



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

Análisis histológico y transcriptómico de lesiones corticales  
de pacientes con Esclerosis Múltiple

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Casas Hidalgo, Lucía

Tutor/a: Galindo Orozco, Máximo Ibo

Cotutor/a externo: CUBAS NUÑEZ, LAURA

Director/a Experimental: GASQUE RUBIO, RAQUEL

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



## *ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y TRANSCRIPTÓMICO DE LESIONES CORTICALES DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE*

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: LUCÍA CASAS HIDALGO

TUTOR UPV: MÁXIMO IBO GALINDO OROZCO

TUTORA IIS La Fe: LAURA CUBAS NÚÑEZ

DIRECTORA EXPERIMENTAL: RAQUEL GASQUE RUBIO

*Curso Académico: 2022-2023*

VALENCIA, 1 de Junio de 2023

## RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica y autoinmune del sistema nervioso central (SNC) que afecta a más de 2 millones de personas en el mundo, y que presenta tres formas clínicas principales: la esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR), la esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP) y la secundaria progresiva (EMSP). El sello patológico de la enfermedad son las lesiones focales desmielinizantes en sustancia blanca, por lo que la mayoría de los estudios hasta la fecha han enfocado sus investigaciones en estas lesiones. No obstante, la afectación cortical ha demostrado tener una estrecha relación con determinados factores de progresión en estos pacientes, como el deterioro cognitivo o la discapacidad. Los mecanismos intrínsecos a la formación de lesiones corticales son parcialmente conocidos hasta la fecha, por lo que se necesita conocer más sobre el perfil transcriptómico de estas. Las tecnologías de transcriptómica espacial permiten la visualización de patrones de moléculas de ARNm en regiones de tejido de interés proporcionando una localización bidimensional de los transcritos en el tejido. Los objetivos de este trabajo fueron la localización y caracterización de las lesiones corticales de pacientes con EM y el posterior estudio de la expresión génica espacial en dichas lesiones utilizando la tecnología Visium.

En este trabajo se analizaron las lesiones presentes en 6 muestras de 3 pacientes con EMRR, EMSP y EMPP y 2 controles. Se llevaron a cabo dos pasos iniciales de caracterización de las lesiones y optimización del tiempo de permeabilización del tejido para detectar la máxima señal de ARNm; las lesiones encontradas se clasificaron en lesiones crónicas inactivas (n=4) y lesión activa (n=1) y el tiempo óptimo de permeabilización se estableció en 24 minutos. El desarrollo del protocolo de expresión génica espacial Visium constó de diferentes pasos de adherencia del tejido al portaobjetos, liberación del ARNm, captura local por sondas codificadas espacialmente, retrotranscripción, amplificación del ADNc generado, construcción de la librería y secuenciación. Empleando el software *Loupe Browser*, se analizaron los niveles de expresión de los genes que codificaban las proteínas estudiadas previamente a nivel histológico (*PLP1*, *CD68* y *CD3D*) y marcadores genéticos específicos de tipos celulares del SNC (*MAP2*, *CNP* y *GFAP*). Posteriormente, un segundo análisis de expresión génica diferencial nos permitió elucidar la diversidad celular presente en el centro de la lesión activa. Los resultados del estudio de transcriptómica espacial mostraron una correlación con las diferencias observadas a nivel inmunohistoquímico. El centro de la lesión activa estuvo formado en su mayoría por astrocitos, siendo el gen *GFAP* el más sobreexpresado ( $p < 0,001$ ), seguido del gen *B3GAT2* ( $p < 0,001$ ) y del gen *AQP4* ( $p < 0,001$ ), además de hallar otros genes expresados en oligodendrocitos, microglía y neuronas.

En conclusión, el empleo de la transcriptómica espacial ha permitido el mapeo de los principales tipos celulares presentes en lesiones de córtex cerebral de pacientes con EM. La sobreexpresión de los genes *GFAP*, *AQP4*, *S100B* y *GJA1* ha permitido establecer una firma genética que señala a los astrocitos reactivos como las células dominantes en el centro de la lesión activa.

Palabras clave: Esclerosis múltiple, córtex cerebral, lesión activa, inmunohistoquímica, transcriptómica espacial, expresión génica.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, autoimmune disease of the central nervous system affecting more than 2 million people worldwide, with three main clinical forms: relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS), primary progressive multiple sclerosis (PPMS) and secondary progressive multiple sclerosis (SPMS). The pathological hallmark of the disease is focal demyelinating lesions in the white matter, and most studies in recent decades have focused their investigations on these lesions. However, cortical involvement has been shown to be closely related to certain progression factors in these patients, such as cognitive impairment or disability. The mechanisms intrinsic to the formation of cortical lesions are only partially understood to date, so more needs to be known about the transcriptomic profile of these regions. Spatial transcriptomics technologies allow the visualisation of mRNA molecule patterns in tissue regions of interest by providing a two-dimensional localisation of transcripts in tissue. The objectives of this work were the localisation and characterisation of cortical lesions in MS patients and the subsequent study of spatial gene expression in these lesions using Visium technology.

In this work, lesions present in 6 samples from 3 patients with RRMS, PPMS and PPMS and 2 controls were analysed. Two initial steps of lesion characterisation and optimisation of tissue permeabilization time were performed to detect maximal mRNA signal; the lesions found were classified into chronic inactive lesions (n=4) and active lesion (n=1) and the optimal permeabilization time was set at 24 minutes. The development of the Visium spatial gene expression protocol consisted of different steps of tissue attachment to the slide, mRNA release, local capture by spatially encoded probes, retrotranscription, amplification of the generated cDNA, library construction and sequencing. Using the *Loupe Browser* software, the expression levels of genes encoding proteins previously studied at the histological level (*PLP1*, *CD68* and *CD3D*) and CNS cell type-specific gene markers (*MAP2*, *CNP* and *GFAP*) were analysed. A second differential gene expression analysis then allowed us to elucidate the cellular diversity present in the centre of the active lesion. The results of the spatial transcriptomics study correlated with the differences observed at the immunohistochemical level. The centre of the active lesion consisted mostly of astrocytes, with the *GFAP* gene being the most overexpressed ( $p < 0,001$ ), followed by the *B3GAT2* gene ( $p < 0,001$ ) and the *AQP4* gene ( $p < 0,001$ ), in addition to other genes expressed in oligodendrocytes, microglia and neurons.

In conclusion, the use of spatial transcriptomics has allowed the mapping of the main cell types present in cerebral cortex lesions of MS patients. Overexpression of *GFAP*, *AQP4*, *S100B* and *GJA1* genes has allowed the establishment of a genetic signature that points to reactive astrocytes as the dominant cells in the zone of increased activity of the active lesion.

Keywords: Multiple sclerosis, cerebral cortex, active lesion, immunohistochemistry, spatial transcriptomics, gene expression.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al equipo de la Unidad de Neuroinmunología del IIS La Fe de Valencia, que ha estado detrás de este proyecto, por darme la extraordinaria oportunidad de trabajar con la última tecnología y acogerme en la realización de este trabajo. A Laura, por haber sido una gran tutora, un referente durante todos estos meses y por toda su inestimable ayuda. A Raquel, por haber sido mi mano a mano en el laboratorio cada día y dejarme aportar mi granito de arena en su investigación. A Jessica, por llenar de alegría el laboratorio todas las mañanas y enseñarme los verdaderos almuerzos valencianos. Gracias por confiar en mí y hacerme sentir una más de vosotras desde el primer día.

A mis padres y a mi hermano, por haberme dado la posibilidad de estudiar lo que realmente me llena y apoyarme en todo momento, en especial, a mi madre, por dejarse la piel en ayudarme incluso a cientos de kilómetros de distancia.

A Adrián, por apoyarme en todos y cada uno de mis proyectos pese a que eso signifique estar separados, por animarme y alegrarse de mis logros más que nadie.

En último lugar, a Patricia y Carlota, por haber sido las mejores compañeras de vida durante este año, y a toda la gente que ha hecho de mi primera experiencia en el mundo de la investigación un recuerdo muy especial.

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARN-seq: Secuenciación de ARN

ARC: Amplificación en círculo rodante

BC: *Barcode* o código de barras

BHE: Barrera hematoencefálica

BOC: Bandas oligoclonales

CA: Centro activo

CEIM: Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos

CD68: Clúster de diferenciación 68

CD3: Clúster de diferenciación 3

CNAG: Centro Nacional de Análisis Genómico

CPO: Células precursoras de oligodendrocitos

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

EDSS: Escala expandida del estado de discapacidad

EM: Esclerosis múltiple

EMCD: Esclerosis múltiple clínicamente definida

EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente

EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva

EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HCl: Ácido clorhídrico

H&E: Hematoxilina-eosina

HIS: Hibridación *in situ*

INF- $\gamma$ : Interferón gamma

IgG: Inmunoglobulina G

IL-6: Interleukina-6

IL-17: Interleukina 17

LA: Lesión activa

LCA: Lesión crónica activa

LCI: Lesión crónica inactiva

LCR: Líquido cefalorraquídeo

Linfocito Th1/Th17: Linfocito T helper 1/17

MetOH: Metanol

NAWM: *Normal appearing white matter* o sustancia blanca de apariencia normal

NK: Natural killer

NO: Óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido

OCT compound: *Optimal cutting temperature compound* o compuesto para la temperatura óptima de corte

PG-M1: Fosfoglucutasa-1

PLP: Proteína proteolípica

RT: Retrotranscripción

TR: Tejido restante

SCA: Síndrome clínico aislado

scRNA-seq: Single cell RNA sequencing o secuenciación de RNA de célula única

SI: Sistema inmunitario

SIS: Secuenciación in situ

SNC: Sistema nervioso central

SSC: *Saline sodium citrate* o solución de citrato de sodio

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* o dodecilsulfato de sodio

SB: Sustancia blanca

SG: Sustancia gris

TNF: *Tumor necrosis factor* o factor de necrosis tumoral

UMI: *Unique molecular identifier* o identificador único molecular

VCAM-1: *Vascular cell adhesion molecule 1* o molécula de adhesión endotelial 1

VLA-4: Integrina  $\alpha 4\beta 1$

# ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	3
1.	Definición de la enfermedad, epidemiología y formas clínicas .....	3
2.	Patogenia e inmunidad en la EM .....	4
2.1.	Inmunidad innata .....	5
2.2.	Inmunidad adaptativa celular y humoral .....	5
2.3.	Autoinmunidad .....	6
3.	Clasificación de las lesiones cerebrales en EM .....	7
3.1.	Tipos de lesiones y formas clínicas de la EM .....	8
4.	Lesiones corticales .....	9
4.1.	Tipos de lesiones corticales .....	10
5.	Transcriptómica espacial .....	11
5.1.	Aplicaciones de la transcriptómica espacial en EM.....	14
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1.	Muestras de tejido humano <i>post mortem</i> .....	17
2.	Inmunohistoquímica.....	17
3.	Evaluación histopatológica y caracterización del tipo de lesión.....	18
4.	Flujo de trabajo de transcriptómica espacial: Optimización del tejido .....	19
4.1.	Permeabilización y síntesis de ADNc .....	19
4.1.	Retirada del tejido .....	19
5.	Flujo de trabajo de transcriptómica espacial: Expresión génica.....	21
5.1.	Permeabilización y transcripción reversa .....	21
5.2.	Síntesis de la segunda hebra y desnaturalización .....	22
5.3.	Amplificación de ADNc y control de calidad.....	22
5.4.	Construcción de la librería para la expresión génica espacial .....	23
6.	Análisis de datos de transcriptómica espacial.....	25
6.1.	Análisis de expresión génica diferencial en la lesión activa.....	25
IV.	RESULTADOS .....	28
1.	Caracterización de las lesiones por inmunohistoquímica .....	28
2.	Optimización del tiempo de permeabilización del tejido .....	31
3.	Resultados del software <i>Space Ranger</i> .....	32



4.	Análisis de la expresión génica espacial .....	34
4.1.	Correlación entre el análisis histológico y transcriptómico .....	34
4.2.	Caracterización de las lesiones mediante transcriptómica espacial.....	35
4.3.	Análisis de expresión génica diferencial en la lesión activa.....	37
V.	DISCUSIÓN .....	40
VI.	CONCLUSIONES.....	45
VII.	BIBLIOGRAFÍA .....	46
	ANEXO 1 .....	52
	ANEXO 2 .....	55
	ANEXO 3 .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Formas clínicas de la EM.....	4
Figura 2.	Inmunidad involucrada en la EM.....	7
Figura 3.	Clasificación de lesiones cerebrales y su distribución según las formas clínicas de EM.....	9
Figura 4.	Tipos de lesiones corticales en EM.....	11
Figura 5.	Tecnologías para el estudio de la transcriptómica espacial.....	14
Figura 6.	Protocolo de optimización del tejido de Visium.....	20
Figura 7.	Protocolo de expresión génica espacial de Visium.....	26
Figura 8.	Caracterización de la lesión activa.....	29
Figura 9.	Caracterización de la lesión crónica inactiva.....	30
Figura 10.	Caracterización de la lesión crónica inactiva remielinizada.....	31
Figura 11.	Caracterización del control.....	32
Figura 12.	Determinación del tiempo óptimo de permeabilización.....	33
Figura 13.	Distribución de la expresión génica para los genes <i>PLP1</i> , <i>CD68</i> y <i>CD3D</i> .....	36
Figura 14.	Distribución de la expresión génica para los genes <i>MAP2</i> , <i>CNP</i> y <i>GFAP</i> .....	38
Figura 15.	Mapa de calor.....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Información clínica y patológica de los donantes de las muestras de tejido cerebral.	17
Tabla 2.	Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.....	18
Tabla 3.	Valores obtenidos por el software <i>Space Ranger</i> .....	34
Tabla 4.	Listado de los 20 principales genes sobreexpresados de la región activa de la lesión activa y la significancia de la expresión del gen en la misma región expresado en <i>p</i> -valor (**** $p < 0.001$ ; *** $p < 0.01$ ).....	39

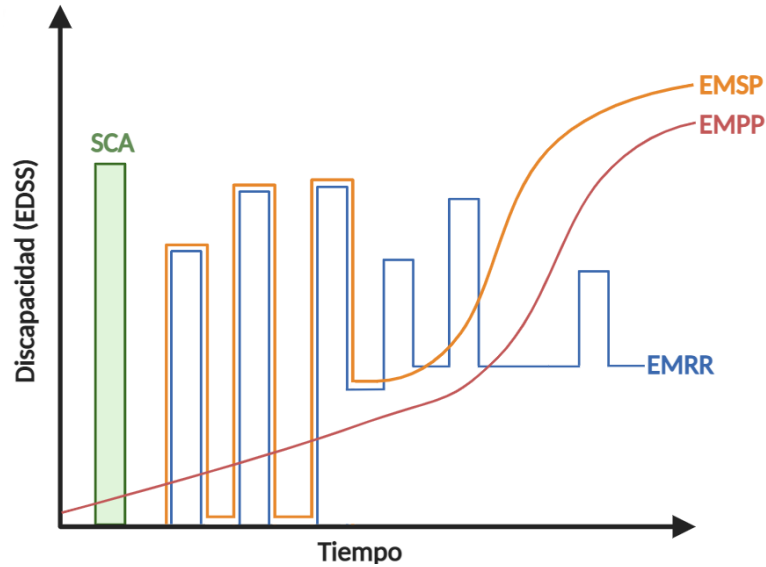
# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Definición de la enfermedad, epidemiología y formas clínicas

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica de base inflamatoria y autoinmune del sistema nervioso central (SNC) que afecta a un total de 2,8 millones de personas en todo el mundo (Reich et al., 2018). La EM es el trastorno neurológico discapacitante no traumático más común en adultos jóvenes, en la mayoría de los casos, con un inicio entre los 20 y 40 años (Dobson & Giovannoni, 2019; Mancinelli et al., 2021). España es una región que presenta una prevalencia media-alta de la enfermedad (80-100 casos por cada 100.000 habitantes) y su incidencia es superior en mujeres (Pérez-Carmona et al., 2019).

