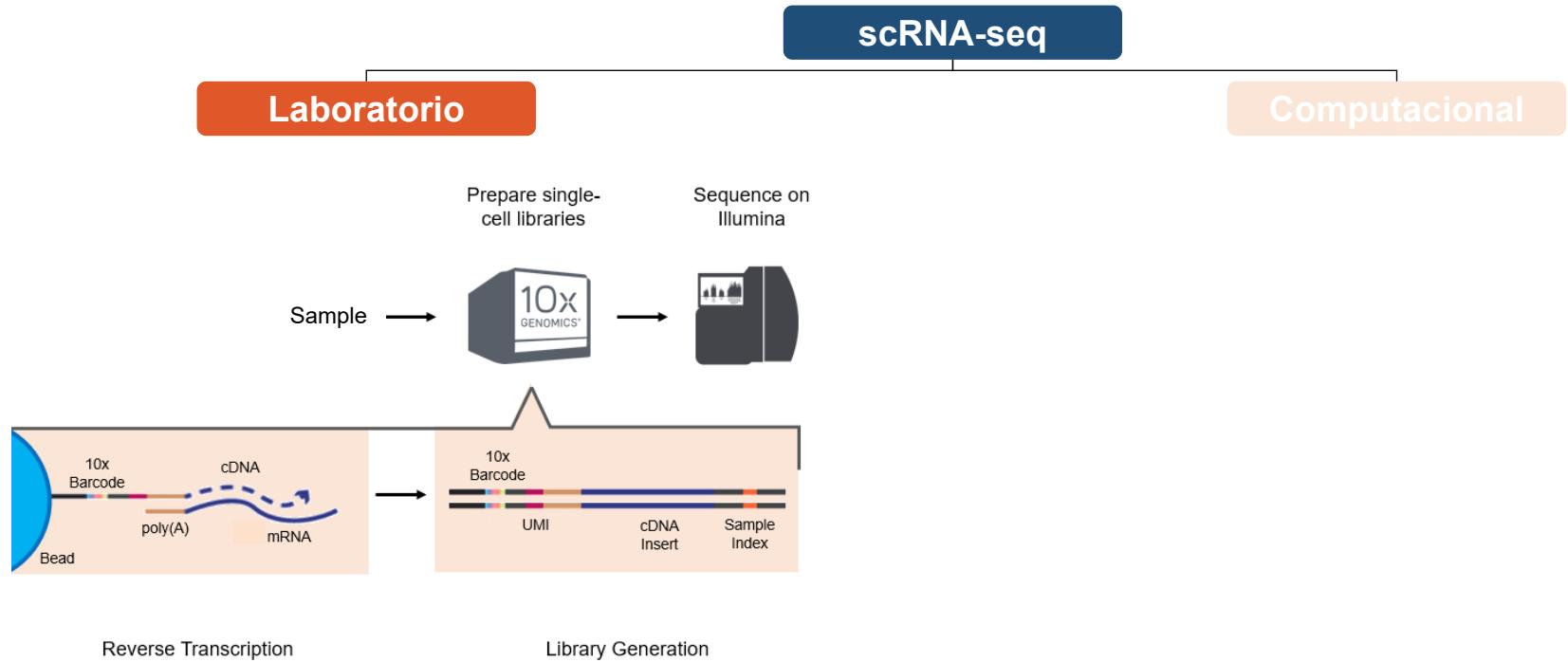


Elaborada con BioRender.com

Tecnología de scRNA-seq

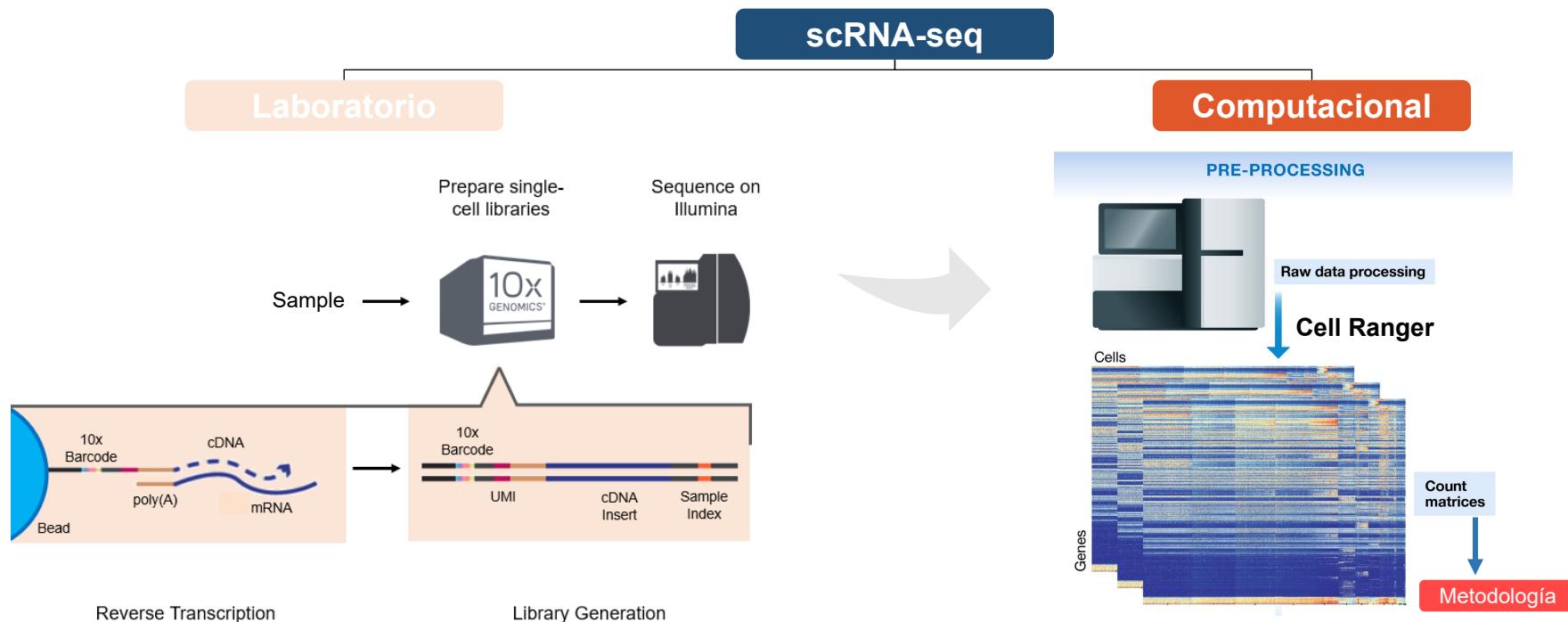


Tecnología de scRNA-seq



<https://web.genewiz.com/single-cell-faq>

Tecnología de scRNA-seq



<https://web.genewiz.com/single-cell-faq>

Adaptado de Luecken & Theis, 2019

Tecnología de scRNA-seq

nature genetics

Explore content ▾ About the journal ▾ Publish with us ▾ Subscribe

nature > nature genetics > articles > article

Article | Published: 09 January 2023

Single-cell transcriptomic analysis of endometriosis

Marcos A.S. Fonseca, Marcela Haro, Kelly N. Wright, Xianzhi Lin, Forough Abbas, Jennifer Sun, Lourdes Hernandez, Natasha I. Orr, Jooyon Hong, Yunhee Choi-Kueea, Horacio M. Maluf, Bonnie L. Balzer, Aaron Fishburn, Ryan Hickey, Ilana Cass, Helen S. Goodridge, Mireille Truong, Yemin Wang, Margaretta D. Pisarska, Huy O. Dinh, Amal El-Naggar, David G. Huntsman, Michael S. Anglesio, Marc T. Goodman, ... Kate Lawrence  + Show authors

Nature Genetics 55, 255–267 (2023) | [Cite this article](#)

nature cell biology

Explore content ▾ About the journal ▾ Publish with us ▾ Subscribe

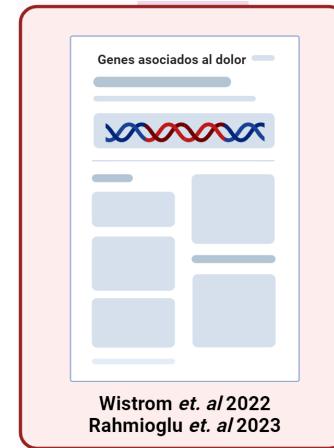
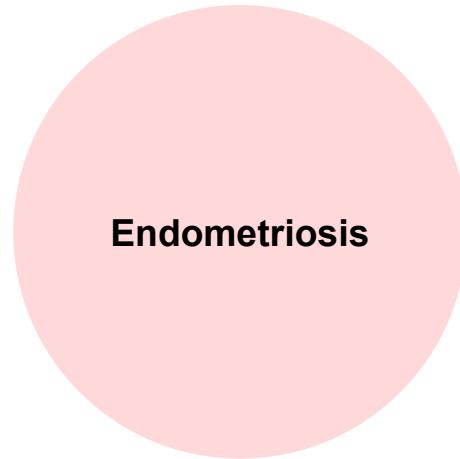
nature > nature cell biology > resources > article

Resource | Published: 21 July 2022

Single-cell analysis of endometriosis reveals a coordinated transcriptional programme driving immunotolerance and angiogenesis across eutopic and ectopic tissues

Juliana Tan, William F. Flynn, Santhosh Sivajothy, Diane Luo, Suleyman B. Bozal, Monica Davé, Anthony A. Luciano, Paul Robson  & Danielle E. Luciano  & Elise T. Courtois 

Nature Cell Biology 24, 1306–1318 (2022) | [Cite this article](#)



Hipótesis: La terapia hormonal, que es el tratamiento inicial para el síntoma, puede disminuir la expresión de genes relacionados con el dolor.

Esta suposición podría ser confirmada mediante el análisis de datos scRNA-seq.

Objetivos

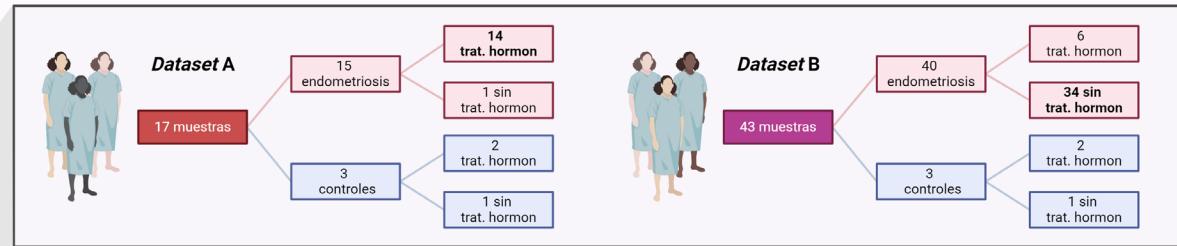
Objetivo general:

- Identificar el impacto de la terapia hormonal en la expresión de genes asociados al dolor en la endometriosis mediante el análisis de datos de scRNA-seq.

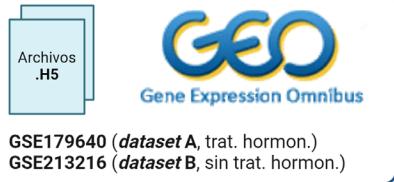
Objetivos específicos:

- Procesamiento y análisis comparativo de dos conjuntos de datos públicos de scRNA-seq, uno con tratamiento hormonal y otro compuesto mayoritariamente por muestras sin tratamiento, para visualizar la expresión de genes asociados al dolor en la endometriosis.
- Análisis de la expresión de genes relacionados con el dolor en datos de scRNA-seq en pacientes con endometriosis con y sin tratamiento hormonal para identificar el impacto de la terapia en las células que componen el endometrio eutópico y ectópico.

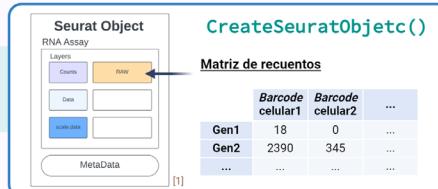
Metodología



Obtención de datos públicos de scRNA-seq (endometriosis)

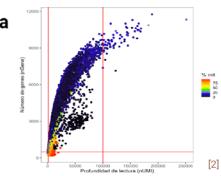


Generación de objetos Seurat

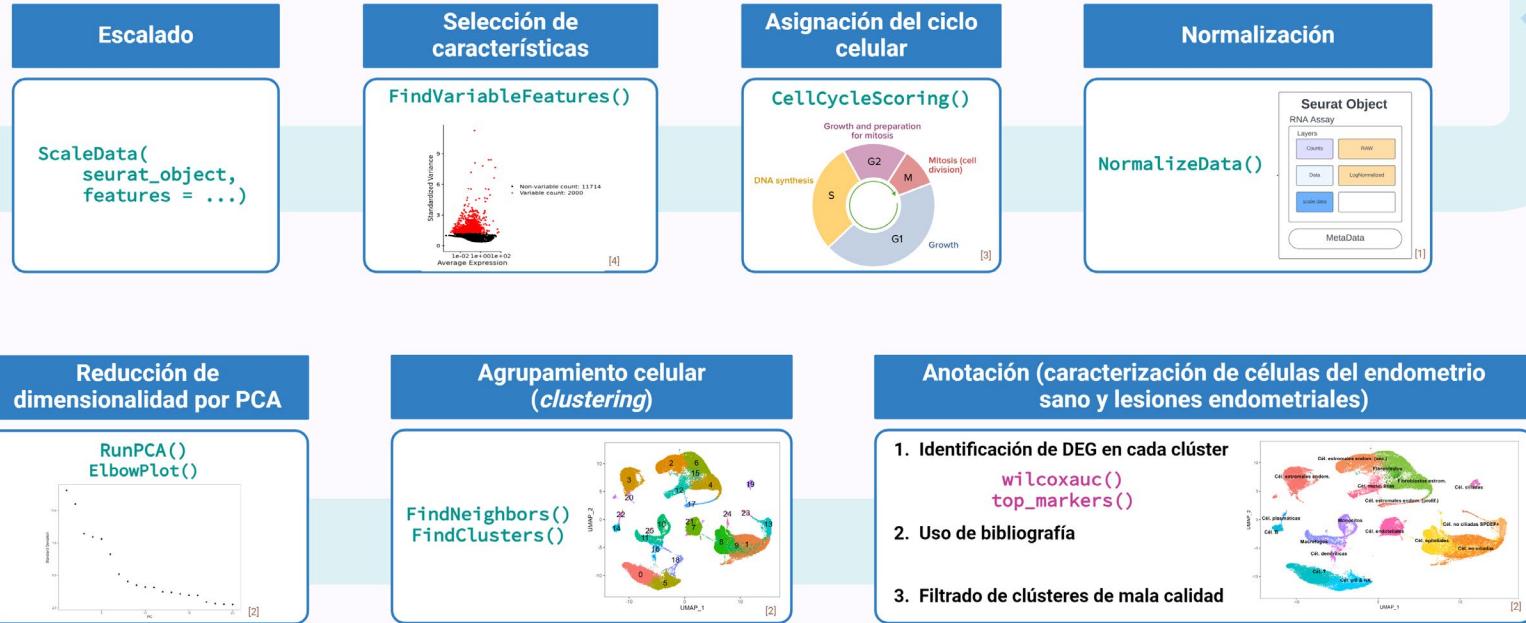


Control de calidad

1. Filtrado de células de mala calidad y porcentaje mitocondrial
 2. Eliminación de dobletes
- `doubletFinder()`



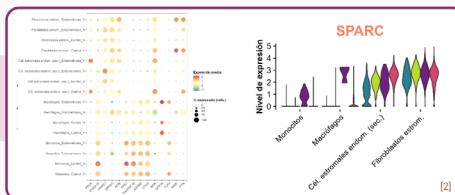
PREPROCESAMIENTO



Caracterización de genes asociados al dolor

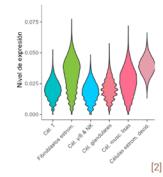
1. Extracción de tipos celulares con mayor firma de dolor
2. Escalado de datos filtrados
3. Identificación de DEG relacionados con el dolor
FindMarkers()

Impacto del tratamiento hormonal en genes de la vía del dolor



Identificación de firma del dolor en células del endometrio sano y lesiones endometriales

1. Cálculo de puntuación de firma del dolor
AddModuleScore_UCell()
2. Identificación de tipos celulares con mayor expresión



PROCESAMIENTO/ANÁLISIS

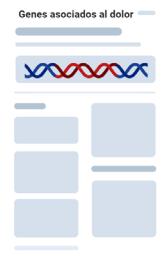
Programas empleados (software R)

- Seurat
- DoubletFinder
- Presto
- UCell

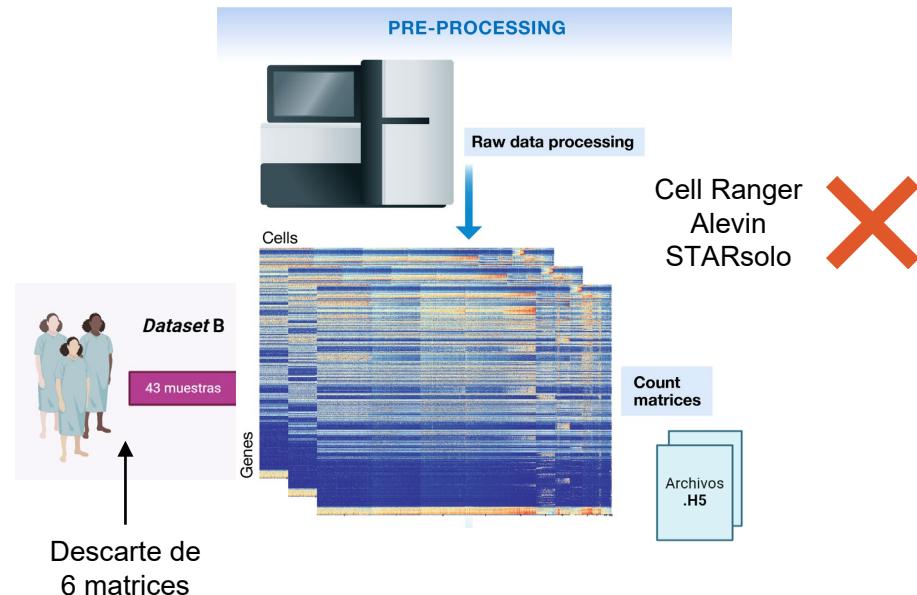
Referencias de figuras

1. https://rnabio.org/module-08-scRNA/0008/02/01/OA_clustering/
2. Figura propia
3. <https://www.linkedin.com/pulse/210-cell-cycle-epun-dissanayake/>
4. https://satijalab.org/seurat/articles/pbmcs3k_tutorial

M. ALEXANDRA DODU, 2024



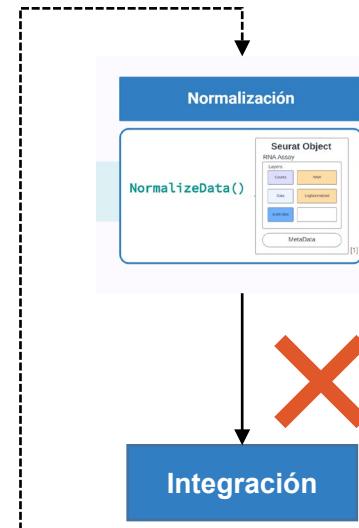
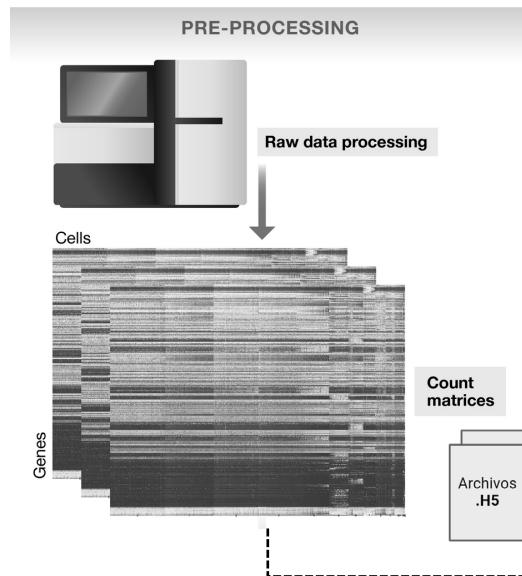
Datos de scRNA-seq



RAM insuficiente
(16 GB)