La EM es una enfermedad heterogénea caracterizada por dos fenómenos clínicos: la inflamación aguda y una progresión sostenida de la discapacidad. En gran parte de los pacientes, la enfermedad comienza con episodios agudos total o parcialmente reversibles de afectación neurológica en los que predomina una inflamación local y que comúnmente se denominan “brotes” (Reich et al., 2018). Los síntomas típicos en el inicio incluyen brotes episódicos de fatiga, entumecimiento, problemas visuales, espasticidad o rigidez, problemas intestinales y de la vejiga, etc. Además, en un cierto número de pacientes puede ocurrir un proceso neurodegenerativo que tiene lugar independientemente de los brotes y que es el principal responsable de la discapacidad de los pacientes (Filippi et al., 2018). Estos dos fenómenos hacen referencia a las diferentes formas clínicas o subtipos de la enfermedad (Figura 1):

El **síndrome clínico aislado (SCA)** hace referencia al primer evento clínico que engloba un episodio de inflamación y desmielinización del sistema nervioso central (SNC) altamente sugerente de EM pero que no cumple sus criterios diagnósticos. La EM comienza con SCA en un alto porcentaje de pacientes y se transforma en EM clínicamente definida (EMCD) cuando estos desarrollan un segundo ataque. La **EM remitente-recurrente (EMRR)** es el fenotipo más común de EM (85% de los pacientes con EM) y se caracteriza por episodios de empeoramiento agudo del funcionamiento neurológico con una recuperación total o parcial y sin una progresión aparente de la enfermedad (Filippi et al., 2018; Klineova & Lublin, 2018). Después de 10-15 años desde el comienzo de la EMRR, un 30-35% de los pacientes desarrollan un curso progresivo de la enfermedad denominado **esclerosis múltiple secundaria progresiva (EMSP)** (Dobson & Giovannoni, 2019). En la EMSP la función neurológica empeora progresivamente y la discapacidad se acumula con el tiempo, con o sin brotes. En último lugar, aproximadamente un 10-20% de los pacientes desarrollan la denominada **esclerosis múltiple primaria progresiva (EMPP)** que se caracteriza por una ausencia de la fase remitente-recurrente y una progresión constante desde el inicio de la enfermedad. En esta forma clínica, la función neurológica empeora tan pronto como aparecen los síntomas y no presenta brotes (Filippi et al., 2018; Klineova & Lublin, 2018).



**Figura 1. Formas clínicas de la EM.** El **SCA** se representa con un único brote de al menos 24 horas de duración y denota el primer síntoma neurológico sugestivo de esclerosis múltiple. El curso de la EM en su forma **EMRR**, representada en azul, se caracteriza por la aparición de recaídas a intervalos irregulares que pueden desaparecer total o parcialmente. La forma **EMSP**, representada en naranja, comienza con episodios de brotes pero a lo largo del tiempo los pacientes desarrollan una discapacidad progresiva e irreversible que se produce independientemente de los brotes. La forma **EMPP**, representada en rojo, se caracteriza por una progresión de la enfermedad y una consiguiente acumulación de la discapacidad desde el inicio de los síntomas, sin brotes tempranos. La discapacidad se muestra en la escala expandida del estado de discapacidad (EDSS). Figura creada con BioRender.com. *SCA: Síndrome clínico aislado; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; EDSS: Escala expandida del estado de discapacidad.*

La EM es una enfermedad de causa desconocida ya que aún no se ha identificado un desencadenante etiológico específico. Sin embargo, se sabe que se trata de una enfermedad multifactorial influenciada por varios factores de riesgo genéticos y ambientales (Olsson et al., 2016). Estudios de asociación del genoma completo han identificado a los polimorfismos en genes del complejo mayor de histocompatibilidad como los factores de riesgo genético más significativos (Dendrou et al., 2015; Filippi et al., 2018; Olsson et al., 2016; Piquet & Alvarez, 2021). Los principales factores de riesgo ambientales incluyen la latitud geográfica, la baja exposición a la luz ultravioleta B y con ello los bajos niveles de vitamina D, la obesidad y el tabaquismo. Asimismo, el virus de Epstein-Barr ha demostrado ser el agente infeccioso más relacionado con esta patología, ya que la infección sintomática con este virus duplica las posibilidades de padecer EM (Bjornevik et al., 2022; Dobson & Giovannoni, 2019).

## 2. Patogenia e inmunidad en la EM

El cambio patológico más característico en los cerebros con EM es la formación de grandes placas focales, también conocidas como lesiones. Son áreas de extensa desmielinización que se encuentran principalmente en la sustancia blanca (SB) del cerebro, pero también se han descrito en la materia gris profunda y cortical. Estas placas indican una pérdida de las vainas de mielina

que rodean a los axones y oligodendrocitos, se localizan típicamente alrededor de los capilares y se caracterizan por una ruptura de la barrera hematoencefálica (Dendrou et al., 2015; Dobson & Giovannoni, 2019; Mancinelli et al., 2021). La EM está estrechamente vinculada al sistema inmunitario (SI) puesto que el daño al SNC que se produce en la enfermedad resulta de la combinación de respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas (Piquet & Alvarez, 2021).

### **2.1. Inmunidad innata**

Pese a que múltiples tipos celulares (astrocitos, células dendríticas, células asesinas naturales o NK (del inglés *natural killer*), etc.) están involucrados en las respuestas inmunes innatas del sistema nervioso, los macrófagos y la microglía son los contribuyentes innatos más relevantes a los cambios patológicos observados en la EM (Hemmer et al., 2015).

La secreción de citoquinas pro-inflamatorias induce la activación de ambos tipos celulares, las cuales, a su vez, producen otros mediadores pro-inflamatorios y radicales de oxígeno y óxido nítrico que conducen a la desmielinización y pérdida axonal (Figura 2) (Grigoriadis & van Pesch, 2015).

La microglía, el principal fagocito endógeno del SNC, adopta un fenotipo activado y presenta un papel crítico en la presentación de antígenos a linfocitos T y en la fagocitosis de mielina, contribuyendo a la desmielinización (Guerrero & Sicotte, 2020). No obstante, también se ha descrito un papel protector de la microglía activada en el SNC, ya que juega una función importante en la limpieza de las células muertas y desechos, un proceso necesario para la resolución de la inflamación y remielinización (Grigoriadis & van Pesch, 2015). De esta manera, se desconoce si la fagocitosis de la mielina tiene una función inflamatoria o, por el contrario, neuroprotectora.

Además de macrófagos y microglía, otras células de la inmunidad innata están implicadas en los procesos fisiopatológicos que conducen a la pérdida de mielina y daño axonal. Un clásico ejemplo son los astrocitos, que pueden controlar la infiltración de células del SI periférico al SNC y regular la actividad de la microglía, oligodendrocitos y células del SI adaptativo (Grigoriadis & van Pesch, 2015).

### **2.2. Inmunidad adaptativa celular y humoral**

Las células dendríticas, debido a su función de presentación antigénica, son capaces de comunicarse con linfocitos T *naïve* y determinar la respuesta adaptativa, por lo que son consideradas el nexo conector entre ambos tipos de inmunidad. Estas células, dependiendo del tipo de citoquina secretada, median la activación de los principales subconjuntos de células T, los linfocitos T CD4+ y CD8+, también conocidos como linfocitos T *helper* y citotóxicos, respectivamente (Grigoriadis & van Pesch, 2015). Ambos tipos de linfocitos están implicados en la patogénesis de EM.

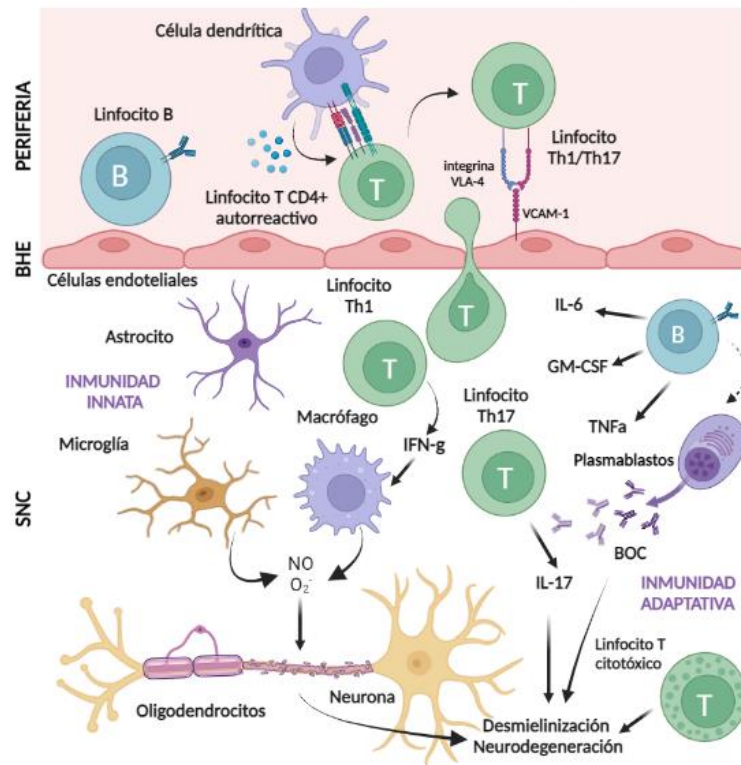
Los linfocitos T efectores y proinflamatorios más implicados en la EM son los linfocitos TCD4+ que expresan IL-17, conocidos como los linfocitos Th17, los linfocitos Th1 y los linfocitos T CD8+. Se especula que estas células ocasionan el daño directo a los oligodendrocitos y neuronas y el daño indirecto a los tejidos mediante la activación de otros tipos celulares, como los macrófagos (Figura 2) (Dendrou et al., 2015; Hemmer et al., 2015).

Por otro lado, los linfocitos B también están altamente implicados en la patogénesis de la EM. Pese a que se creía que el papel de los linfocitos B se limitaba a la producción de anticuerpos, en la EM, se ha visto que, además, aumentan su número en las lesiones y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como resultado de su expansión clonal. Los linfocitos B de memoria pueden diferenciarse en plasmablastos, que son los responsables de la producción de las bandas oligoclonales (BOC) de tipo inmunoglobulina G (IgG) observables en el LCR de una gran mayoría de pacientes con EM (Grigoriadis & van Pesch, 2015). Asimismo, los linfocitos B de pacientes con EM pueden producir una respuesta alterada mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias como la interleukina-6, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y el factor de necrosis tumoral (IL-6, GM-CSF, TNF) o presentación antigénica, induciendo respuestas aberrantes de linfocitos Th1 y Th17 (Figura 2) (Filippi et al., 2018).

### **2.3. Autoinmunidad**

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune en la que ocurre una desregulación de la respuesta inmune debido a una ruptura de la tolerancia inmunológica, es decir, la capacidad que tiene nuestro sistema inmunitario de eliminar los clones autorreactivos (que reconocen antígenos propios) de linfocitos B y T. Durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo, determinados linfocitos T CD4 + autorreactivos no se descartan y se diferencian en linfocitos T reguladores, que serán los encargados de suprimir las respuestas autoinmunitarias (Hemmer et al., 2015).

Durante el establecimiento de la tolerancia central en el timo, la mayor parte de linfocitos T autorreactivos se eliminan, no obstante, si este proceso no está controlado, estos linfocitos se secretarán a la periferia. En personas sanas, la tolerancia periférica mantiene a estas células bajo control. Sin embargo, en las personas con EM esta tolerancia se rompe debido a una disfunción de los linfocitos T reguladores impidiendo su actuación de forma correcta y dando lugar a linfocitos T efectores y agresivos que se activan en presencia de antígenos de mielina (Hemmer et al., 2015). Así, ciertos signos de la enfermedad, como son los brotes, podrían ser explicados por linfocitos T efectores proinflamatorios derivados de una activación aberrante o insuficientemente regulada.



**Figura 2. Inmunidad involucrada en la EM.** Principales componentes del sistema inmune innato (macrófagos, microglía y astrocitos) y adaptativo (linfocitos B y T) y las interacciones que contribuyen la patogénesis de la enfermedad. Figura adaptada de: Grigoriadis & van Pesch, 2015 y creada con BioRender.com. BHE: barrera hematoencefálica; SNC: sistema nervioso central; VLA-4: integrina  $\alpha 4\beta 1$ ; VCAM-1: molécula de adhesión endotelial-1; Linfocito Th1/Th17: Linfocito T helper 1/17; IL-6: Interleukina-6; GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos; TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa; IL-17: interleukina 17; IFN- $\gamma$ : Interferón gamma; NO: Óxido nítrico; O $_2^-$ : Anión superóxido; BOC: bandas oligoclonales.

### 3. Clasificación de las lesiones cerebrales en EM

La formación de lesiones en el cerebro de los pacientes con EM es un proceso dinámico. A medida que la lesión progresa en el tiempo, los macrófagos y la microglía presentes inicialmente, se van eliminando lentamente de las lesiones y, por lo tanto, su presencia, ausencia o densidad numérica dentro de la lesión sirve como indicador del estadio de la lesión (Kuhlmann et al., 2017). De esta manera y a nivel histológico, las lesiones focales pueden englobarse en tres tipos diferentes en función del patrón de desmielinización y la presencia y distribución de la inflamación mediada por macrófagos/microglía (Guerrero & Sicotte, 2020; Heß et al., 2020; Kuhlmann et al., 2017) (Figura 3A):

- **Lesión activa (LA):** son hipercelulares y se caracterizan por presentar una degradación activa de la mielina y una infiltración difusa y densa de células CD68+ (macrófagos periféricos o microglía) en toda la zona de la lesión. Los linfocitos T se localizan perivascularmente y de forma difusa en el área de lesión; sin embargo, el número de células T es mucho menor que el número de macrófagos/microglía.

- **Lesión crónica activa (LCA):** también denominadas lesiones mixtas activas activas/inactivas por encontrarse entre ambas clasificaciones, este tipo de lesiones están desmielinizadas y se distinguen por mostrar un centro de lesión hipocelular y un frente de macrófagos/microglía en el borde de la lesión. Al contrario de lo que sucedía en las lesiones activas, el centro de la lesión está casi completamente desprovisto de macrófagos/microglía. Asimismo, se pueden observar infiltrados moderados de linfocitos T perivascularmente o difusamente distribuidos por todo el centro de la lesión.
- **Lesión crónica inactiva (LCI):** son lesiones completamente desmielinizadas y se caracterizan por tener un límite de lesión escasamente definido. Al igual que las lesiones crónicas activas, son hipocelulares y solo un pequeño número de macrófagos/microglía y linfocitos T están presentes en el centro de la lesión. En este caso, tampoco existe un frente de macrófagos/microglía en el borde de lesión.