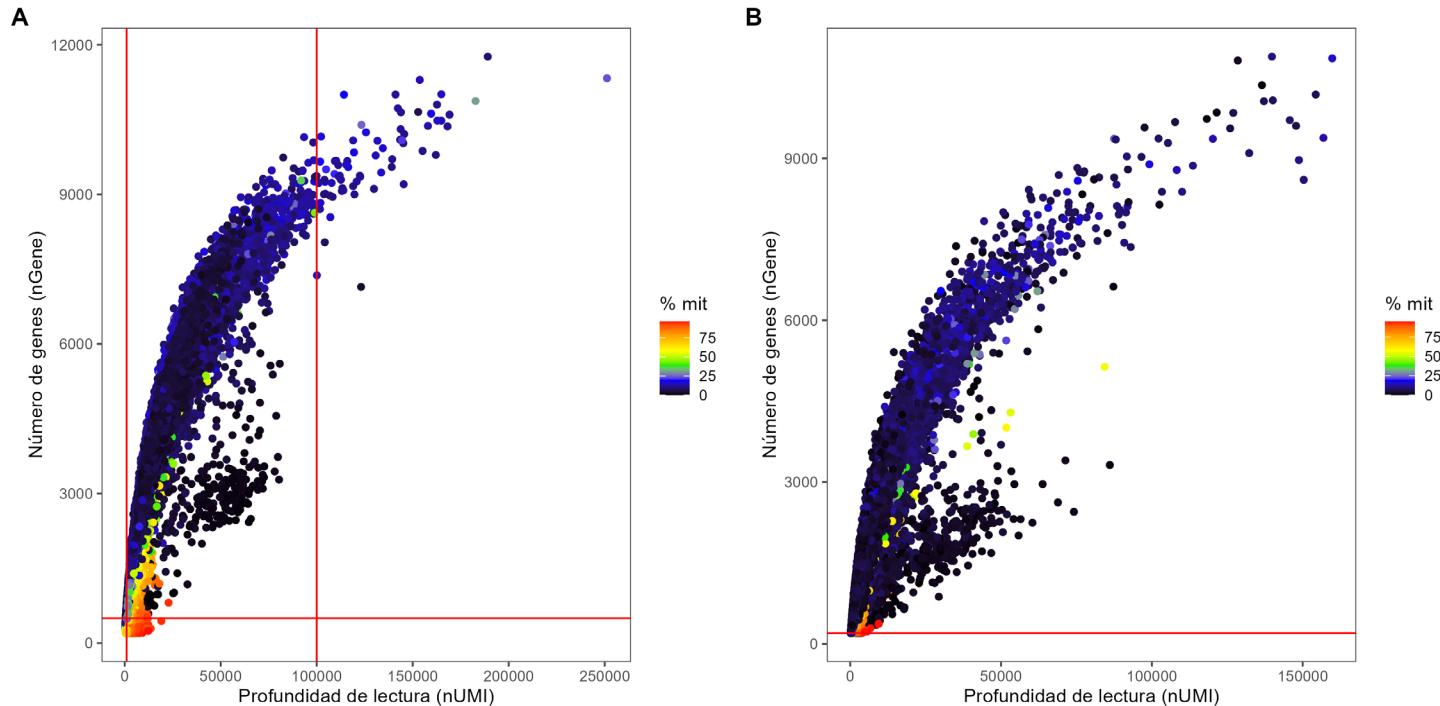
Podrían afectar la confianza y la generalización de las conclusiones

Datos de scRNA-seq

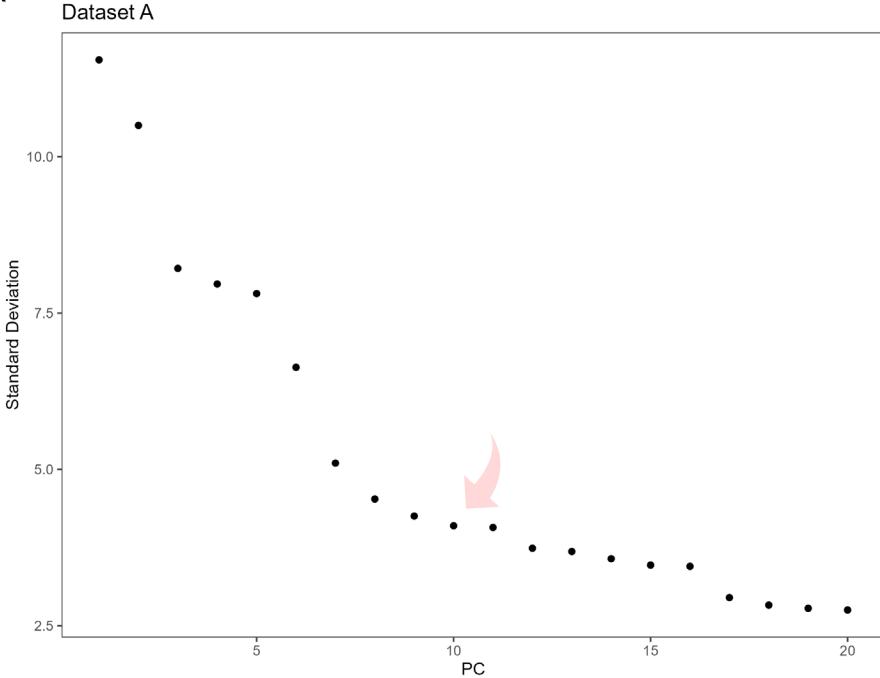
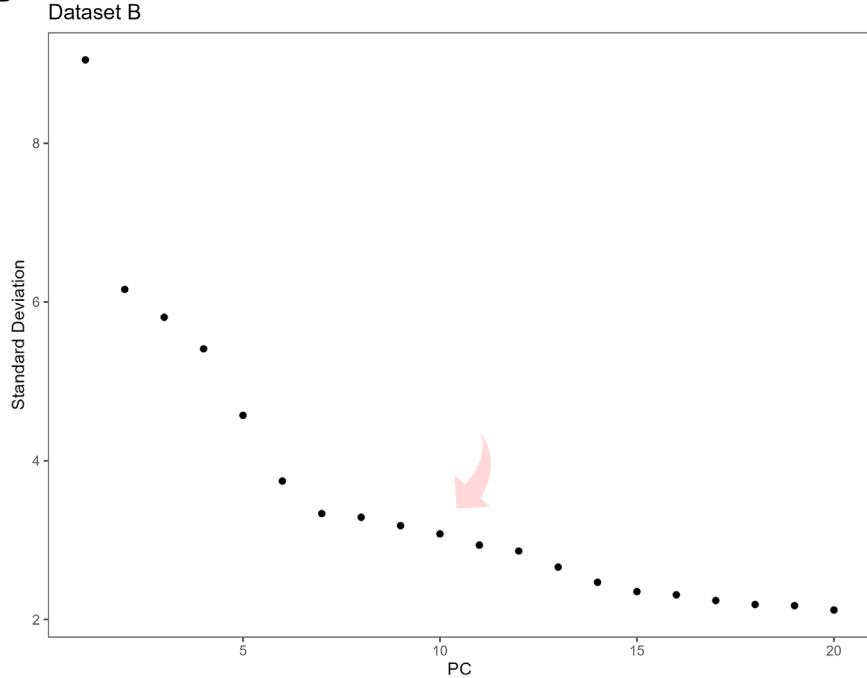


Limitación en la comparación de ambos conjuntos de datos.

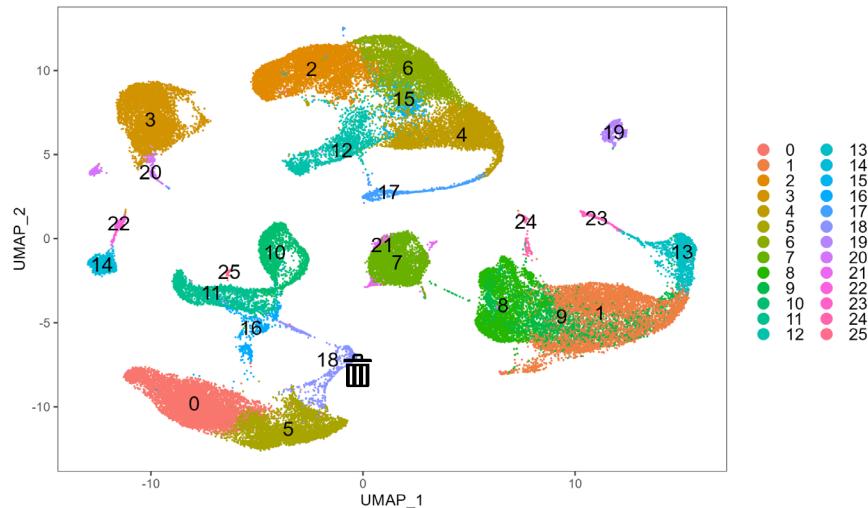
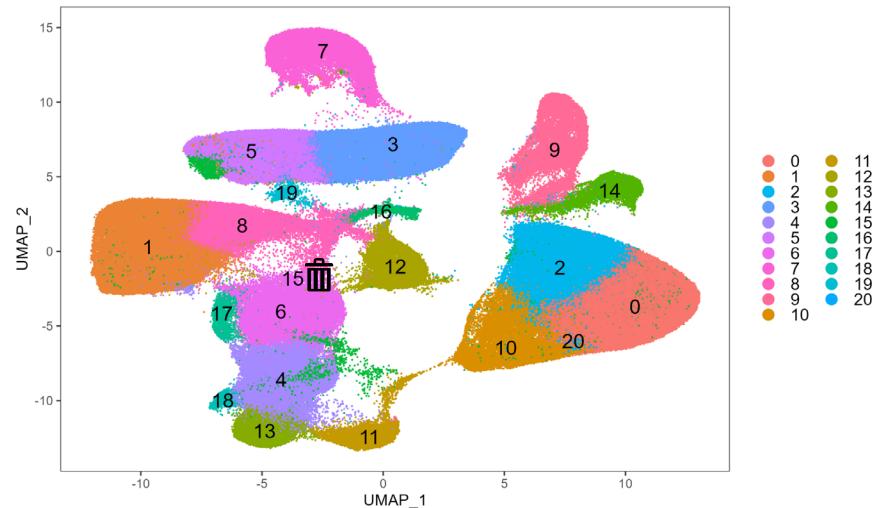
Filtrado de calidad