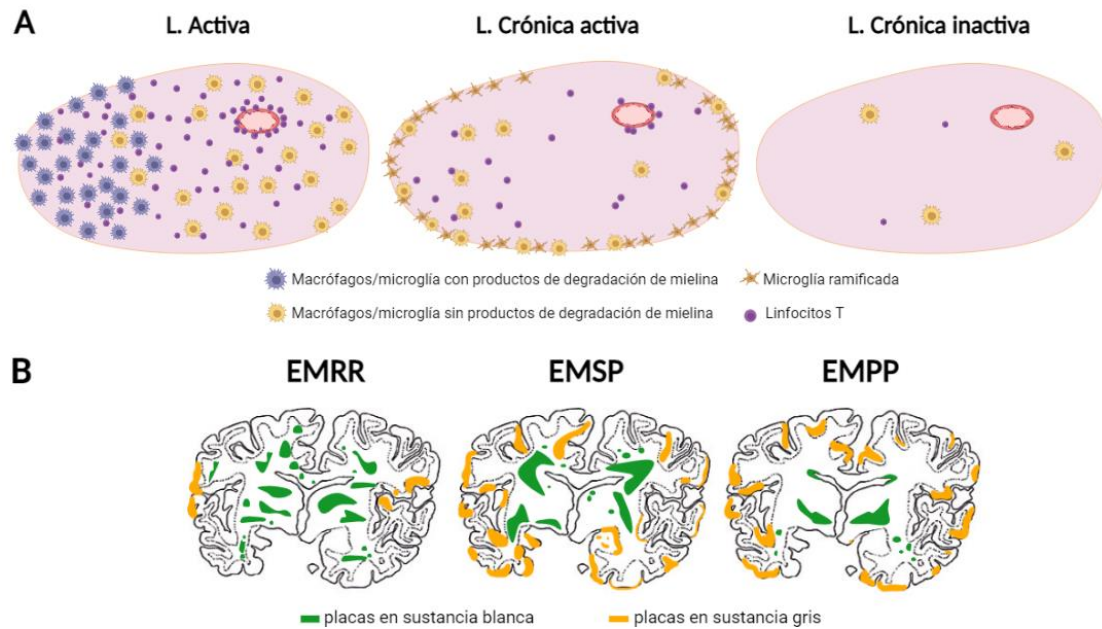
Las lesiones que muestran evidencias de regeneración de la mielina (remielinización) o placas remielinizadas, se distinguen por la presencia de axones poco mielinizados (Popescu et al., 2013). En las placas activas que surgen en las primeras fases de la EM, es frecuente encontrar una extensa remielinización temprana, que parece llevarse a cabo a través de células progenitoras oligodendrocitarias reclutadas al lugar de la desmielinización. Si la remielinización es completa este fenómeno da lugar a las llamadas placas de sombra (del inglés *shadow plaques*), que son zonas claramente delimitadas con una densidad de mielina reducida y vainas de mielina desproporcionadamente finas (Guerrero & Sicotte, 2020; Lassmann et al., 2007).

### 3.1. Tipos de lesiones y formas clínicas de la EM

Las lesiones activas son el fenotipo inicial de las lesiones de EM y, en consecuencia, se suelen encontrar en pacientes con una duración corta de la enfermedad o con una forma remitente-recurrente. No obstante, este tipo de lesiones también pueden detectarse en pacientes con formas secundarias progresivas de la enfermedad. Por otro lado, las lesiones crónicas activas no son comunes en pacientes de EM de escasa duración, pero sí aumentan en pacientes con una duración de la enfermedad superior a 10 años o con un curso progresivo de la enfermedad (Kuhlmann et al., 2017). Además, una mayor proporción de este tipo de lesiones se correlacionan con una mayor severidad de la enfermedad. Con respecto a las lesiones crónicas inactivas, son el tipo de lesiones dominantes en pacientes con una larga duración de la enfermedad (superior a 15 años) o una forma secundaria progresiva sin brotes (Guerrero & Sicotte, 2020; Kuhlmann et al., 2017).

En cuanto a la distribución de las lesiones cerebrales, en la forma de EMRR se observan múltiples lesiones desmielinizantes inflamatorias en SB, que en ciertos lugares confluyen formando placas desmielinizantes. En pacientes con EMRR, también se pueden empezar a observar pequeñas lesiones en la corteza cerebral. En la fase progresiva de la EM, el cuadro patológico es diferente y una proporción sustancial de las placas preexistentes muestran indicios de una expansión de las lesiones a sus márgenes. La forma de EMSP se caracteriza por múltiples placas grandes de

SB, mientras que la forma EMPP se distingue por múltiples lesiones focales pequeñas en la SB. Ambas formas muestran una desmielinización cortical extensa (Lassmann et al., 2007) (Figura 3B).



**Figura 3. Clasificación de lesiones cerebrales y su distribución según las formas clínicas de EM.** Las lesiones activas contienen un gran número de macrófagos/microglía en el centro de la lesión con productos de degradación de la mielina, además de la presencia de linfocitos T perivasculares y difusamente distribuidos por toda la lesión; las lesiones crónicas activas son hipocelulares en el centro de lesión y se caracterizan por un frente de macrófagos/microglía ramificada en el borde de la lesión; las lesiones crónicas inactivas son completamente hipocelulares y no presentan ningún borde de lesión (A). La forma RR de la enfermedad presenta mayoritariamente múltiples lesiones desmielinizantes focales en SB, mientras que en las formas progresivas de la EM (EMSP y EMPP) además de la afectación en la SB, existe una extensa desmielinización cortical (B). Figura creada con BioRender.com. EM: Esclerosis múltiple; L.: Lesión; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva.

#### 4. Lesiones corticales

Dado que las lesiones focales desmielinizantes en SB son un sello distintivo de la patología de la EM, históricamente ha sido considerada una enfermedad típica de SB (Calabrese et al., 2015). Sin embargo y como se ha mencionado, las lesiones en EM también están presentes en la sustancia gris (SG) y corteza cerebral. De hecho, la prevalencia de la desmielinización cortical en la EM ha sido confirmada por varios estudios patológicos que muestran que las lesiones corticales son tan numerosas como las de SB, por lo que constituyen una proporción significativa del total de las lesiones cerebrales en EM (Bø et al., 2003; Bradl & Lassmann, 2009; Calabrese et al., 2010).

La contribución de las lesiones en SB a la enfermedad sólo explica parte de los déficits clínicos observados en pacientes con EM. Otras manifestaciones clínicas, como el deterioro cognitivo,



las convulsiones y discapacidad física podrían explicarse más convenientemente por procesos patológicos que afectan a la materia gris, ya que el daño y pérdida de células en esta región puede ser causa de parte de la disfunción neurológica permanente (Calabrese et al., 2015; Popescu & Lucchinetti, 2012).

#### 4.1. Tipos de lesiones corticales

Actualmente, la clasificación de lesiones corticales más aceptada es aquella basada en la localización de las lesiones desmielinizadas en las capas de la materia gris cortical (Bø et al., 2003) (Figura 4):

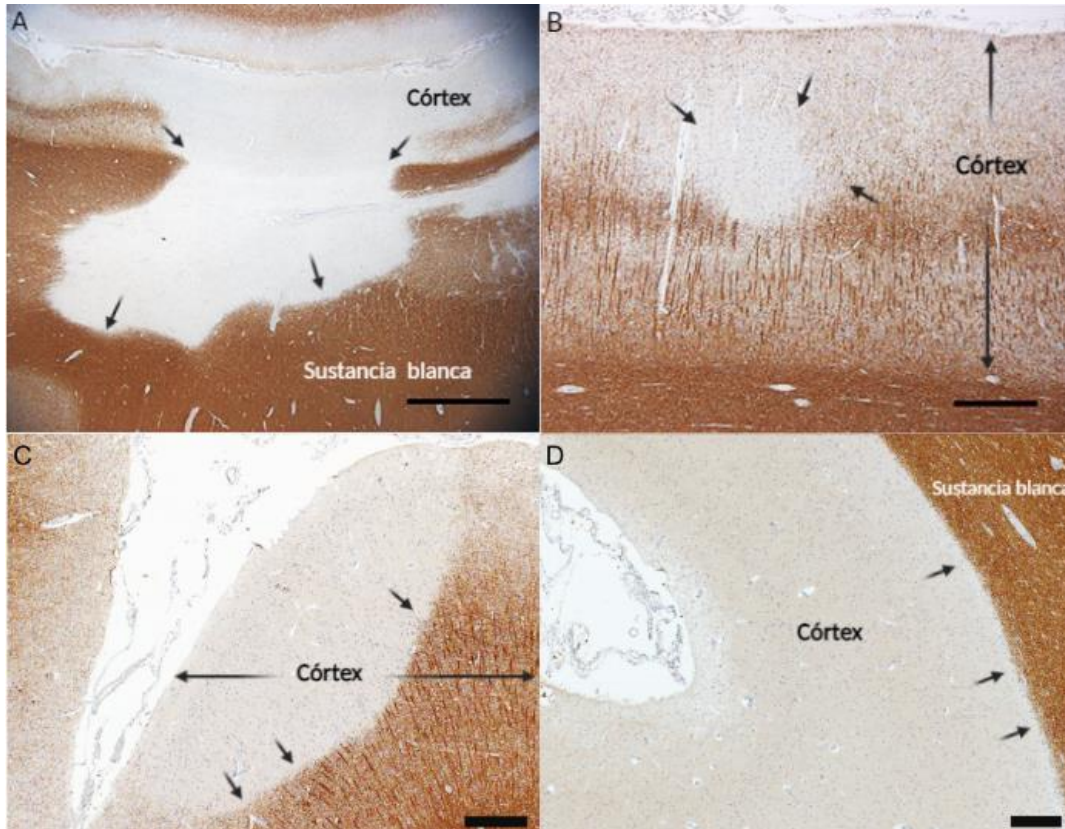
- **Lesiones Tipo I o leucocorticales:** son lesiones que afectan a las capas más profundas de la materia gris, así como la SB subyacente en la unión de ambas sustancias y sin alcanzar la superficie de cerebro (Figura 4A).
- **Lesiones Tipo II o intracorticales:** son lesiones pequeñas desmielinizadas que se localizan íntegramente en la corteza cerebral y normalmente suelen formarse perivascularmente (Figura 4B).
- **Lesiones Tipo III o subpiales:** son lesiones que se extienden desde la superficie pial hacia la corteza y frecuentemente alcanzan las capas 3 y 4 de la corteza (Figura 4C).
- **Lesiones Tipo IV o subpiales completas:** son lesiones que se extienden por todo el ancho de la corteza sin introducirse en la SB subcortical (Figura 4D).

Las lesiones subpiales son el tipo de lesión cortical más común y son las más específicas de la patología de la EM, ya que no se han observado en ninguna otra enfermedad inflamatoria o neurodegenerativa humana (Calabrese et al., 2015; Kooi et al., 2012). Además, las lesiones subpiales a menudo pueden involucrar determinadas circunvoluciones contiguas que engloban a las regiones del cerebro dedicadas al procesamiento de la atención y la memoria (Lucchinetti et al., 2011).

Durante los últimos años, diversos estudios de RMN han demostrado que el daño y la atrofia de la materia gris se producen en fases tempranas de la EM y evolucionan más rápidamente que las lesiones en SB (Calabrese et al., 2010). De esta manera, la desmielinización cortical ya está presente y es común en pacientes con EM temprana, pero se vuelve más evidente en las fases progresivas de la enfermedad (EMSP y EMPP) y en pacientes con EM con déficits cognitivos. Este hecho sugiere que la desmielinización cortical puede ser el sustrato patológico de la progresión y, por consiguiente, de la discapacidad irreversible. Dada esta justificación clínica y gracias a los avances conseguidos en las técnicas de imagen e histopatología para detectar las lesiones corticales, la última década ha sido testigo de un aumento del interés en el estudio de la desmielinización cortical en EM (Popescu & Lucchinetti, 2012).

Los mecanismos subyacentes a la formación de lesiones corticales en EM, así como la contribución de la desmielinización cortical a la patogénesis de la enfermedad son todavía

parcialmente desconocidos. En el caso de la EM, la complejidad de los mecanismos implicados en el desarrollo de la patología sugiere que una complicada red de expresión génica puede estar involucrada en la enfermedad. Por consiguiente, es altamente probable que ciertos cambios en los perfiles de expresión génica de determinados grupos genes puedan aportar información valiosa sobre las alteraciones específicas que ocurren en la enfermedad (Chiricosta et al., 2023).



**Figura 4. Tipos de lesiones corticales en EM.** Lesión de tipo I o lesión leucocortical (A). Lesión de tipo II o lesión intracortical (B). Lesión de tipo III o lesión subpial (C). Lesión de tipo IV o lesión subpial completa (D). Las flechas en todas las imágenes muestran la posición de las lesiones y su área de extensión. Escala de 2 mm en A; escala de 250  $\mu\text{m}$  en C; escala de 500  $\mu\text{m}$  en B y D. Las figuras 3A y 3B fueron adaptadas de Kuhlmann et al., 2017 y las figuras 3C y 3D fueron adaptadas de Popescu & Lucchinetti, 2012. EM: Esclerosis múltiple.

## 5. Transcriptómica espacial

Comprender la neuropatofisiología de enfermedades con afectación cerebral requiere el análisis del tejido. Por este motivo y cuando es posible, la comparación de biopsias u autopsias de pacientes que padecieron la enfermedad con el tejido cerebral de pacientes que no murieron por afecciones neurológicas es la mejor forma de observar diferencias (Chiricosta et al., 2023).

Las transcriptómicas de tejido han sido típicamente estudiadas con secuenciación de ácido ribonucleico (ARN-seq) partiendo de biopsias u autopsias homogeneizadas (Ståhl et al., 2016). No obstante, este método de análisis de tejido enmascara la heterogeneidad de los tipos celulares presentes incluso en las regiones cerebrales más pequeñas (Lein et al., 2017).

El desarrollo de la reciente tecnología de secuenciación de ARN en célula única (scRNA-seq) (del inglés, *single-cell ARN-sequencing*) ha supuesto un gran avance, ya que combina el contenido informativo del transcriptoma completo con una resolución a nivel unicelular (Lein et al., 2017). Asimismo, permite abordar la diversidad celular de regiones cerebrales complejas y son métodos aplicables a todas las especies, incluido la humana (Darmanis et al., 2015; La Manno et al., 2016; Lake et al., 2016; Zeisel et al., 2015). Sin embargo, pese al éxito de la secuenciación de ARN en célula única, este método requiere de la liberación de células viables de tejidos enteros, sin inducir estrés, muerte celular y/o agregación celular.

Además, tanto la secuenciación de ARN en sí, como la recientemente desarrollada de célula única no aclaran la localización de los perfiles transcriptómicos alterados ni la distribución espacial de las células. Por ello, y dado que la información espacial se conserva al estudiar el tejido intacto, ha existido un gran interés en llevar a cabo la transcriptómica en tejidos intactos (Ståhl et al., 2016; Williams et al., 2022).

El contexto posicional de la expresión génica es de vital importancia para entender la funcionalidad del tejido y sus cambios patológicos (Ståhl et al., 2016). La transcriptómica espacial es una tecnología que se ha desarrollado con esta finalidad, ya que hace referencia a la cuantificación de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de un gran número de genes en el contexto espacial de tejidos. Además, esta tecnología define la posición e interacciones entre las células dentro del tejido y revela el impacto de la distribución espacial de las células en la patogenia de las enfermedades (Moses & Pachter, 2022; Zhang et al., 2022).