Filtrado de calidad

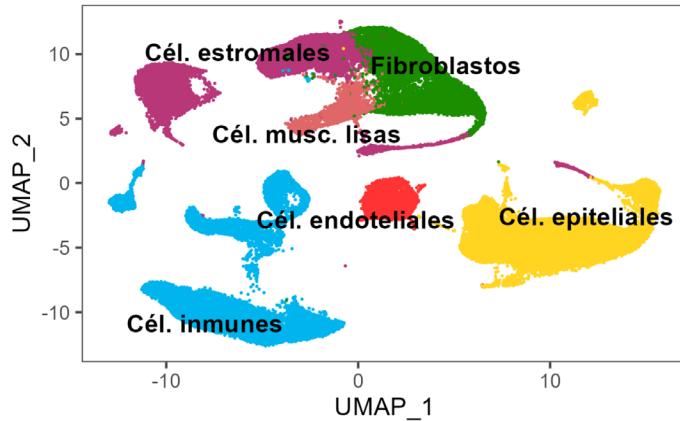
A**B**

Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

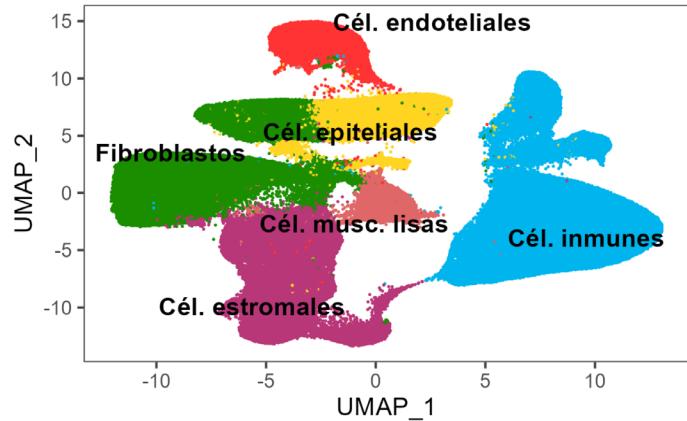
A Clústeres en el Dataset A**B** Clústeres en el Dataset B

Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

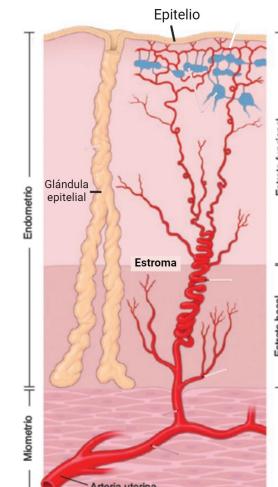
Dataset A



Dataset B

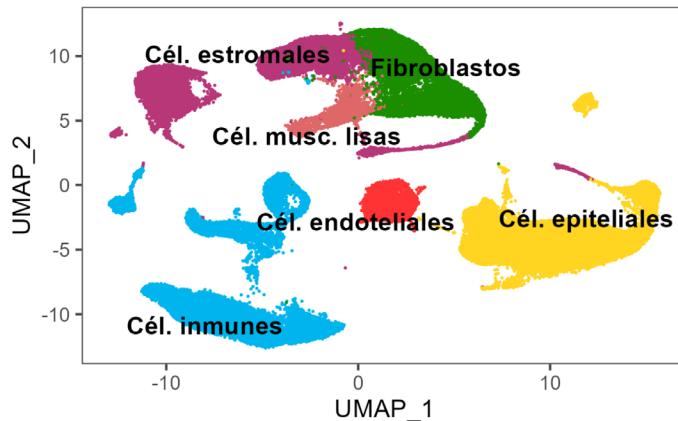


● Cél. inmunes
 ● Cél. epiteliales
 ● Cél. estromales
 ● Fibroblastos
 ● Cél. endoteliales
 ● Cél. musc. lisas

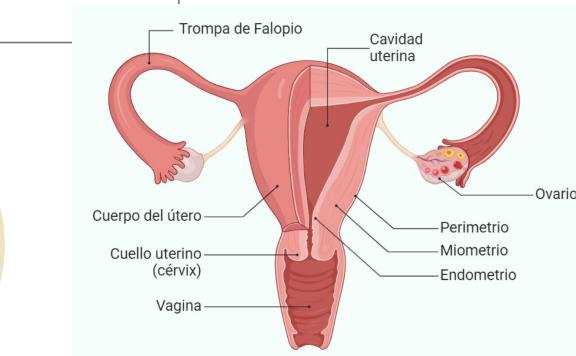
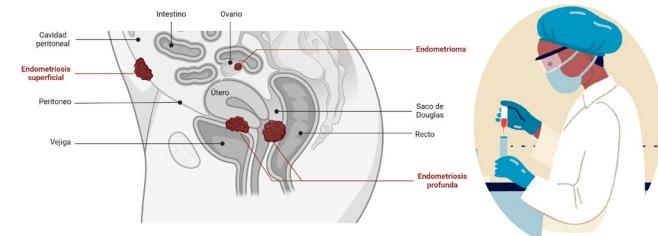
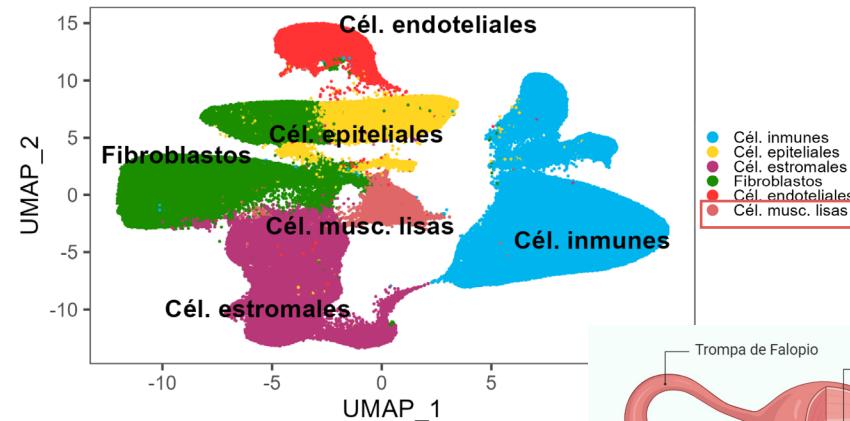


Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

Dataset A

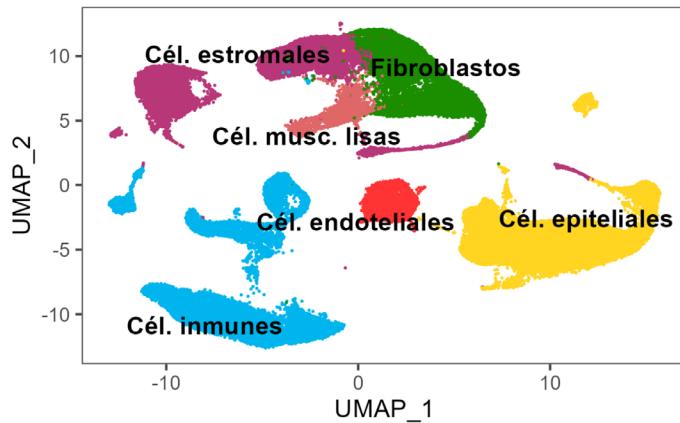


Dataset B

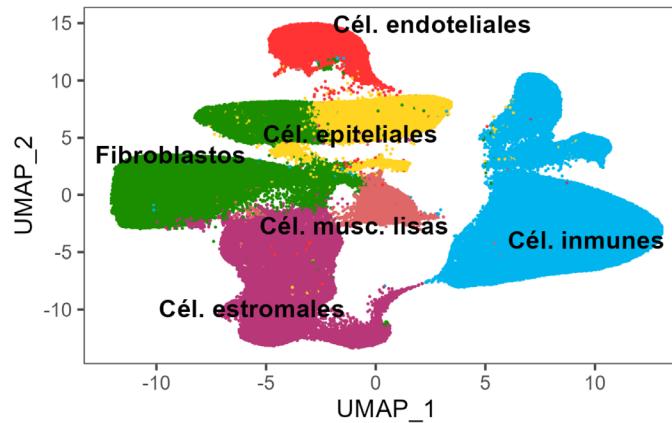


Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

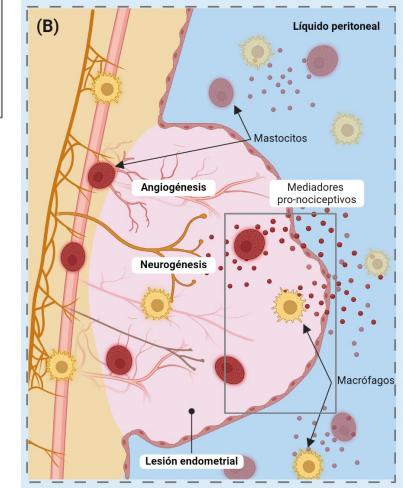
Dataset A



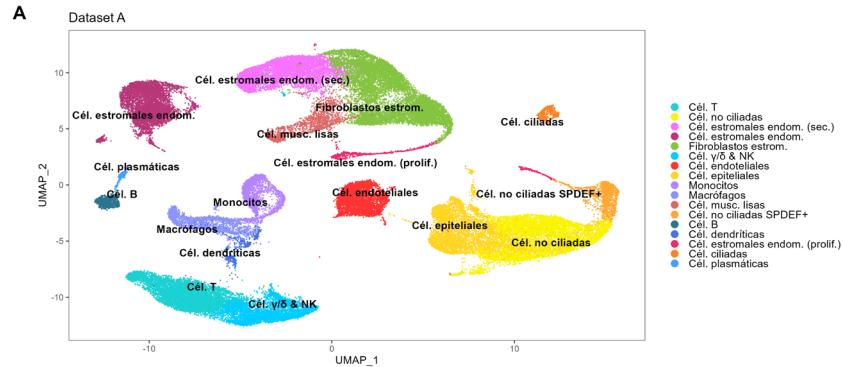
Dataset B



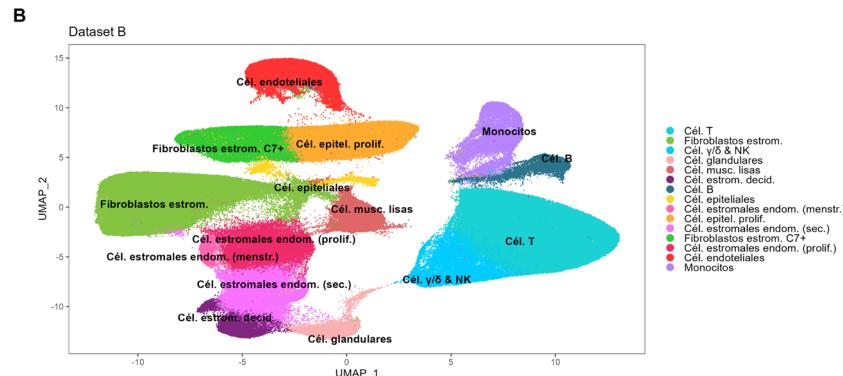
Cél. inmunes
Cél. epiteliales
Cél. estromales
Fibroblastos
Cél. endoteliales
Cél. musc. lisas



Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

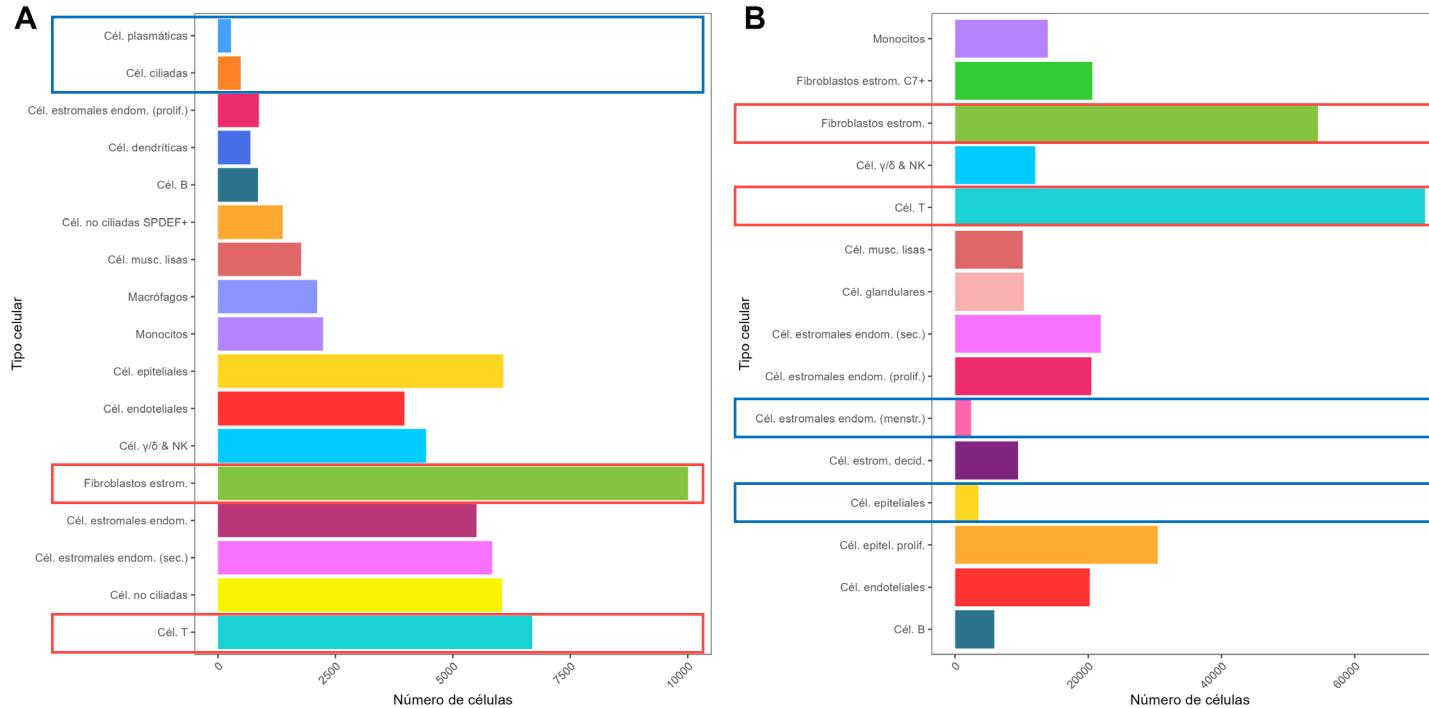


18 subtipos celulares



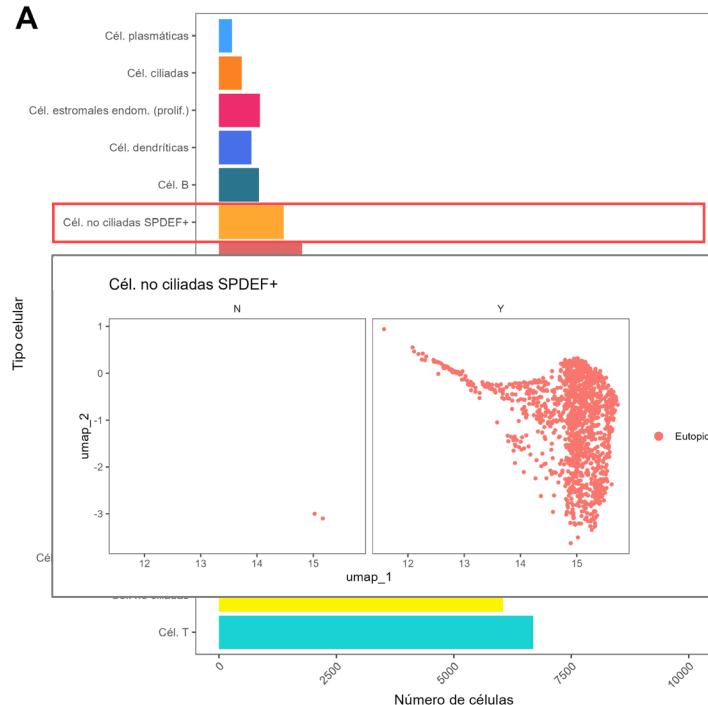
15 subtipos celulares

Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

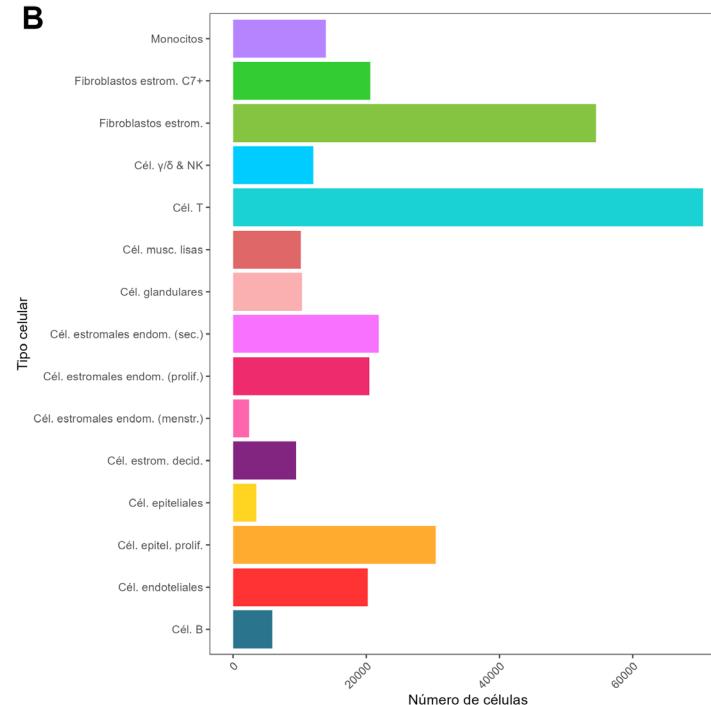


Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

Dataset A: con terapia hormonal (progéstáneos/estrógenos)



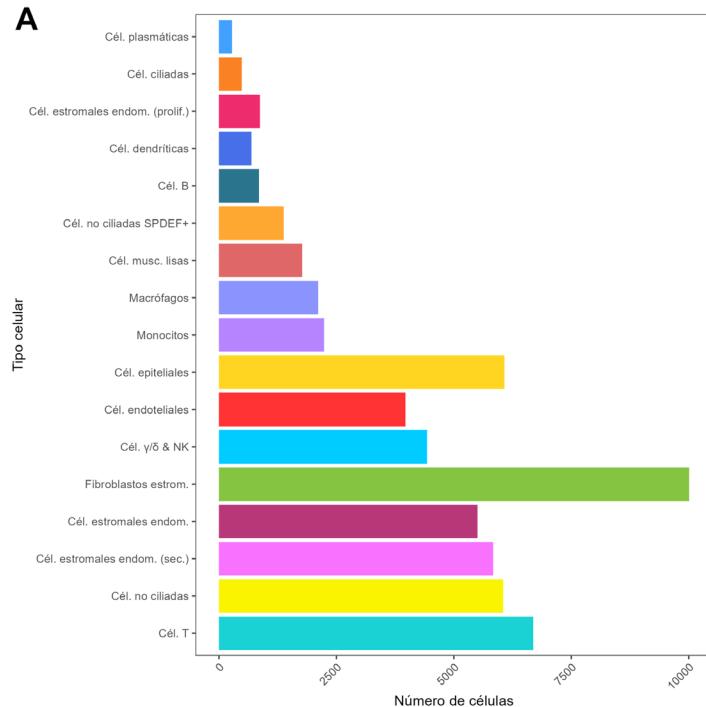
Dataset B: sin terapia hormonal



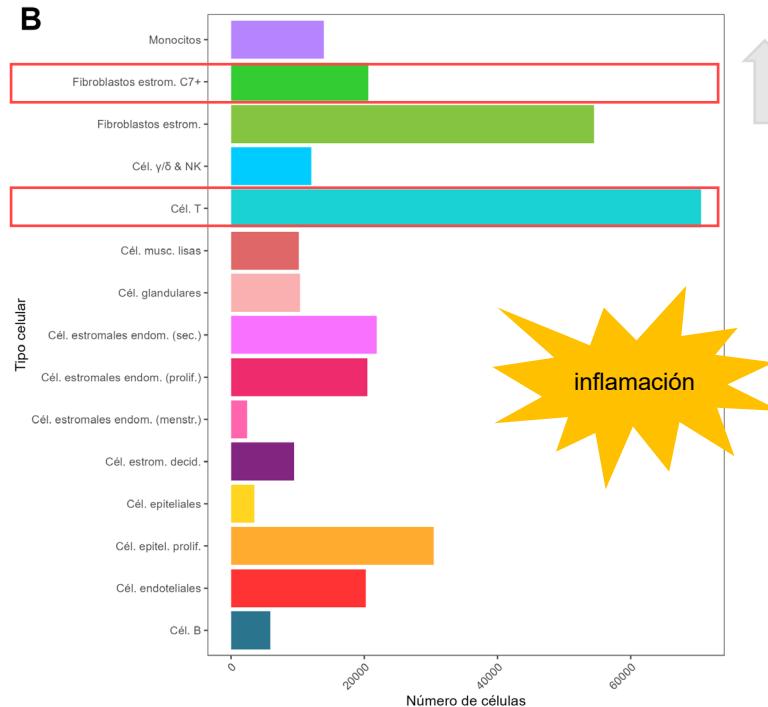
Diferencias
debido a
factores
hormonales
y muestrales

Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

Dataset A: con terapia hormonal (progesteráneos/estrógenos)



Dataset B: sin terapia hormonal

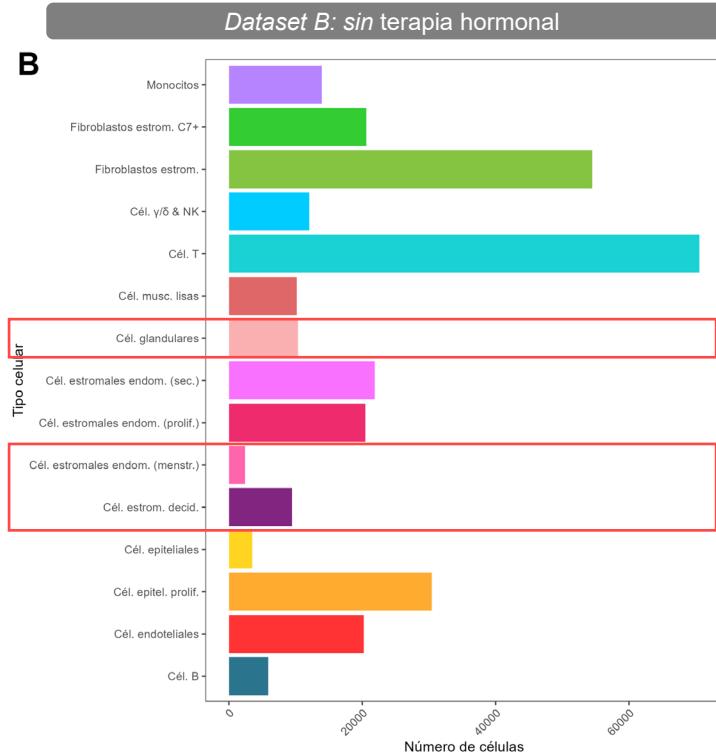
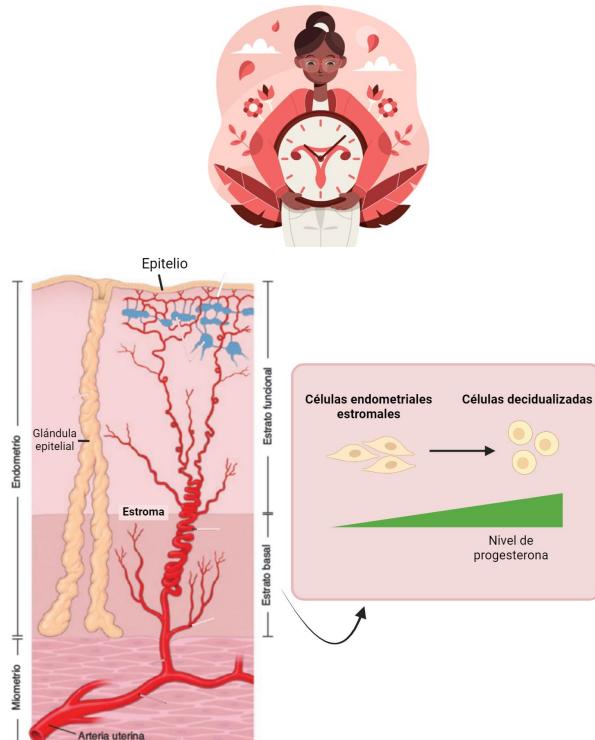


↑
Expresión C7
(endometriosis)

inflamación

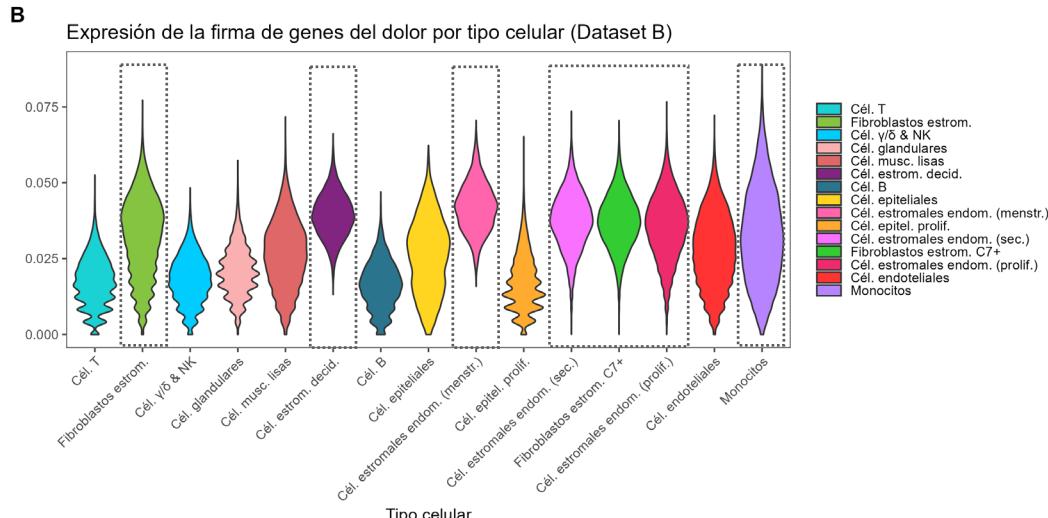
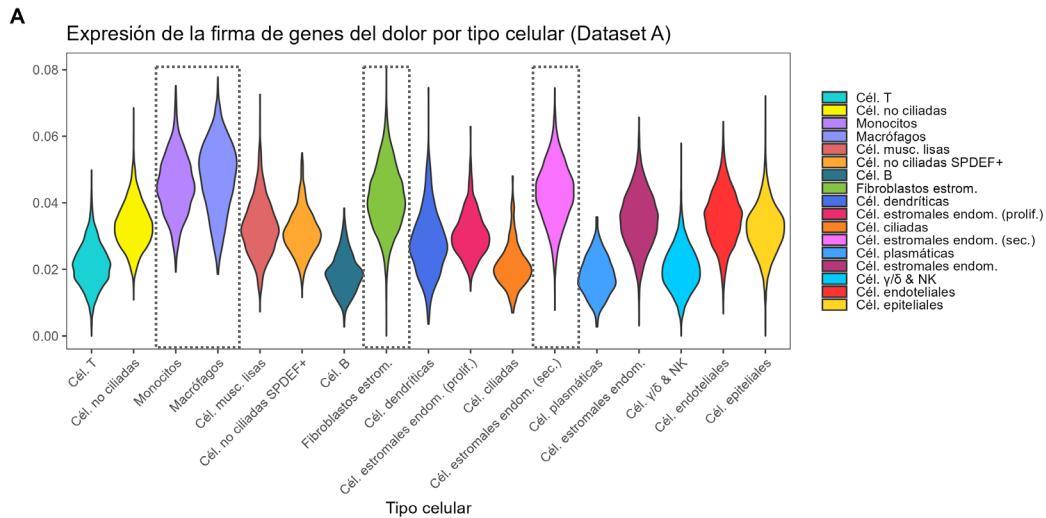
Diferencias
debido a
factores
hormonales
y muestrales