En función de determinados parámetros técnicos, como el número de genes que se pueden sondear y el tamaño de la muestra del tejido que puede analizarse, entre otras consideraciones, se han desarrollado diferentes tecnologías para el estudio de la transcriptómica espacial, que pueden clasificarse en:

- **Enfoques basados en imágenes**

La transcriptómica espacial basada en imágenes utiliza la hibridación *in situ* del ARNm con sondas marcadas y complementarias, que son detectadas por microscopía para cuantificar los transcritos (Williams et al., 2022). Los dos enfoques basados en imágenes que se han descrito son los métodos basados en hibridación *in situ* (HIS) y los métodos basados en secuenciación *in situ* (SIS). En los primeros, se utilizan sondas complementarias y marcadas con fluorescencia que hibridan con la secuencia de ARNm objetivo presente en el tejido (Figura 5A). Posteriormente, los fluoróforos son visualizados al microscopio para establecer las ubicaciones relativas de los transcritos según los colores presentes. Este proceso de hibridación y toma de imágenes se repite múltiples veces hasta generar un código de barras de fluoróforos específico de cada gen (Moses & Pachter, 2022; Williams et al., 2022). Por otro lado, en los métodos basados en secuenciación *in situ*, en lugar de utilizar sondas específicas de genes, se utilizan sondas cortas y marcadas que permiten determinar 1-2 nucleótidos de la secuencia del transcrito previamente amplificado, a través de un proceso denominado secuenciación por ligación (Figura 5B). Cada base o secuencia de dos bases está vinculada a un fluoróforo diferente, por lo que su

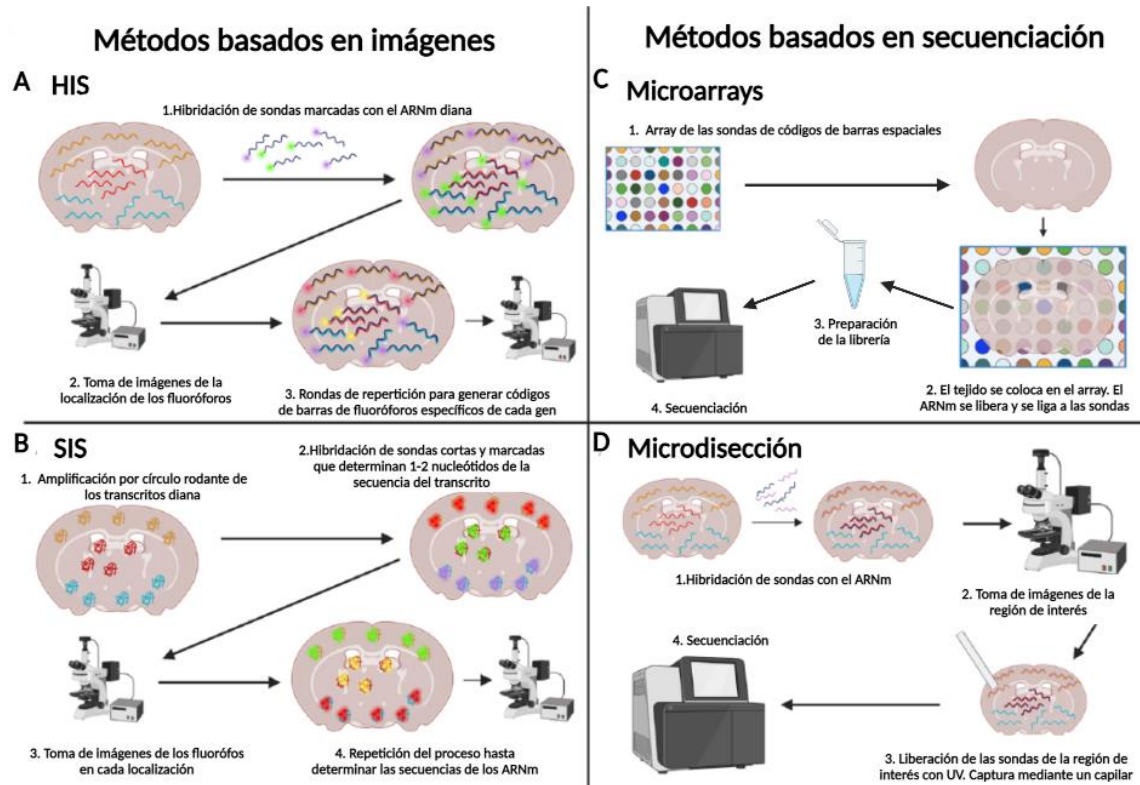
visualización y registro facilita la identificación de la secuencia de cada transcrito. La amplificación suele realizarse mediante la técnica de amplificación en círculo rodante (ARC), proporcionando una amplificación de la señal que preserva la localización espacial (Rao et al., 2021; Williams et al., 2022).

#### - **Enfoques basados en secuenciación de próxima generación**

El desarrollo de estas tecnologías se compone de la captura del ARNm del tejido, la síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) y posteriormente la obtención de secuencias a través de las técnicas de secuenciación de próxima generación. Los dos enfoques más comunes que se fundamentan en el uso de las técnicas de secuenciación de próxima generación son los métodos basados en microdissección y los métodos basados en *microarrays*. En los métodos basados en microdissección, el tejido es hibridado con sondas que se unen al ARNm y posteriormente se visualizan al microscopio para determinar la región de interés y establecer su ubicación (Figura 5D). Esta región se puede microdisseccionar directamente mediante la proyección de luz UV sobre el tejido, de modo que las sondas se liberan a través de la captura con un capilar y se secuencian. Por otra parte, el segundo método basado en secuenciación de próxima generación se desarrolla a través de la captura de ARNm a códigos de barras en un *microarray* (Figura 5C). Este enfoque se basa principalmente en la adición de un código de barras espacial antes de la preparación de la biblioteca de secuenciación. El código de barras de cada lectura se utiliza para mapear la posición espacial de cada transcrito en el tejido, mientras que el resto de la secuencia de lectura se asigna al genoma para identificar el transcrito de origen, generando una matriz de expresión génica. Así, el tejido a analizar se coloca sobre un *array* en el cual el ARNm liberado es captado localmente por sondas codificadas espacialmente, convertido a ADNc y secuenciado (Rao et al., 2021; Williams et al., 2022).

Los métodos basados en imágenes presentan ciertas limitaciones técnicas, ya que requieren el empleo de numerosas horas para su puesta a punto y para la toma de imágenes en el microscopio, generando una gran cantidad de datos. En los métodos de HIS únicamente se introducen tejidos de muy pequeño tamaño ( $\sim 1\text{mm}^2$ ) y aunque pueden determinar casi todos los transcritos diana en una muestra, cuantos más genes se perfilan, más rondas de hibridación se requieren y mayor es el riesgo de cometer errores potenciales. Por otra parte, la ARC de los métodos SIS es ineficaz y los transcritos no amplificados no se contabilizan, lo que indica que la eficiencia de captura es inferior a los métodos basados en secuenciación. Por su parte, los métodos en *microarrays* presentan ciertas ventajas en comparación con los métodos HIS y SIS. Estas técnicas permiten utilizar secciones de tejido de mayor tamaño ( $13\text{ mm}^2$ ) y, además, mediante el uso de la secuenciación de próxima generación en vez del microscopio se eliminan los flujos de trabajo de procesamiento de imágenes. Asimismo, dado que son inespecíficos, es posible perfilar el transcriptoma entero para cualquier organismo que use el ARNm poliadenilado. Los métodos basados en microdissección están limitados a la posible degradación del ARNm cuando se utiliza el láser y a la necesidad de procesamiento de múltiples muestras para la secuenciación (Rao et al., 2021; Williams et al., 2022). Por el contrario, en los métodos

basados en *microarrays* los diferentes dominios del tejido se procesan en la misma reacción, lo que elimina la variabilidad técnica entre muestras (Ståhl et al., 2016). Dado el número de ventajas expuestas de los métodos basados en secuenciación, y en particular, de los métodos basados en *microarrays*, esta técnica será la utilizada para el desarrollo del presente estudio.



**Figura 5. Tecnologías para el estudio de la transcriptómica espacial.** Los métodos basados en imágenes de hibridación *in situ* (HIS) detectan las secuencias diana mediante la hibridación de sondas fluorescentes complementarias que se visualizan en el microscopio (A). Los métodos basados en imágenes de secuenciación *in situ* (SIS) las secuencias se detectan mediante la lectura directa en el microscopio de la sección de tejido utilizando sondas cortas y marcadas (B). En ambos métodos basados por imágenes es necesario realizar varias rondas de repetición del protocolo para determinar el código de barras de fluoróforo que identifique cada gen (HIS) o la secuencia completa del ARNm (SIS). Los basados en *microarrays* localizan espacialmente a los transcritos con códigos de barras que posteriormente son secuenciados (C). Por último, las células o regiones de interés se pueden microdisseccionar directamente y registrar sus ubicaciones antes de que sus transcriptomas se sometan a secuenciación de próxima generación (D). Figura adaptada de Williams et al., 2022. *HIS*: Hibridación *in situ*; *SIS*: Secuenciación *in situ*.

### 5.1. Aplicaciones de la transcriptómica espacial en EM

El uso de la transcriptómica espacial ha permitido elucidar amplios patrones de expresión génica en diferentes aspectos de la neurociencia, como en procesos de diferenciación tisular, mecanismos de enfermedad localizados espacialmente y tipos celulares específicos que desencadenan enfermedades de afectación neurológica (Zhang et al., 2022).

A un nivel más amplio, la transcriptómica espacial puede utilizarse para caracterizar el patrón y regulación transcripcional en tejido. Por ejemplo, en el desarrollo de atlas que permiten conocer

la división espacial del cerebro de mamífero, así como en el estudio de los procesos subyacentes al desarrollo del sistema nervioso central, a través de la definición de los mecanismos que regulan la diferenciación celular (Ortiz et al., 2021). A un nivel más preciso, la transcriptómica puede revelar características locales que contribuyen a las enfermedades (Williams et al., 2022). Por ejemplo, en enfermedades neurodegenerativas, Chen *et al.* emplearon la transcriptómica espacial en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer para el estudio de conjuntos genéticos expresados en la proximidad de las placas amiloides.

Sus resultados revelaron cambios transcripcionales en genes relacionados con el complemento, endocitosis, degradación lisosomal e inflamación en la vecindad de las placas amiloides, sugiriendo nuevos posibles mecanismos de la enfermedad (Chen et al., 2020).

Los métodos basados en *microarrays* también han sido una técnica empleada para el estudio de la EM, normalmente combinada con la secuenciación de ARN en célula única. Particularmente, Kaufmann *et al.* inspeccionaron secciones de tejido de cerebros corticales de pacientes con EMSP y controles con el objetivo de determinar los componentes de la EM progresiva en el contexto de la neurodegeneración, identificar las interacciones ligando-receptor de esos componentes y priorizar los receptores enriquecidos en el SNC como nuevas dianas farmacológicas. Los autores concluyeron que, al inicio de la enfermedad, las áreas donde ocurría un déficit de crecimiento neuronal o neurodegeneración estaban asociadas con un perfil inflamatorio. Además, seleccionaron una lista de principales dianas farmacológicas que poseían un papel patogénico en la EM progresiva, en las que se incluían receptores enriquecidos en el SNC que ya están en fase de desarrollo de fármacos para uso humano (Kaufmann et al., 2022). Por otra parte, Lerma-Martin *et al.* (en proceso de publicación) utilizaron la transcriptómica espacial para el estudio de las lesiones en SB subcorticales procedentes de muestras de EM y las compararon con controles con el fin de crear un mapa de gran área de expresión génica de las distintas fases de la lesión inflamatoria en la EM.

La información aportada por el conjunto de datos de transcriptómica espacial, complementada con las de secuenciación de ARN de núcleo único (se aíslan núcleos en lugar de células enteras) permitió a los autores, mediante la identificación de tipos celulares específicos promotores de la patología, esclarecer el complejo ambiente tisular subyacente a la progresión de las lesiones de EM en el tiempo, así como la localización de estos tipos celulares en el tejido cerebral (Lerma-Martin et al., 2022).

Se ha expuesto la relevancia de la afectación cortical en pacientes con EM en la progresión de la enfermedad, y su relación con los deterioros cognitivos y discapacidad. No obstante, hasta la fecha, no se ha encontrado ningún estudio que investigue el perfil transcriptómico de lesiones corticales de pacientes con EM y que considere todos los fenotipos clínicos de la enfermedad. Por lo tanto, este trabajo se centra en el estudio histológico y transcriptómico de las lesiones corticales de pacientes con EM mediante el uso de la transcriptómica espacial basada en *microarrays*.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En enfermedades como la EM, el estudio del tejido es substancial para elucidar el complejo ambiente celular que se encuentra detrás de las lesiones desmielinizantes. La hipótesis de este trabajo es que las diferencias observadas en las lesiones corticales de pacientes con EM a nivel histológico se observaron también a nivel transcriptómico y nos puede proporcionar información acerca de la compleja red de expresión génica involucrada en la enfermedad.

Se pretende confirmar la hipótesis planteada a través de los siguientes objetivos:

1. Localización y caracterización de las lesiones de corteza en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EM.
2. Estudio de la transcriptómica espacial en lesiones de corteza de pacientes con EM.
  - a. Puesta a punto del protocolo de optimización de tejido y expresión génica (Visium).
  - b. Análisis de la expresión génica espacial.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Muestras de tejido humano *post mortem*

Se examinaron 8 bloques de tejido fresco congelado obtenidos de 3 pacientes con EM (EMRR: n = 2; EMPP: n = 2; EMSP: n = 2) y 2 controles (n = 2). Todos los tejidos utilizados en este trabajo fueron proporcionados por el Banco de Tejidos de la Sociedad Británica de Esclerosis Múltiple. Todos los procedimientos utilizados por el banco de tejidos en la obtención, almacenamiento y distribución de tejidos, así como el proyecto en el que se enmarca este estudio fueron aprobados por el Comité Ético Multicéntrico de Investigación (18/WA/0238) y el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIM) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (2022-151-1). Las características de todos los donantes de tejido se resumen en la Tabla 1. El número de integridad de ARN se utilizó como criterio de selección de muestras, y sólo las muestras con un valor  $\geq 7$  se incluyeron en la cohorte de estudio.

**Tabla 1.** Información clínica y patológica de los donantes de las muestras de tejido cerebral.

Caso	Edad	Sexo	Diagnóstico	RIN	Tipo de lesión	Duración de la EM	Causa de muerte
C048	68	M	-	7.50	-	-	Cáncer de colon metastásico
C064	63	F	-	7.70	-	-	Desconocido
MS403 (A3A2/A3A5)	54	F	EMSP	8.80	LA/CN	26 años	Fase terminal EM
MS341 (A2B5/A4B4)	52	F	EMRR	7.20	LCI/LCI	22 años	Neumonía, EM
MS517 (A1A2/A3C4)	48	F	EMPP	7.90	LCI/LCI	25 años	Sepsis

\*EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; LA: lesión activa; CN: córtex normal; LCI: lesión crónica inactiva.

#### 2. Inmunohistoquímica

Los bloques de tejido fresco congelado se incluyeron en el compuesto OCT (del inglés *optimal tissue compound*) (4583, Osaka, Japón) y se cortaron en secciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un criostato Leica CM1905 (Leica biosystems, Wetzlar, Alemania), se colocaron en portaobjetos de adhesión Epredia™ Superfrost Plus (Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y se almacenaron a -20 °C. La evaluación histopatológica se realizó mediante la tinción de las secciones de tejido con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímicas para CD68 como marcador de macrófagos/microglía y la proteína proteolípida (PLP) como marcador de mielina. Se analizó la presencia de linfocitos T y/o B mediante inmunohistoquímicas para CD3 y CD20, respectivamente.

Para la inmunohistoquímica de CD68, PLP, CD3 y CD20 se utilizaron los anticuerpos indicados en la Tabla 2, y para su desarrollo se siguieron los pasos de fijación, desenmascaramiento 1h en



EDTA a pH 9, bloqueo 1h en NGS 10% e incubación con el anticuerpo primario *overnight* a 4°C. Al día siguiente, se prosiguió con la incubación con el anticuerpo secundario durante 1h, incubación con estreptavidina 1 h, revelado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (SK-4105, Vector Laboratories, California, EEUU), deshidratación en alcoholes de concentración creciente y montaje permanente con EUKITT (15320, Electron Microscopy Sciences, Pennsylvania, EEUU). En el Anexo 1 se detallan los protocolos de la hematoxilina-eosina y de las inmunohistoquímicas.

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

#	Antígeno	Dilución	Animal	Tipo de anticuerpo	Diana	Fuente	Referencia
1	PLP	1:500	Ratón	Monoclonal	Mielina	Biorad	MCA839G
2	CD68	1:100	Ratón	Monoclonal	Microglía y macrófagos	Agilent	M087601-2
3	CD20	1:250	Ratón	Monoclonal	Linfocitos B	Invitrogen	MA5-13141
4	CD3	1:100	Conejo	Monoclonal	Linfocitos T	Dako	A0452
5	IgG de ratón	1:400	Cabra	Secundario biotinilado	IgG de ratón	Vector	BA9200
6	IgG de conejo	1:200	Cabra	Secundario biotinilado	IgG de conejo	Vector	BA1000

\*PLP: *proteína proteolipídica*; IgG: *inmunoglobulina G*; PG-M1: *fosfoglucomutasa-1*.

Las imágenes a campo claro de las tinciones con hematoxilina-eosina y las inmunohistoquímicas para PLP, CD68 y CD3 se obtuvieron mediante el uso del microscopio Nikon Eclipse Ci (Nikon, Minato, Tokio, Japón) y la cámara Nikon DS-Ri2 (Nikon). Las imágenes se tomaron con aumentos de 4x, 10x y 40x y se exportaron como archivos TIFF. El procesamiento de imágenes de los datos histológicos se realizó empleando el software ImageJ (v1.54d 30) (Schneider et al., 2012).

### 3. Evaluación histopatológica y caracterización del tipo de lesión

En este estudio únicamente se seleccionaron lesiones en sustancia gris. Las lesiones se localizaron sobre las tinciones de mielina con el anticuerpo PLP, identificándolas como áreas con una acentuada pérdida de mielina. Además, las lesiones se clasificaron en lesiones de tipo activo, crónico activo y crónico inactivo mediante el marcaje de macrófagos/microglía con anti-CD68 según los protocolos y criterios establecidos previamente (Kuhlmann et al., 2017). Asimismo, se realizaron inmunohistoquímicas anti-CD3 y anti-CD20 para la detección de linfocitos T y linfocitos B, respectivamente, con el objetivo de caracterizar de forma más extensa los tipos celulares presentes en las lesiones corticales e identificar la presencia de folículos meníngeos. Del mismo modo, se clasificaron las lesiones corticales en función de su localización en las capas de material gris cortical; lesiones de tipo I, II, III o IV según los criterios establecidos anteriormente (Bø et al., 2003). No se estableció ninguna distinción entre lesiones de EM desmielinizantes activas tempranas o tardías.

## 4. Flujo de trabajo de transcriptómica espacial: Optimización del tejido

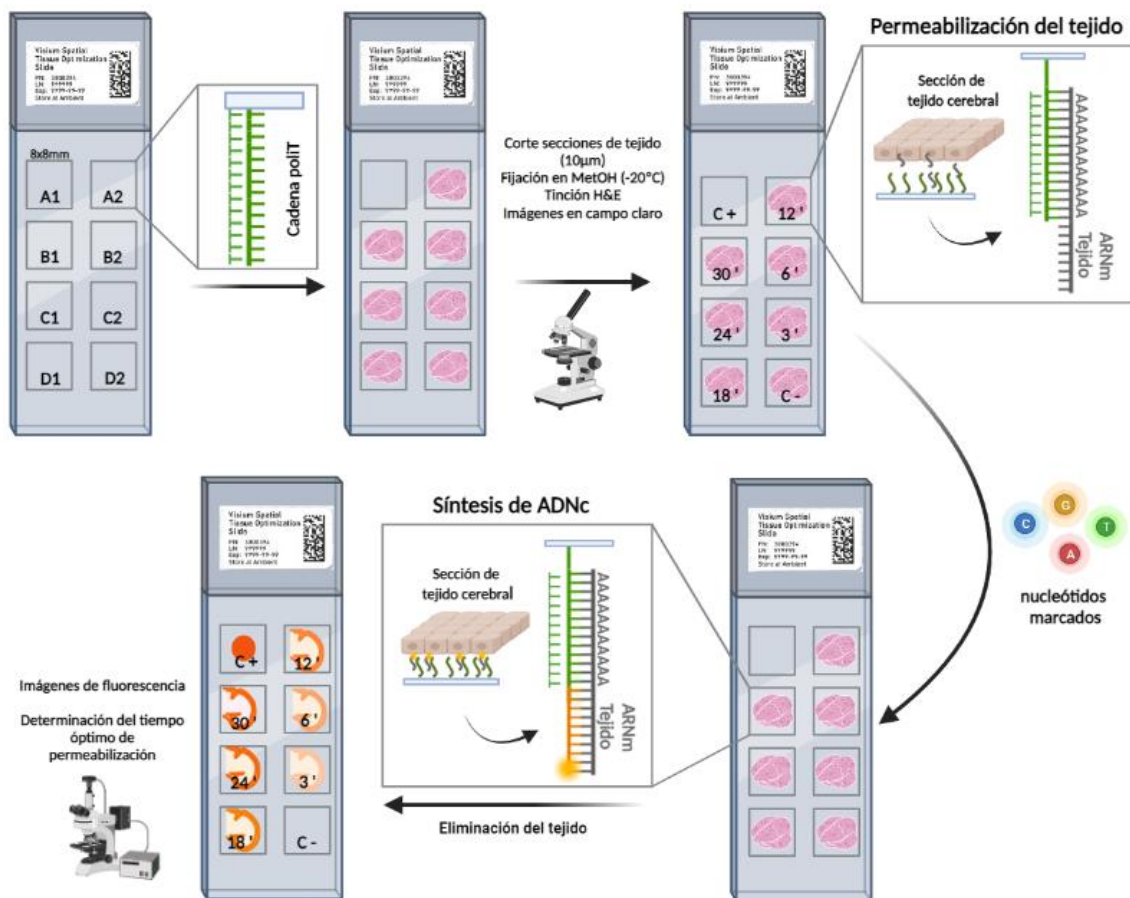
### 4.1. Permeabilización y síntesis de ADNc

Para el desarrollo de este protocolo únicamente se consideró el bloque de tejido del control C048. El bloque de tejido fresco congelado se incluyó en OCT, se cortó en secciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un criostato Leica CM1905 a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y los cortes se colocaron sobre el portaobjetos específico para la optimización de tejidos espacial Visium (3000394, 10x Genomics, California, USA). Cada portaobjetos está formado por ocho áreas de captura de 8x8 mm rodeadas por un marco grabado (Figura 6). Cada una de estas áreas de captura está cubierta por oligonucleótidos para la captura del ARNm, formada por secuencias poly(T) que permiten la producción de ADNc a partir de ARNm poliadenilado. Siete de esas ocho áreas de capturas se utilizaron para tejidos y una se utilizó para un control positivo de ARN. Una vez cortados y adheridos al portaobjetos, los cortes de tejido se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los cortes se fijaron y tiñeron con hematoxilina-eosina siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo 1. A continuación, se tomaron imágenes en campo claro del portaobjetos completo utilizando un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Alemania) a 10x y con una exposición de 14 ms. Tras la captura de las imágenes, se procedió a la permeabilización del tejido a diferentes tiempos (30', 24', 18', 12', 6' y 3') añadiendo 70  $\mu\text{L}$  de enzima de permeabilización (2000214, 10x Genomics), previamente resuspendida en 1,2 mL de ácido clorhídrico (HCl) (0,1 N) (SA54-1, Fisher Chemical) y atemperada  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. No se añadió enzima de permeabilización ni en el pocillo del control positivo (ARN universal de referencia de ratón (QS0640, Thermo Fisher Scientific)) (A1) ni en el del control negativo (D2). Una vez se completó el curso de permeabilización, se descartaron los reactivos de todos los pocillos excepto del control positivo (A1) y se añadieron 100 $\mu\text{L}$  de 0,1X de solución de citrato de sodio (SSC) (S66391L, Millipore Sigma, San Luis, USA) a todos los pocillos excepto al pocillo A1. Se prosiguió con la preparación de la *Master Mix* fluorescente para la retrotranscripción (RT) en la que se añadieron 221,8  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (AM9937, Thermo Fisher Scientific), 110  $\mu\text{L}$  de reactivo de RT C (2000215, 10X Genomics), 30,8  $\mu\text{L}$  de *Template Switch Oligo* (3000228, 10x Genomics), 8,8  $\mu\text{L}$  del Agente Reductor B (2000087, 10x Genomics) y 68,6  $\mu\text{L}$  de la Enzima de RT D (2000216, 10x Genomics) en el orden mencionado. Una vez preparado, se eliminaron los 100  $\mu\text{L}$  de 0,1XSSC de cada pocillo y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de la *Master Mix* fluorescente para la RT en cada pocillo. Se selló el casete, se colocó en el adaptador del termociclador pre-equilibrado a  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a continuación se inició el protocolo de síntesis de ADNc:  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos,  $4^{\circ}\text{C hold}$  (tapa a  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 4.1. Retirada del tejido

Seguidamente, se preparó la mezcla para la eliminación del tejido, compuesta por 539  $\mu\text{L}$  del *buffer* de eliminación de tejido y 77  $\mu\text{L}$  de la enzima de eliminación del tejido en el orden mencionado y a temperatura ambiente. Una vez terminado el protocolo de síntesis de ADNc, se

descartó la *Master Mix* fluorescente para la RT de todos los pocillos y se realizó un lavado con 100  $\mu$ L de 0,1X SSC.



**Figura 6. Protocolo de optimización del tejido de Visium.** Los portaobjetos específicos para la optimización de tejido espacial Visium presentaron 8 áreas de captura de 8x8mm con secuencias poly(T) para la captura del ARNm. Una vez cortado el tejido en secciones de 10  $\mu$ m, se adherieron al portaobjetos y se procedió con la fijación y tinción con hematoxilina-eosina de estas secciones. Se tomaron imágenes a campo claro del portaobjetos completo y se continuó con la permeabilización a los tiempos indicados, lo que produjo la liberación del ARNm del tejido. Después, se incubó el portaobjetos con nucleótidos fluorescentes produciéndose la síntesis de ADNc. Por último, el tejido se eliminó enzimáticamente, dejando ADNc marcado con fluorescencia que puede visualizarse mediante microscopía de fluorescencia para seleccionar el tiempo óptimo de permeabilización. Figura creada con BioRender.com. *MetOH*: metanol; *H&E*: hematoxilina-eosina; *ARNm*: ARN mensajero; *ADNc*: ADN complementario.

Después, se añadieron 70  $\mu$ L de la mezcla de eliminación del tejido, se selló el casete, se colocó en el adaptador del termociclador atemperado a 56  $^{\circ}$ C y se inició el protocolo de eliminación de tejido: 56  $^{\circ}$ C durante 60 minutos, *hold* a 22  $^{\circ}$ C hasta 24 minutos y la tapa a 56 $^{\circ}$ C. Una vez completado el protocolo, se realizaron una serie de lavados: 0,2X SSC-0.1% dodecilsulfato de sodio (SDS) (71736, Millipore Sigma) precalentado a 50 $^{\circ}$ C durante al menos media hora, 0,2X SSC y, en tercer lugar, 0,1X SSC. En último lugar, se centrifugó el portaobjetos en una centrífuga de cubeta oscilante a 250 rcf durante 30 segundos y se procedió a la toma de imágenes de

fluorescencia de portaobjetos completo utilizando en el microscopio Zeiss Axiovert 200M y la siguiente configuración: filtro de Rhodamina, 440 ms de exposición y 100% de potencia de led.

El flujo de trabajo de optimización del tejido de Visium permitió identificar el tiempo óptimo de permeabilización del tejido para su uso en el flujo de trabajo de la expresión génica espacial de Visium. La visualización de las imágenes de las secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina permitió establecer la ubicación correcta de las secciones en las áreas de captura y facilitar su posterior comparación con las imágenes de fluorescencia. Para la elección del tiempo óptimo de permeabilización se compararon las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia de las secciones incubadas a diferentes tiempos de permeabilización. El tiempo de permeabilización que produce la máxima señal de fluorescencia con la menor difusión es el que se considera óptimo, y si la señal es la misma en dos puntos temporales, se elige el tiempo de permeabilización más largo.

## **5. Flujo de trabajo de transcriptómica espacial: Expresión génica**

### **5.1. Permeabilización y transcripción reversa**

Los ocho bloques de tejido cerebral con la región de interés de pacientes y controles fueron cortados en secciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un criostato Leica CM1905 a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se adhirieron a dos portaobjetos específicos para la expresión génica espacial Visium (4 rxns, 10x Genomics) en la ubicación que se muestra en la Figura 7. Cada portaobjetos (chip) estaba formado por 4 áreas de captura de tamaño  $6,5 \times 6,5\text{ mm}^2$  definidos por un marco grabado. Cada área de captura presentaba alrededor de 5000 puntos de expresión génica, y cada punto incluía: alrededor de millones sondas compuestas por un *primer* de secuenciación de lectura parcial 1, un código de barras espacial de 16 nucleótidos (todas las secuencias en un punto específico comparten el mismo código de barras espacial), un identificador molecular único de 12 nucleótidos y una secuencia poly(dT) de 30 nucleótidos. Tras la adherencia de las secciones de tejido a ambos portaobjetos se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Siguiendo el protocolo previamente mencionado, se continuó con la fijación, tinción con hematoxilina y eosina y toma de imágenes de cada área de captura y a campo claro en el microscopio invertido Leica DMI8 M. Posteriormente, se procedió con la permeabilización del tejido, se introdujeron ambos portaobjetos en casetes específicos y se añadieron 70  $\mu\text{L}$  de enzima de permeabilización, previamente resuspendida en 1,2 mL de HCl (0.1 N) y equilibrada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos a todas las áreas de captura. Se cerró el casete, se selló con un precinto y se colocó en el adaptador del termociclador pre-equilibrado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se inició el protocolo de permeabilización a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 minutos con la tapa del termociclador programada a la misma temperatura. Se prosiguió con la preparación de la *Master Mix* para la retrotranscripción (RT) en la que se añadieron: 333  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 165  $\mu\text{L}$  de reactivo de RT (2000086, 10X Genomics), 45,94  $\mu\text{L}$  de *Template Switch Oligo*, 13,20  $\mu\text{L}$  del Agente Reductor B y 102,87  $\mu\text{L}$  de la Enzima de RT D (2000216, 10x Genomics) en el orden mencionado. Una vez se completó el curso de permeabilización, se descartaron los reactivos de todos los pocillos y se

lavaron añadieron 100µL de 0,1X de solución de citrato de sodio (SSC) a todos los pocillos. Se añadieron 75 µL de la *Master Mix* para la RT en cada pocillo. Se selló el casete, se colocó en el adaptador del termociclador pre-equilibrado a 53 °C y posteriormente se inició el protocolo de retrotranscripción: 53 °C durante 45 minutos, 4°C *hold* (tapa a 53 °C).

## 5.2. Síntesis de la segunda hebra y desnaturalización

Una vez terminado el protocolo de retrotranscripción, se eliminó la *Master Mix* para la RT de todos los pocillos y se añadieron 75 µL de KOH 0,08M diluido del stock en agua libre de nucleasas. Los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el volumen de KOH de todos los pocillos para después hacer un lavado con 100 µL de *buffer* de elución (19086, Qiagen, Hilden, Germany). Se preparó la mezcla para la síntesis de la segunda hebra en hielo: 611,6 µL del reactivo de segunda hebra (2000219, 10x Genomics), 35,2 µL del *primer* de segunda hebra (2000217, 10x Genomics) y 13,2 µL de la enzima de segunda hebra (2000217, 10x Genomics). A continuación, se añadieron 75 µL de la mezcla de segunda hebra a cada pocillo. Se selló el casete, se colocó en el adaptador del termociclador pre-equilibrado a 65 °C y posteriormente se inició el protocolo de la síntesis de la segunda hebra: 65°C durante 15 minutos, 4°C *hold* (tapa a 65 °C). Al final de la incubación, se eliminaron los reactivos de los pocillos y se realizó un lavado con 100 µL de *buffer* de elución. Después, se añadieron 35 µL de KOH 0,08M y se incubaron durante 10 minutos. En una tira de tubos MicroAmp de 0,2 mL (N8010580, Thermo Fisher Scientific) se introdujeron 5 µL de Tris 1M, pH 7.0, libre de ARNsas (AM9850G, Thermo Fisher Scientific). Se transfirieron 35 µL de cada pocillo a cada tubo de la tira de 8 tubos. Se realizó un vortex a la tira de tubos y una breve centrifuga y se mantuvo en hielo.