Caracterización de células del endometrio sano y lesiones endometriales

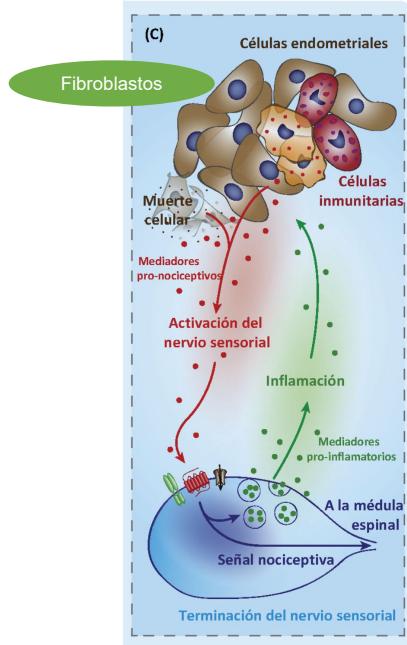


Diferencias
debido a
factores
hormonales
y muestrales

Caracterización de genes del dolor en células estromales, inmunes y fibroblastos

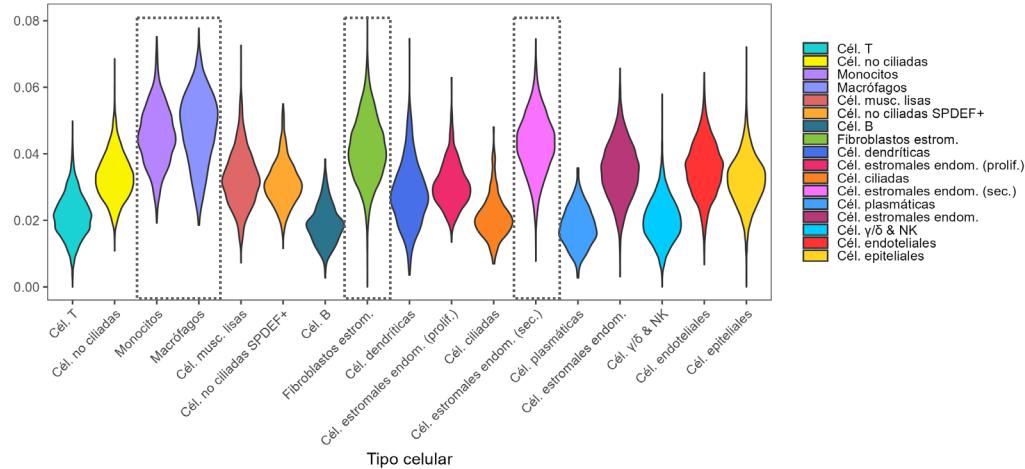


Caracterización de genes del dolor en células estromales, inmunes y fibroblastos

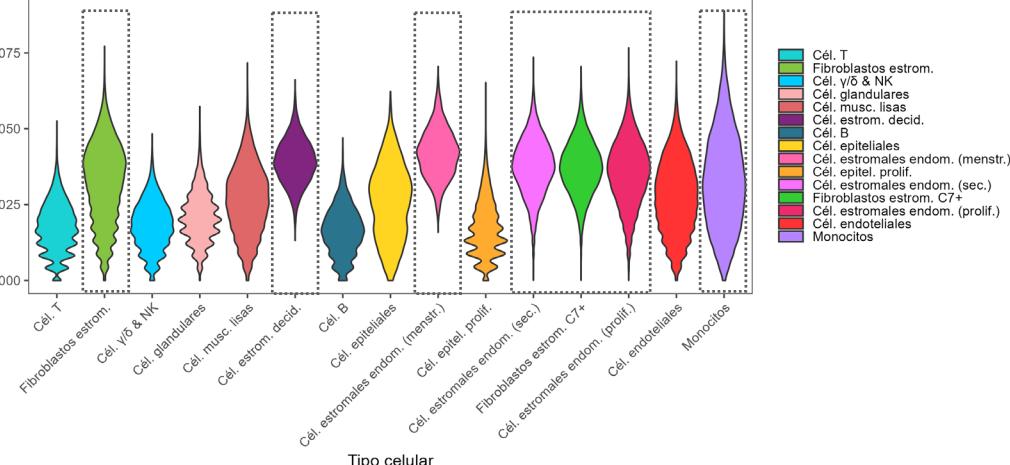


Análisis de datos de *single cell RNA-seq* para evaluar la eficacia

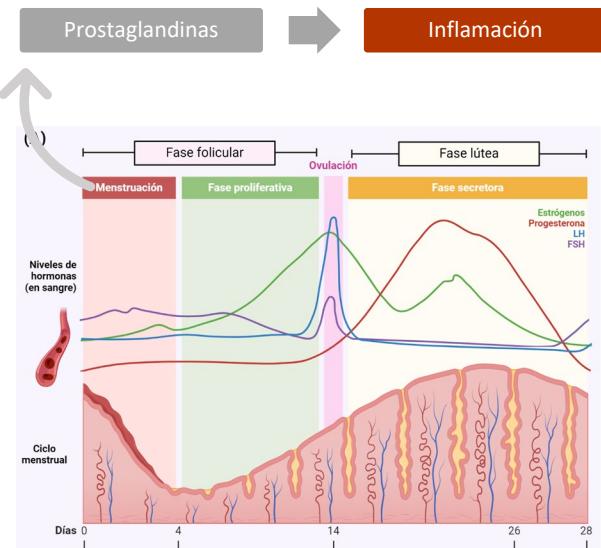
A Expresión de la firma de genes del dolor por tipo celular (Dataset A)



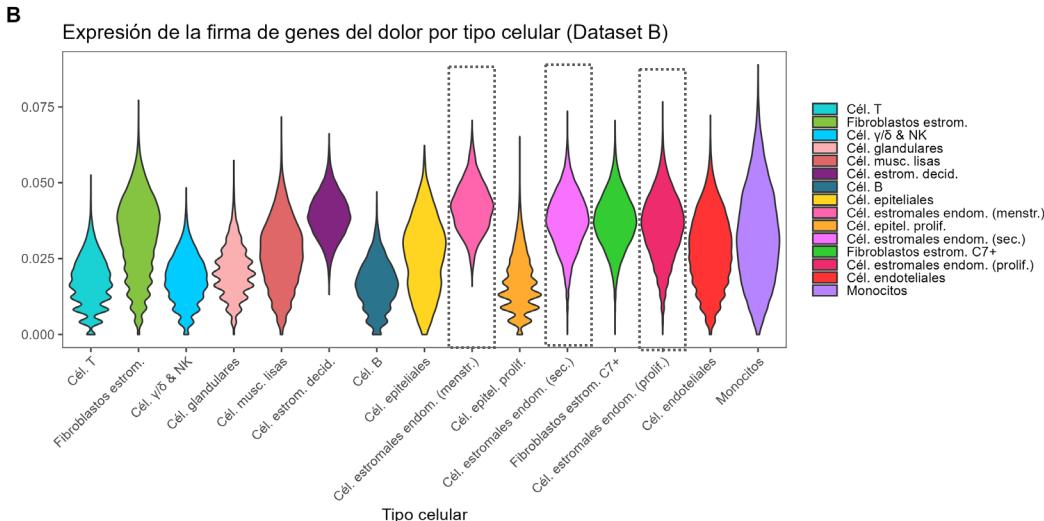
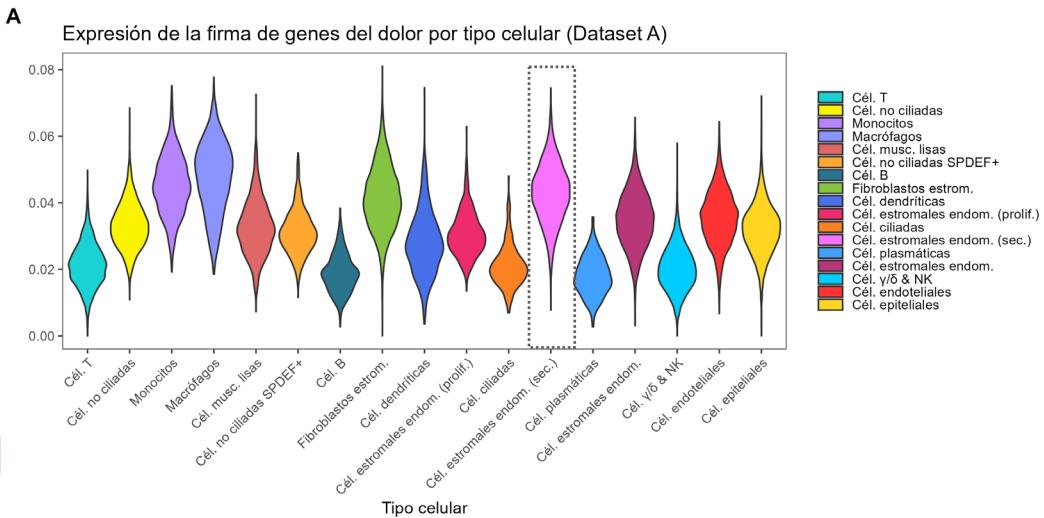
B Expresión de la firma de genes del dolor por tipo celular (Dataset B)



Caracterización de genes del dolor en células estromales, inmunes y fibroblastos



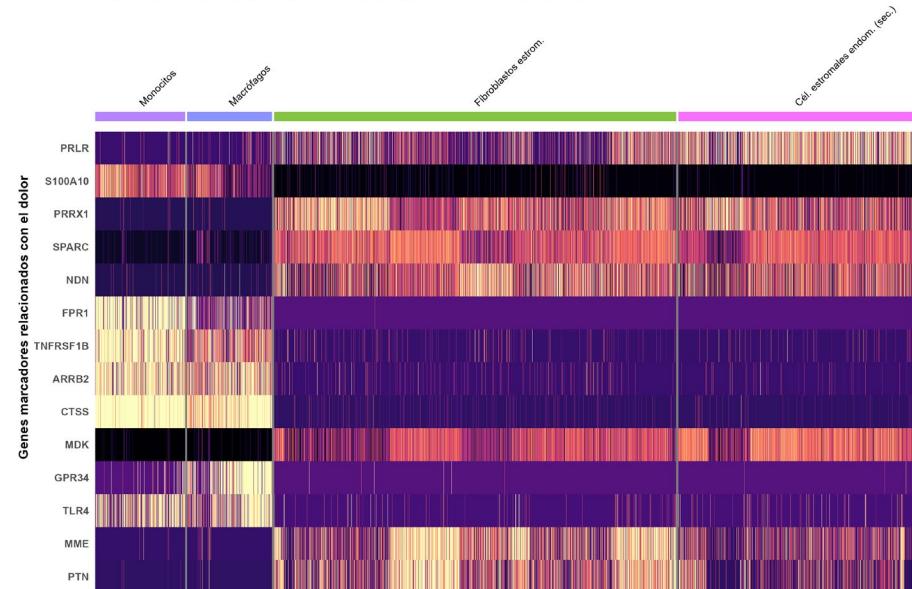
Análisis de datos de *single cell RNA-seq* para evaluar la eficacia



Caracterización de genes del dolor en células estromales, inmunes y fibroblastos

A

Expresión en las células con firma de genes del dolor (Dataset A)



14 genes

22 genes asociados al dolor
(8 en común)

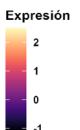
B

Expresión en células con firma de genes del dolor (Dataset B)



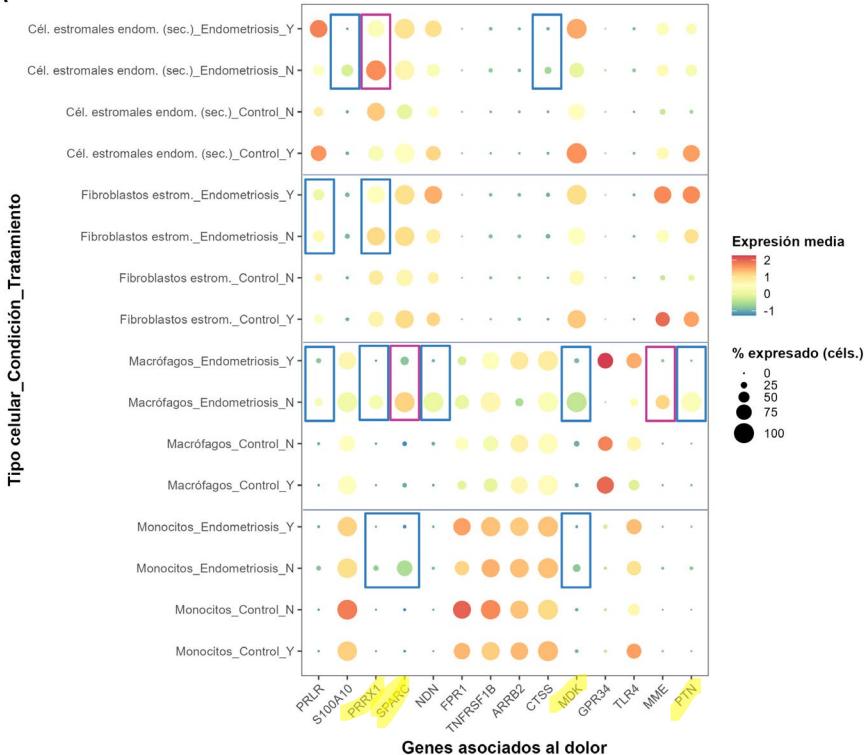
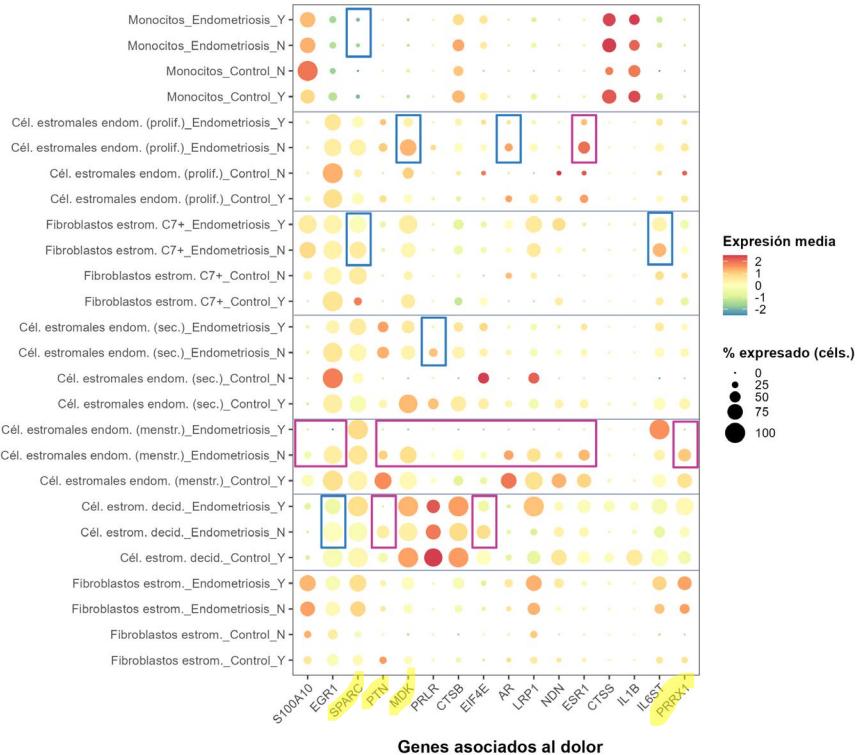
16 genes

Expresión



- 1
- 0
- 1
- 2

Impacto del tratamiento en los genes implicados en la vía del dolor

A**B**

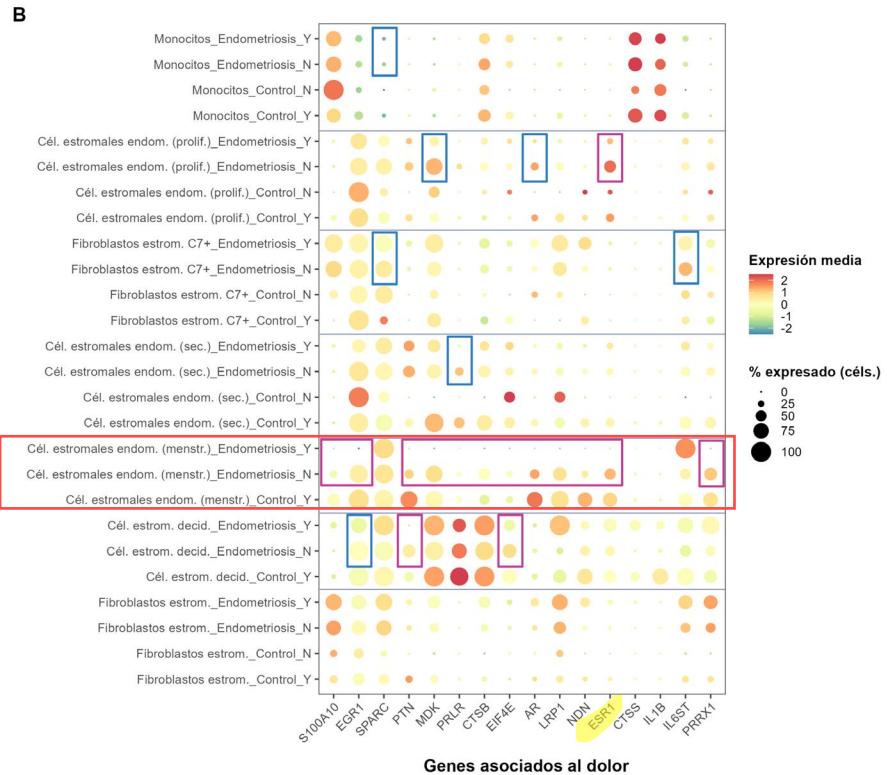
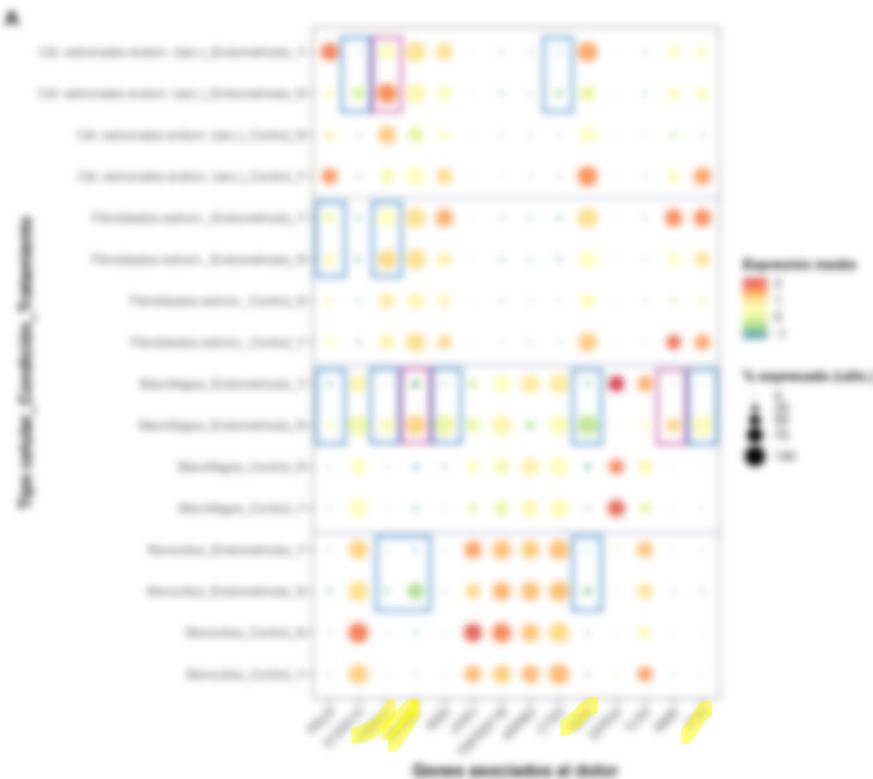
Análisis de datos de *single cell RNA-seq* para evaluar la eficacia de la terapia hormonal en el tratamiento del dolor en la endometriosis

Impacto del tratamiento en los genes implicados en la vía del dolor

- **SPARC** - síntesis de la matriz extracelular, pudiendo contribuir a la proliferación de nuevas lesiones y fibrosis. Teniendo en cuenta que estos procesos están asociados al dolor, el tratamiento hormonal estaría disminuyendo su progresión y, por ende, también la nocicepción.
- **PTN** (pleiotrofina) y **MDK** (*midkine*) están involucrados en la angiogénesis y tienen un posible papel en la implantación del endometrio ectópico.
- **PRRX1**, a su vez, está relacionado con la proliferación de células tumorales.

La disminución en la expresión de estos genes en células estromales debido al tratamiento hormonal podría estar relacionada con una menor proliferación celular y, por tanto, una menor activación inflamatoria, lo que contribuiría a una disminución del dolor percibido.

Impacto del tratamiento en los genes implicados en la vía del dolor



Análisis de datos de *single cell RNA-seq* para evaluar la eficacia de la terapia hormonal en el tratamiento del dolor en la endometriosis

Impacto del tratamiento en los genes implicados en la vía del dolor

- La reducción de la expresión genética de los genes asociados al dolor tanto en células inmunes, como estromales, en diferentes fases del ciclo menstrual, y algo menos en fibroblastos, sugiere que el tratamiento hormonal impacta en los mecanismos que regulan la percepción del dolor.
- Sin embargo, las limitaciones computacionales pueden haber influido en las conclusiones sobre la expresión diferencial de genes asociados al dolor.
- Para obtener resultados más robustos y fiables, sería necesario abordar estas limitaciones técnicas en futuros análisis.
- Además, se requiere la realización de más estudios para validar estos hallazgos y explorar en mayor profundidad el papel de las subpoblaciones celulares con firma de dolor en la regulación de este síntoma en pacientes con endometriosis.

Conclusiones

- Gracias al análisis de dos conjuntos de datos de scRNA-seq (A y B) se logró identificar y caracterizar los principales tipos celulares del endometrio eutópico y ectópico implicados en la vía del dolor en pacientes con endometriosis: las células estromales, inmunes (monocitos y macrófagos) y fibroblastos estromales.
- Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de varios genes asociados al dolor entre las pacientes con endometriosis que han recibido tratamiento hormonal y aquellas que no lo han recibido, en células inmunes y estromales, con menor impacto en fibroblastos estromales.
- Genes como *SPARC*, *MDK*, *PRRX1* y *PTN* mostraron una expresión reducida en células inmunes y estromales en pacientes bajo tratamiento hormonal en ambos conjuntos de datos analizados, lo que sugiere que esta terapia tiene un impacto en los mecanismos responsables de la percepción del dolor, al reducir la proliferación celular.
- La disminución de *ESR1* (receptor de estrógenos) en células estromales en el conjunto de datos B refuerza la relación entre la reducción del dolor y la modulación hormonal, lo cual es coherente con el carácter inflamatorio y dependiente de estrógenos de la endometriosis.
- La mayor parte de los genes estudiados en el conjunto de datos B mostró una reducción en su expresión en células estromales durante la fase menstrual del ciclo, lo que respalda el efecto positivo del tratamiento hormonal en la disminución del dolor menstrual (dismenorrea).

¡Muchas gracias!

The logo consists of the lowercase letters "viu" in white, sans-serif font, centered within a solid orange circle.

viu

Universidad
Internacional
de Valencia