## 5.3. Amplificación de ADNc y control de calidad

La determinación del número de ciclos necesarios para programar la **amplificación de ADNc** se llevó a cabo utilizando una PCR cuantitativa (qPCR) (Ver detalle en el Anexo 2; Tabla 5). Para ello, se preparó en primer lugar la mezcla de qPCR: 34,82 µL de agua libre de nucleasas, 49,5 µL de *KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix*, 3 µL de *primers* de ADNc y 1,78 µL de ROX. A continuación, se añadieron 9 µL de la mezcla de qPCR a cada pocillo de la placa MicroAmp™ de 96 pocillos (N80105560, Applied Biosystems, Massachusetts, USA) hasta un total de 18 pocillos (duplicados de las 8 muestras y 1 duplicado del control negativo). Se transfirió 1 µL de muestra presente en la tira de 8 tubos a los pocillos de placa por duplicado (A1-A8 y B1-B8) y 1 µL de agua libre de nucleasas para los pocillos del control negativo (A9 y B9), se mezcló con el resto de los reactivos y se centrifugó la placa. Se selló la placa y se introdujo en el sistema de qPCR ViiA 7 (Thermo Fisher Scientific) con las siguientes propiedades de experimentación: C<sub>T</sub> Comparativo ( $\Delta\Delta C_T$ ) y modo rápido y el siguiente protocolo: 98°C durante 3 minutos, seguidos de 25 ciclos de 98°C durante 5 segundos y 63°C durante 30 segundos. La temperatura de la tapa se programó para un volumen de 10 µL y una temperatura de 105°C. Al finalizar la incubación se anotaron los valores de C<sub>q</sub> obtenidos para un valor umbral del 25% y se procedió a la preparación de la mezcla de amplificación de ADNc con 440 µL de mezcla de amplificación y 132 µL de *primers* de ADNc.

Se añadieron 65  $\mu\text{L}$  de la mezcla de amplificación de ADNc a los 35  $\mu\text{L}$  de muestra restantes, se mezclaron y centrifugaron y se incubaron en el termociclador con el siguiente protocolo: 98°C durante 3 minutos, seguido del número de ciclos determinados para cada muestra (Ver detalle en el Anexo 2; Tabla 5) a 98°C durante 15 segundos, 63°C durante 20 segundos, 72°C durante 1 minuto y por último 72°C durante 1 minuto y 4°C *hold* (tapa a 105°C).

Una vez terminada la incubación, se continuó con una **limpieza de los fragmentos** presentes en el ADNc. Se resuspendió el reactivo SPRIselect (B23318, Beckman Coulter, Brea, California, EEUU) y se añadieron 60  $\mu\text{L}$  del mismo a 100  $\mu\text{L}$  de muestra. El reactivo se homogeneizó con la muestra y se incubaron durante 5 minutos. Al terminar la incubación, la tira de tubos se colocó en un adaptador magnético en posición *high* hasta que la solución clareó y se observó un pellet de color marrón en el lado del imán. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 80% preparado en fresco, se incubó 30 segundos y se eliminó el etanol de la tira de tubos. Se repitió este proceso hasta un total de 2 lavados. Posteriormente, se centrifugó la tira de tubos y se volvió a ubicar en el adaptador magnético en posición *high* para la eliminación de los restos de etanol. Se dejó secar al aire durante un máximo de 2 minutos y ya fuera del adaptador magnético, se añadieron 40,5  $\mu\text{L}$  de *buffer* de elución (19086, Qiagen), se mezcló con la muestra y se incubó durante 2 minutos. La tira de tubos se colocó de nuevo en el adaptador magnético en posición *high* hasta que la solución clareó y se transfirieron 40  $\mu\text{L}$  de muestra a una nueva tira de tubos MicroAmp 0,2 mL. Se guardó a -20°C hasta que se procedió con el siguiente paso.

Para llevar a cabo un **control de calidad de ADNc** y cuantificarlo, 1  $\mu\text{L}$  de la muestra fue procesada en el Bioanalizador Agilent de alta sensibilidad (Ver detalle en el Anexo 2; Tabla 5).

#### 5.4. Construcción de la librería para la expresión génica espacial

El primer paso para la construcción de la librería se basó en la preparación de la mezcla de fragmentación: 44  $\mu\text{L}$  del *buffer* de fragmentación y 88  $\mu\text{L}$  de la enzima de fragmentación. A continuación, del volumen total de muestra, únicamente se transfirieron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADNc purificada del paso anterior a una nueva tira de tubos MicroAmp de 0,2 mL, ya que con el 25% del total de ADNc es suficiente para generar una librería de expresión génica espacial. En esta nueva tira de tubos, además se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de *buffer* de elución y 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla de fragmentación a cada muestra. La tira de tubos se colocó en el adaptador del termociclador pre-equilibrado a 4 °C y se inició el protocolo de fragmentación, reparación de los fragmentos finales y *A-tailing*: 32°C durante 5 minutos, 65°C durante 30 minutos y 4°C *hold* (tapa 105°C). Para continuar con la selección de fragmentos de tamaño deseado, se resuspendió el reactivo SPRIselect y se añadieron 30  $\mu\text{L}$  del mismo a 100  $\mu\text{L}$  de muestra. El reactivo se homogeneizó con la muestra y se incubaron durante 5 minutos. Al terminar la incubación, la tira de tubos se colocó en un adaptador magnético en posición *high* hasta que la solución clareó y se observó un pellet de color marrón en el lado del imán. Se retiraron 75  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a otra tira de tubos MicroAmp de 0,2 mL y en esta tira se añadieron 10  $\mu\text{L}$  del reactivo SPRIselect previamente resuspendido. Se volvieron a homogeneizar y se incubaron durante 5 minutos. La tira de tubos se colocó en un adaptador magnético en posición *high* hasta que la solución clareó y se observó

un pellet de color marrón en el lado del imán. Se descartaron 80  $\mu$ L de sobrenadante sin eliminar el pellet y se añadieron 125  $\mu$ L de etanol al 80% preparado en fresco, se incubó 30 segundos y se eliminó el etanol de la tira de tubos. Se repitió este proceso hasta un total de 2 lavados. Posteriormente, se centrifugó la tira de tubos y se volvió a ubicar en el adaptador magnético en posición *high* para la eliminación de los restos de etanol. Se dejó secar al aire durante un máximo de 2 minutos y ya fuera del adaptador magnético, se añadieron 50,5  $\mu$ L de buffer de elución (19086, Qiagen), se mezcló con la muestra y se incubó durante 2 minutos. La tira de tubos se colocó de nuevo en el adaptador magnético en posición *high* hasta que la solución clareó y se transfirieron 50  $\mu$ L de muestra a una nueva de tubos MicroAmp 0,2 mL.

En el siguiente paso se realizó la **adaptación de ligadores**. En primer lugar, se preparó la mezcla de ligación de adaptadores: 176  $\mu$ L de *buffer* de ligación, 88  $\mu$ L de la ligasa de ADN y 176  $\mu$ L de oligos adaptadores. Después, se añadieron 50  $\mu$ L de esta mezcla a los 50  $\mu$ L de la muestra, se mezclaron y centrifugaron. Se trasladó la tira de tubos al adaptador del termociclador y se inició el protocolo de ligación de adaptadores: 20°C durante 15 minutos y 4°C *hold* con la tapa abierta.

Seguidamente, se procedió a la **limpieza de fragmentos post-ligación** que se realizó de la misma manera que en el paso 5.3 pero añadiendo 80  $\mu$ L del reactivo SPRIselect a los 100  $\mu$ L de muestra y en los últimos pasos añadiendo 30,5  $\mu$ L de *buffer* de elución (19086, Qiagen) y transfiriendo 30  $\mu$ L de muestra a una nueva de tubos MicroAmp de 0.2 mL.

El siguiente paso se basó en la **introducción de los índices i5 e i7** necesarios para la posterior secuenciación. Para ello, se empleó una placa índice doble TT Set A (3000431, 10x Genomics) de 96 pocillos en el que en cada uno de ellos contine una mezcla de índices i5 e i7 únicos (Ver detalle en el Anexo 2). Se añadieron 50  $\mu$ L de la mezcla *Amp* a cada tubo con 30  $\mu$ L de muestra y después, de la placa mencionada se seleccionaron 8 pocillos (B1-B8) del que se extrajeron 20  $\mu$ L de cada pocillo al tubo con la mezcla del *Amp* y la muestra. Se homogeneizaron todos los reactivos con la muestra, se centrifugaron y se trasladaron al adaptador del termociclador y se inició el protocolo de PCR de indexación de muestras: 98°C durante 45 segundos, seguido del número de ciclos determinado para cada muestra (Ver detalle en el Anexo 2; Tabla 5) a 98°C durante 20 segundos, 67°C durante 30 segundos, 72°C durante 20 segundos y por último 72°C durante 1 minuto y 4°C *hold* (tapa a 105 °C).

Los últimos pasos hacen referencia a procesos de **selección de fragmentos** de tamaño deseado. Se resuspendió el reactivo SPRIselect y se añadieron 60  $\mu$ L del mismo a 100  $\mu$ L de muestra. El reactivo se homogeneizó con la muestra y se incubaron durante 5 minutos. Al terminar la incubación, la tira de tubos se colocó en un adaptador magnético en posición *high* hasta que la solución clareó y se observó un pellet de color marrón en el lado del imán. Se retiraron 150  $\mu$ L del sobrenadante a otra tira de tubos MicroAmp de 0,2 mL y en esta tira se añadieron 20  $\mu$ L del reactivo SPRIselect previamente resuspendido. Se volvieron a homogeneizar y se incubaron durante 5 minutos. La tira de tubos se colocó en un adaptador magnético en posición *high* hasta

que la solución clareó y se observó un pellet de color marrón en el lado del imán. Se descartaron 165  $\mu\text{L}$  de sobrenadante sin eliminar el pellet y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 80% preparado en fresco, se incubó 30 segundos y se eliminó el etanol de la tira de tubos. Se repitió este proceso hasta un total de 2 lavados. Posteriormente, se centrifugó la tira de tubos y se volvió a ubicar en el adaptador magnético en posición *high* para la eliminación de los restos de etanol. Se dejó secar al aire durante un máximo de 2 minutos y ya fuera del adaptador magnético, se añadieron 35,5  $\mu\text{L}$  de buffer de elución, se mezcló con la muestra y se incubó durante 2 minutos. La tira de tubos se colocó de nuevo en el adaptador magnético en posición *high* hasta que la solución clareó y se transfirieron 35  $\mu\text{L}$  de muestra a una nueva de tubos MicroAmp 0,2 mL.

Para llevar a cabo un **control de calidad** posterior a la construcción de la librería, 1  $\mu\text{L}$  de la muestra fue procesada en el Bioanalizador Agilent de alta sensibilidad (Ver detalle en el Anexo 2; Tabla 6). Las ocho bibliotecas se **secuenciaron** en la plataforma Illumina NovaSeq 6000 (Illumina) con una celda de flujo S2 en la unidad de secuenciación del Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG). El número de ciclos de lectura se fijó en 100 ciclos (Kit Illumina V1.5) y el número objetivo de lecturas en 200 millones de reads.

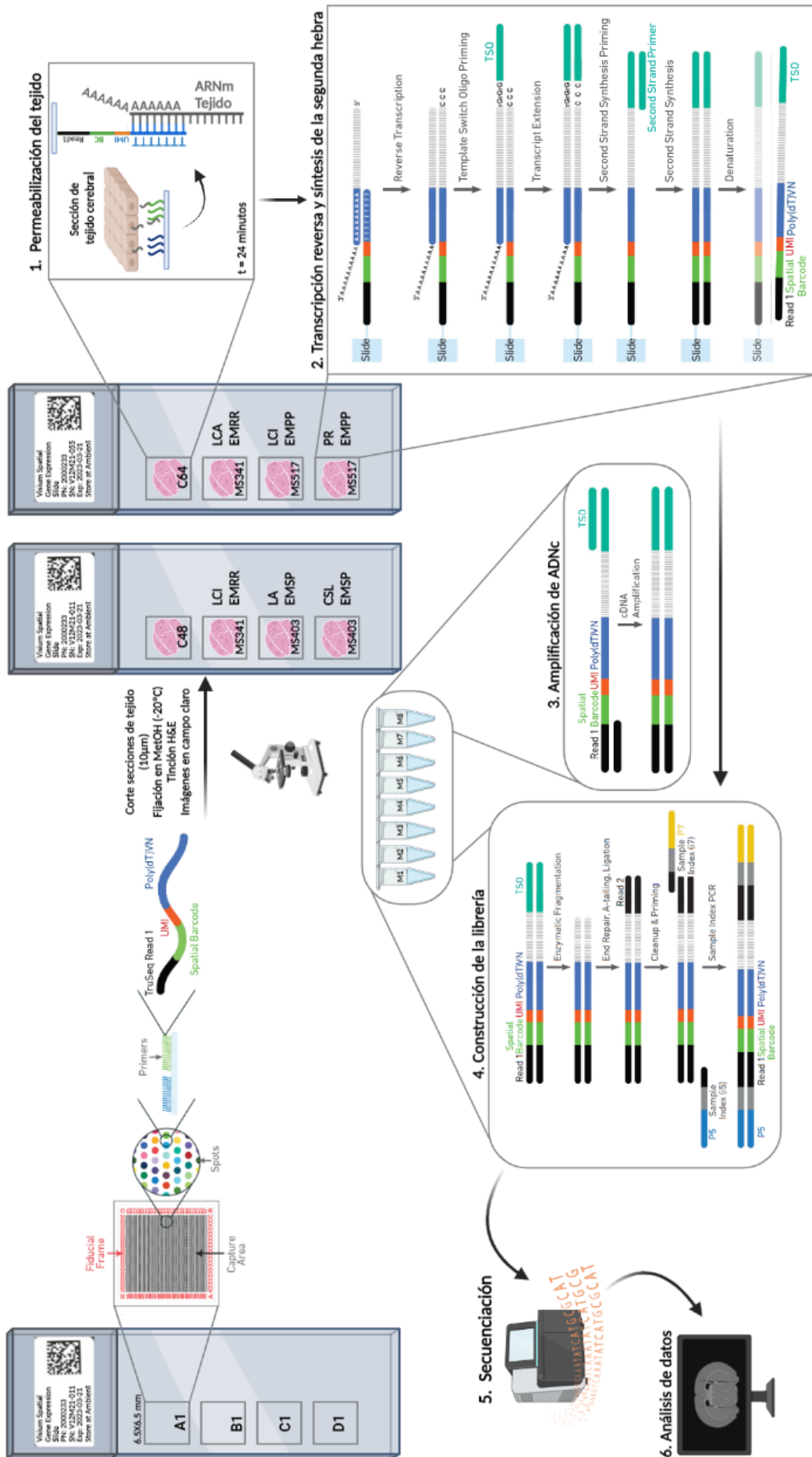
## 6. Análisis de datos de transcriptómica espacial

El demultiplexado de los datos de secuenciación se llevó en el servicio de secuenciación, creando archivos FASTQ. A continuación, estos archivos fueron analizados por el Servicio de estadística y análisis de datos ómicos de la Universidad de Valencia (UV) utilizando el software *Space Ranger* (10x Genomics v2.0.1) para realizar la alineación con el genoma humano de referencia (GRCh38), la detección de tejidos y del marco grabado y el recuento de códigos de barras/UMI. Los análisis posteriores del conjunto de datos de transcriptómica espacial se llevaron a cabo mediante el empleo del software *Loupe Browser* (10x Genomics v6.4.1). La selección de marcadores candidatos para la caracterización de los gráficos de expresión génica generados por el software *Loupe Browser* se realizó mediante una revisión bibliográfica.

### 6.1. Análisis de expresión génica diferencial en la lesión activa

Debido a que centro de la lesión activa (LA) fue la zona en la que se encontró una mayor diversidad celular, se propuso el estudio de la expresión génica de esta región de tejido en mayor profundidad. Para ello, a través del software *Loupe Browser* se seleccionaron los spots correspondientes a la zona que previamente había mostrado los mayores niveles de expresión de los marcadores genéticos ya estudiados y se creó un clúster denominado “Centro activo” (CA). Una vez creados estos clústeres, se llevó a cabo el análisis de la expresión génica diferencial a través del empleo del mismo software. Se seleccionaron los 20 principales genes más sobreexpresados en el centro activo de la lesión activa en comparación con el tejido restante de esa misma lesión. A continuación, utilizando la base de datos The Human Protein Atlas (Karlsson et al., 2021), se realizó una búsqueda de los principales tipos celulares que poseen una expresión definida de los genes anotados.





**Figura 7. Protocolo de expresión génica espacial de Visium.** La ubicación de cada uno de los cortes, así como el tipo de lesión seleccionada y la forma clínica del paciente correspondiente a cada corte se muestra en los portaobjetos que se sitúan en la parte superior derecha de la figura. Se procedió con la fijación de las secciones en metanol a -20°C, la tinción con hematoxilina-eosina y la toma de imágenes de cada área de captura en campo claro. Posteriormente, se realizó la permeabilización del tejido durante 24 minutos. Una vez el ARNm del tejido fue adherido a las secuencias presentes en el portaobjetos, se continuó con la transcripción reversa, síntesis de segunda hebra y desnaturalización. A partir de este punto, todos los pasos siguientes tuvieron lugar en tubos eppendorf. En ellos, se efectuaron los pasos de amplificación del ADNc formado, así como la construcción de la librería, obteniendo la biblioteca compuesta por construcciones pareadas para llevar a cabo la secuenciación de Illumina. En último lugar, se analizaron los datos extraídos de la secuenciación mediante el uso de determinados softwares (*Space Ranger* y *Loupe Browser*). Figura creada con BioRender.com. *UMI: identificador único molecular (del inglés unique molecular identifier); MetOH: metanol; H&E: hematoxilina-eosina; LCI: lesión crónica inactiva; LA: lesión activa; LCA: lesión crónica activa; EMRR: esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: esclerosis múltiple primaria progresiva; BC: código de barras (del inglés barcode); ARNm: ARN mensajero; ADNc: ADN complementario.*

La creación de las figuras recogidas en la introducción (Figuras 1, 2 y 3) y en materiales y métodos (Figuras 6 y 7) se llevó a cabo a través de la plataforma BioRender (n.d) (BioRender: The World's Leading Life Science Visualization Platform. Recuperado de <https://www.biorender.com/>).

## IV. RESULTADOS

### 1. Caracterización de las lesiones por inmunohistoquímica

Se analizaron 6 bloques de tejido cerebral *post mortem* de 3 pacientes con EM con las tres formas clínicas de la enfermedad y 2 bloques de tejido de 2 pacientes controles. Mediante inmunohistoquímica anti-PLP y anti-CD68 se identificaron 5 lesiones corticales: 1 lesión activa, y 4 lesiones crónicas inactivas (Ver detalle en el Anexo 3).

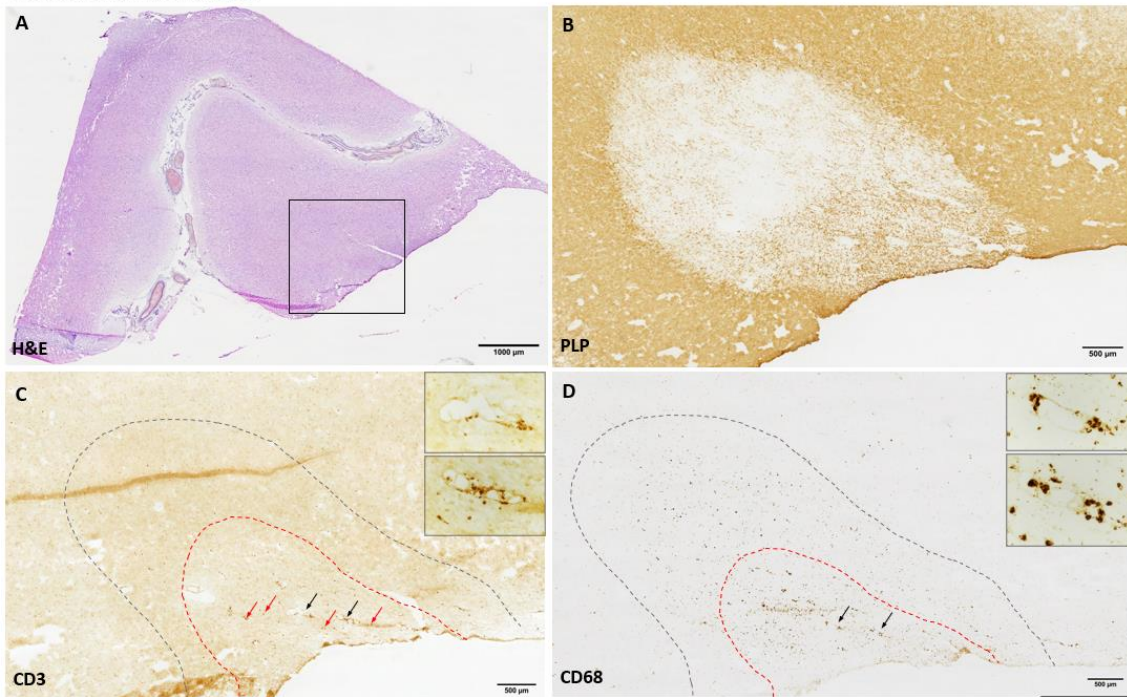
En primer lugar, se observó una imagen del tejido completo teñido con hematoxilina-eosina, lo que permitió una visualización panorámica del corte donde estaban presentes las lesiones (Figuras 8A, 9A, 10A, 11A y el Anexo 3). La diferencia histológica entre los tipos celulares existentes en SG o SB facilitó la distinción entre ambas. La presencia exclusiva de neuronas en SG permitió determinar que todas las lesiones estudiadas se situaban en el córtex cerebral.

En el corte de tejido referente a la lesión clasificada como activa (EMSP; MS403) (Figura 8) se observó una disminución en la tinción de la PLP por toda el área de lesión, facilitando su localización y la delimitación de sus márgenes. Así, como se observó en la figura 8B, en la parte superior y centro de la lesión se visualizó una desmielinización más avanzada dada la escasa tinción de PLP en esas regiones, mientras que en la parte inferior de la lesión se observó una desmielinización temprana o una remielinización dada la existencia de una tinción de PLP menos escasa y una rotura de fibras menos acentuada. Las inmunohistoquímicas realizadas para la detección de macrófagos y microglía CD68+ también facilitaron establecer la localización y delimitación de los márgenes de la lesión dada la presencia de un número elevado de células CD68+ (línea de puntos discontinua gris) (Figura 8D). El centro de lesión se caracterizó por una marcada actividad (línea de puntos discontinua roja) observada por un incremento del tamaño y número de células CD68+ localizadas tanto perivascularmente como difusamente. Las células teñidas positivamente se indican con puntas de flecha de color negro, señalando células CD68+ perivasculares. Los insertos muestran una mayor ampliación de las células teñidas positivamente y ubicadas alrededor de dos vasos sanguíneos.

Con el objetivo de desarrollar una caracterización más extensa de las lesiones corticales, se realizaron inmunohistoquímicas para la detección de linfocitos T utilizando el anticuerpo anti-CD3 (Figura 8C). En este caso, en el centro de la lesión (línea de puntos discontinua roja) se observó una infiltración moderada de linfocitos T CD3+ distribuidos perivascularmente pero también difusamente en toda el área de lesión. Las células teñidas positivamente se indican con puntas de flecha de color rojo para aquellos linfocitos T distribuidos difusamente por la zona de alta actividad celular y de color negro para aquellos linfocitos T localizados perivascularmente. Al igual que para el caso de las células CD68+, los insertos muestran una mayor ampliación de las células teñidas positivamente y ubicadas alrededor de dos vasos sanguíneos (Figura 8C y 8D). El número de linfocitos T CD3+ es inferior al número de macrófagos/microglía, como se había indicado anteriormente.

Asimismo, se realizaron inmunohistoquímicas utilizando el anticuerpo anti-CD20 con el objetivo de identificar la presencia de folículos menínges. Sin embargo, y dada la dificultad para localizar estas estructuras, no se identificó ningún folículo en las regiones de tejido estudiadas.

**LESIÓN ACTIVA EMSP (MS403)**



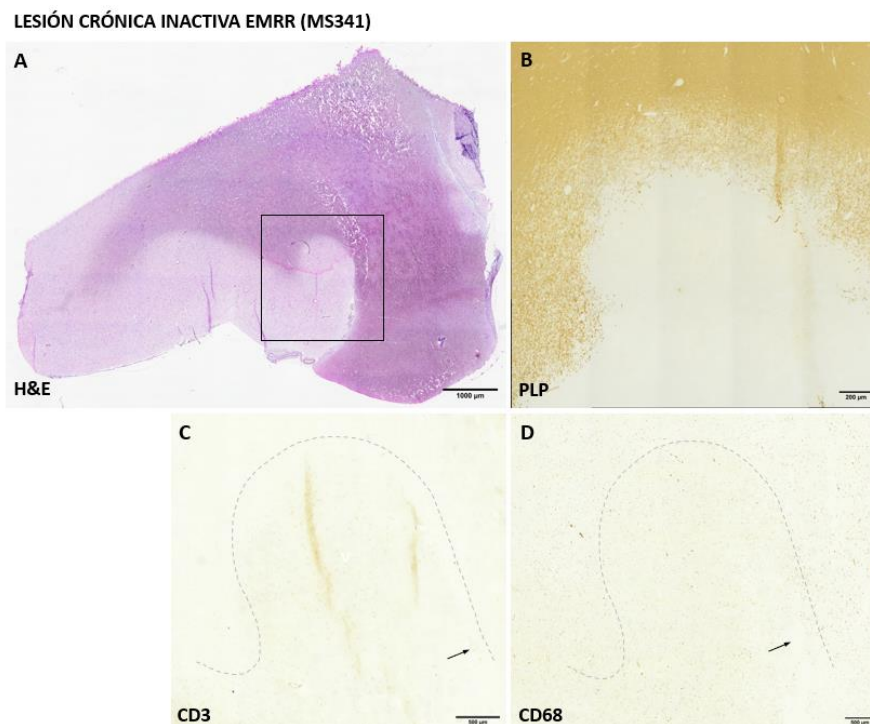
**Figura 8. Caracterización de la lesión activa.** Imagen panorámica del tejido teñido con hematoxilina-eosina tomada a 4x donde se indica la ubicación de la lesión (A) e inmunohistoquímicas de la zona de lesión ampliada a 10x de PLP (mielina) (B), CD3 (linfocitos T) (C) y CD68 (macrófagos y microglía) (D). En las imágenes inferiores se indica con una línea de puntos gris el área completa de la lesión y línea de puntos roja el centro activo de la lesión. Las flechas rojas indican infiltrados linfocitarios difusos y las flechas negras infiltrados linfocitarios y de células CD68+ perivasculares. En los insertos se muestran los mismos vasos ampliados a 40x. La barra de escala de las imágenes panorámicas se estableció en 1000 µm y las de la zona de lesión en 500 µm. *H&E: Hematoxilina-eosina; PLP: Proteína proteolipídica; CD68/3: Clúster de diferenciación 68/3.*

El resto de las lesiones estudiadas fueron clasificadas como lesiones crónicas inactivas: corte MS341-A2B5 (Figura 9); cortes MS341-A4B4, MS517-A3C4 y MS517-A1A2 (Ver detalle en el Anexo 3). En el centro de las lesiones se visualizó una ausencia completa de tinción de PLP, fruto de una desmielinización completa que permitió la ubicación y delimitación de los bordes de la lesión (Figura 9B). Por el contrario, en el borde de lesión aún se observó tinción de la proteína en forma de largas fibras, pero con una menor compactación de las fibras de mielina si se compara con las zonas con una señal intensa de PLP. Los dos cortes MS341 (A2B5 y A4B4) y el corte MS517 (A3C4) presentan patrones similares de desmielinización. La actividad celular de este tipo de lesiones es muy reducida ya que solo un escaso número de macrófagos/microglía CD68+ y linfocitos T CD3+ activos se observaron en el área de lesión y la mayor parte de ellos se encuentran alrededor de los vasos (Figura 9C y 9D).

En la zona de lesión del corte MS517 (A1A2) (Figura 10) se examinó una tinción de PLP más tenue que en las zonas colindantes, lo que facilitó la localización y la delimitación de los límites de la lesión (línea de puntos discontinua gris). La presencia de una densidad de mielina reducida y

vainas de mielina finas sugirió la posibilidad de que esta lesión se tratara de una lesión crónica inactiva remielinizada o placa de sombra (Figura 10B). Al igual que en el resto de las lesiones crónicas inactivas, la presencia de células CD68+ fue reducida, observándose principalmente alrededor de los vasos, pero también distribuidos difusamente (Figura 10D). En el caso de los linfocitos T CD3+, su número fue inferior que el de células CD68+ y se encontraron mayoritariamente difusos en toda el área de la lesión (Figura 10C). En la figura 10C y 10D, las puntas de flechas señalan los vasos sanguíneos que comparten los tres cortes de la lesión. Los insertos muestran uno de esos vasos sanguíneos, donde se observó un aumento de las células teñidas positivamente.

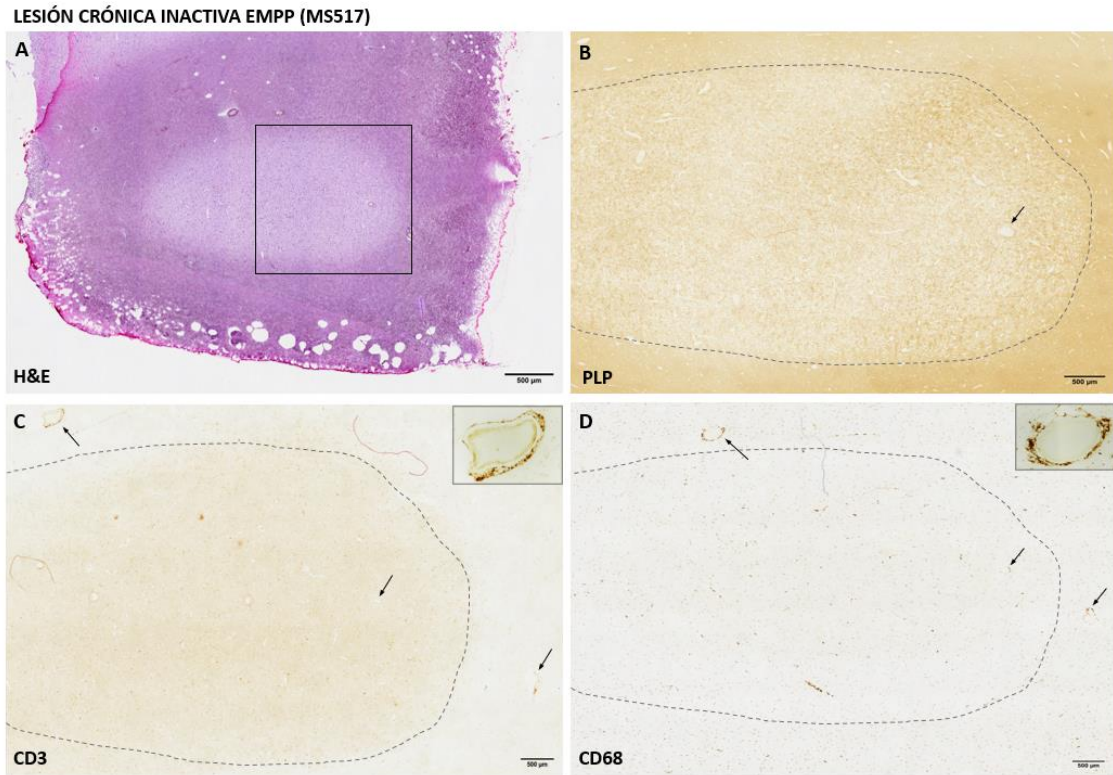
Los controles mostraron patrones normales de desmielinización e inflamación (Figura 11) (Ver detalle en el Anexo 3), con una tinción inferior en la corteza en el caso de PLP dada la falta de mielina en la SG y un número de macrófagos/microglía razonable al tratarse de células residentes en SNC en este último caso.



**Figura 9. Caracterización de la lesión crónica inactiva.** Imagen panorámica del tejido teñido con hematoxilina-eosina tomada a 4x donde se indica la localización de la lesión (A) e inmunohistoquímicas de la zona de lesión ampliada a 10x de PLP (mielina) (B), CD3 (linfocitos T) (C) y CD68 (macrófagos y microglía) (D). La barra de escala de las imágenes panorámicas se estableció en 1000 µm y las de la zona de lesión en 500 µm. *H&E: Hematoxilina-eosina; PLP: Proteína proteolípídica; CD68/3: Clúster de diferenciación 68/3.*

Las lesiones corticales se clasificaron en función de la localización de estas en las capas de la materia gris cortical, como se ha descrito anteriormente. Se distinguieron 4 lesiones subpiales pertenecientes al corte del paciente con EMSP y con lesión activa (MS403) (Figura 8B), a los dos cortes del paciente con EMRR y con ambas lesiones crónicas inactivas (MS341) (Figura 9B y

Anexo 3) y al corte del paciente con EMPP y con la lesión crónica inactiva (MS517) (Anexo 3). Las tres lesiones subpiales se clasificaron por la presencia de una desmielinización que se extendía desde la superficie hacia el interior de la corteza, pero sin alcanzar el ancho completo de la misma. La lesión restante se catalogó como lesión intracortical, perteneciente al corte del paciente con EMPP y con placa de sombra (MS517) (Figura 10B). Este tipo de lesiones se distinguieron por ser pequeñas lesiones que se localizaron íntegramente en la corteza.



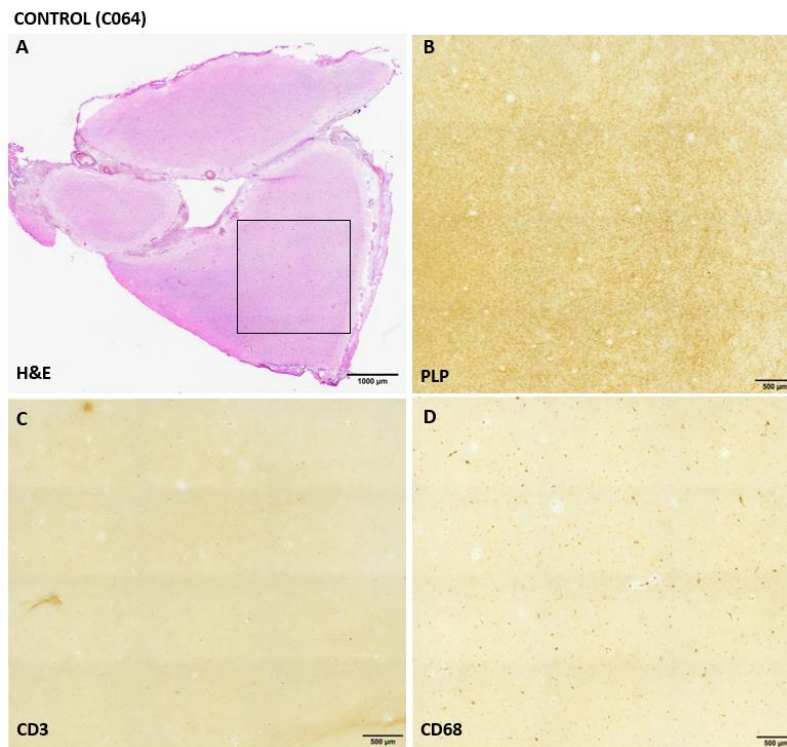
**Figura 10. Caracterización de la lesión crónica inactiva remielinizada.** Imagen panorámica del tejido teñido con hematoxilina-eosina tomada a 4x donde se indica la localización de la lesión (A) e inmunohistoquímicas de la zona de lesión ampliada a 10x de PLP (mielina) (B), CD3 (linfocitos T) (C) y CD68 (macrófagos y microglía) (D). En las imágenes posteriores se indica con una línea de puntos gris los márgenes de la placa. Las flechas negras señalan infiltrados linfocitarios y de células CD68+ perivasculares que comparten los tres cortes. En los insertos se muestra el vaso superior izquierdo ampliado a 40x. La barra de escala de las imágenes panorámicas se estableció en 1000 µm y las de la zona de lesión en 500 µm. *H&E: Hematoxilina-eosina; PLP: Proteína proteolipídica; CD68/3: Clúster de diferenciación 68/3*

## 2. Optimización del tiempo de permeabilización del tejido

Mediante la observación y comparación de las imágenes de fluorescencia de las secciones permeabilizadas a diferentes tiempos, se seleccionó como tiempo óptimo de permeabilización 24 minutos. Este tiempo de permeabilización es el que generó la huella de ADNc fluorescente más brillante y nítida, y a su vez la menor cantidad de señal fuera del tejido.

La sección incubada durante 18 minutos y la de 24 minutos presentaron señales similares de fluorescencia, pero como se ha mencionado, si la señal fluorescente es comparable en dos

puntos de tiempo, se considera óptimo el tiempo de permeabilización más largo. El control negativo no mostró ni ninguna señal de fluorescencia, mientras que el control positivo mostró una señal intensa y clara referente al ARNm adherido al portaobjetos (Figura 12B).

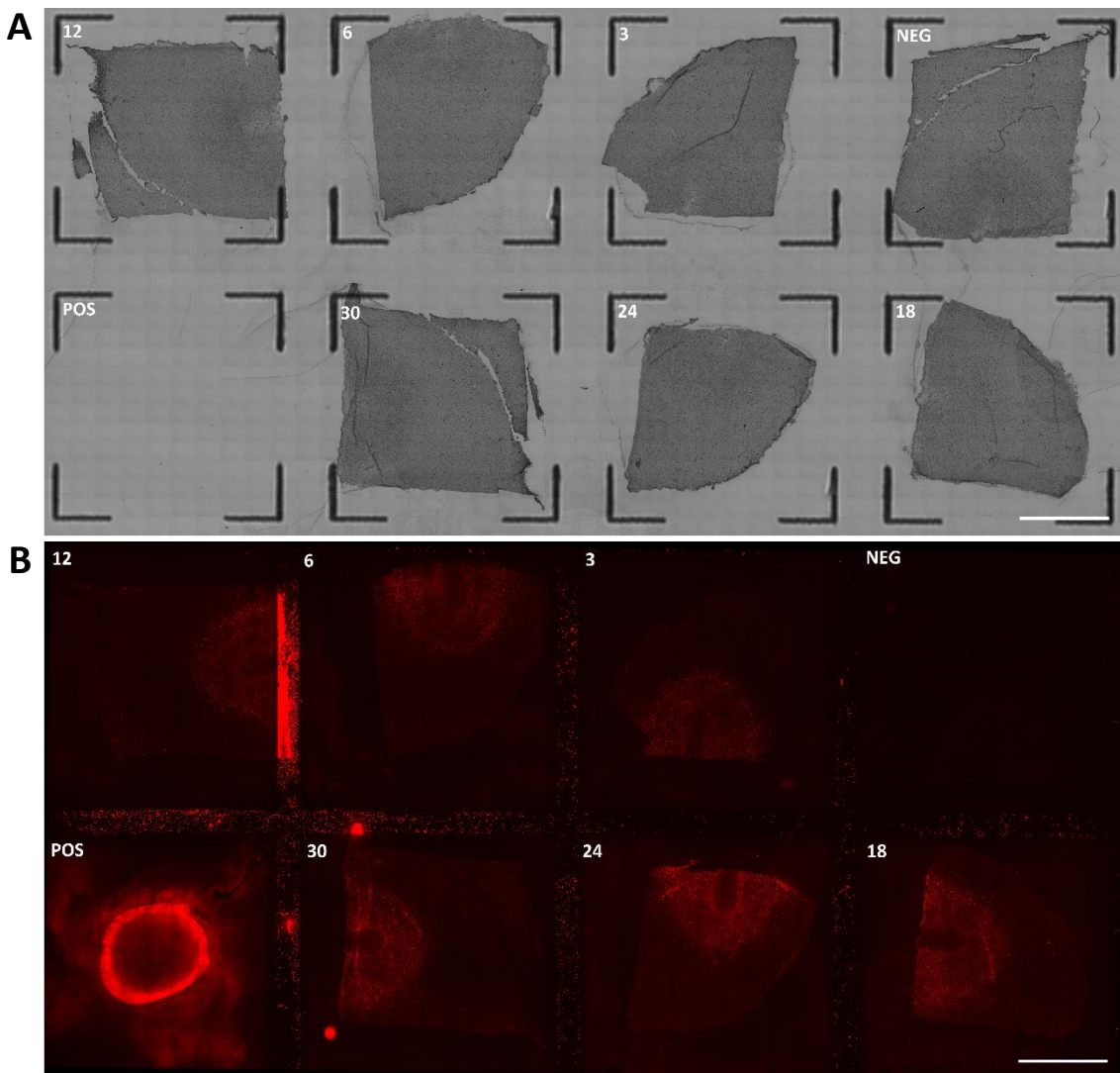


**Figura 11. Caracterización del control.** Imagen panorámica del tejido teñido con hematoxilina & eosina tomada a 4x donde se indica la localización de la región seleccionada (A) e inmunohistoquímicas de la zona de lesión ampliada a 10x de PLP (mielina) (B), CD3 (linfocitos T) (C) y CD68 (macrófagos y microglía) (D). La barra de escala de las imágenes panorámicas se estableció en 1000 µm y las de la zona de región de tejido seleccionada en 500 µm. *H&E: Hematoxilina-eosina; PLP: Proteína proteolipídica; CD68/3: Clúster de diferenciación 68/3*

### 3. Resultados del software *Space Ranger*

El resultado tras el demultiplexado, el alineamiento y el conteo de UMIs de los datos obtenidos de secuenciación, realizado mediante el uso del software *Space Ranger*, se muestra en la Tabla 3. El término “UMIs válidos” hace referencia a la fracción de lecturas con UMIs válidas, es decir secuencias UMIs que no contienen nucleótidos no conocidos y que no son homopolímeros. Para todas las muestras, se obtuvo un 100% de UMIs válidos, siendo el valor esperado superior al 75%. El término “saturación de secuenciación” es una medida de la complejidad de la biblioteca observada, y se aproxima a 1 (100%) cuando se han secuenciado todos los transcritos de ARNm, por lo que este valor depende de la profundidad de la secuenciación y de la complejidad de la biblioteca. Todos los valores de saturación de secuenciación se encontraron por encima del 80%, siendo la muestra de control C048 la que obtuvo un mayor valor de saturación de secuenciación (92%) y la muestra MS517 (A3C4), correspondiente a un paciente con EMPP, la que tuvo un menor valor de saturación de secuenciación (80.5%). El término “Fracción de lecturas en spots bajo tejido” hace referencia a la fracción de códigos válidos que mapean de forma segura con el

transcriptoma y presentan códigos de barras asociados al tejido. Todas las muestras presentaron valores superiores al 89%, siendo el valor ideal por encima del 50%. La muestra MS517 (A3C4) obtuvo el mayor valor de fracción de lecturas en spots bajo tejido (96.3%) y la muestra MS403 (A3A2) obtuvo el menor valor de fracción de lecturas en spots bajo tejido (89.3%). El término “número medio de genes por spot” hace referencia a la mediana del número de genes detectados por spots cubiertos por tejido. Esta detección se define como la presencia de al menos un recuento de UMI. La muestra MS341 (A4B4) presentó el mayor valor, con una mediana de genes por spot de 2.888, mientras que la muestra MS517 (A1A2) fue la que presentó el menor valor, con una mediana de genes por spot de 1.585.



**Figura 12. Determinación del tiempo óptimo de permeabilización.** Imágenes a campo claro del portaobjetos para la optimización de tejidos espacial Visium con las secciones de tejido del control CO48 teñidas con hematoxilina-eosina y permeabilizadas a diferentes los diferentes tiempos que se indican; en el control positivo no se incluyó tejido (A). Imágenes de fluorescencia con filtro de Rhodamina del portaobjetos de tejidos espacial Visium; se observó una señal de fluorescencia en las áreas de captura donde residía el tejido como resultado de la síntesis de ADNc. En el control positivo se incluyó una gota de ARN crudo, y el control negativo no se incluyó enzima de permeabilización (B). Las imágenes fueron tomadas a 4x y la barra de escala se estableció en 200  $\mu$ m. En ambas imágenes los tiempos se indican en minutos. POS: control positivo; NEG: control negativo.



Por último, el término “número de genes detectados” hace referencia al número de genes únicos con al menos un recuento de UMI en cualquier spot cubierto de tejido. Todas las muestras mostraron valores de entre 22.000-24.000 genes detectados en total, siendo la muestra MS403 (A3A2) la que presentó un mayor valor de número total de genes detectados (24.185) y la muestra MS517 (A1A2) la que presentó un menor número total de genes detectados (22.171). Considerando las ocho muestras, se detectaron un total de 186253 genes y un total de 25342 spots.

**Tabla 3.** Valores obtenidos por el software *Space Ranger*

Muestra	UMIs válidos	Saturación de secuenciación	Fracción de lecturas en spots bajo tejido	Mediana de genes/spot	Nº total de genes
C048	100%	92,0%	91,0%	2.096	22.530
C046	100%	83,6%	93,3%	2.917	23.277
MS341 (A2B5)	100%	86,2%	96,1%	1.962	23.297
MS341 (A4B4)	100%	81,5%	95,4%	2.888	23.659
MS403 (A3A2)	100%	82,2%	89,3%	3.743	24.185
MS403 (A3A5)	100%	91,6%	92,2%	1.803	23.653
MS517 (A3C4)	100%	80,5%	96,3%	2.375	23.474
MS517 (A1A2)	100%	88,1%	96,4%	1.585	22.171

#### 4. Análisis de la expresión génica espacial

##### 4.1. Correlación entre el análisis histológico y transcriptómico

El software *Loupe Browser* se utilizó para el análisis de las lesiones corticales a nivel transcriptómico, ya que el empleo de este software permitió la visualización y localización sobre el tejido de la información genética obtenida a partir de la secuenciación.

Primeramente, se identificó la expresión de genes constitutivos para valorar la calidad del tejido mediante la búsqueda en el software del gen de la actina  $\beta$  (*ACTB*). Todas las secciones de tejido consideradas en el trabajo mostraron una expresión uniforme del gen *ACTB* en cada una de las zonas de lesión seleccionadas, lo que indicó que el tejido se encontraba en las condiciones esperadas para el desarrollo del análisis.

Posteriormente, para establecer un paralelismo entre la información extraída del desarrollo de las inmunohistoquímicas y los resultados de transcriptómica, se visualizó el patrón de expresión

de los genes *PLP1*, *CD68* y *CD3D* en todas las muestras. En la Figura 13 se observa la distribución de la expresión de los genes mencionados en los cuatro cortes de tejido ya tratados previamente (C064, MS341, MS403 y MS517). En primer lugar, el control mostró una expresión uniforme del gen *PLP1* en toda el área de tejido considerada. En la LA presente en el individuo EMSP, los niveles de expresión en la zona inferior de la lesión fueron superiores a los observados en la parte central y superior de la lesión, correspondientes a las zonas más desmielinizadas en la tinción con PLP (Figura 8B). En la LCI presente en el paciente con EMRR, la expresión del gen *PLP1* se vio altamente reducida en la zona de mayor desmielinización. En la placa de remielinización presente en el individuo con EMPP, los niveles de expresión del gen *PLP1* también se vieron disminuidos en la zona de lesión dada una reducción de la densidad mielina en esa región. Para todos los cortes, los niveles de expresión del gen *PLP1* se correlacionaron con el patrón de tinción de la misma proteína observada en inmunohistoquímicas (Figura 8B, 9B, 10B, 11B).

Considerando el gen *CD68*, los niveles de expresión fueron generalmente bajos y se ubicaron de forma difusa en el tejido. Específicamente, en la LA, los niveles de expresión del *CD68* estaban aumentados en la zona de mayor actividad de la lesión y disminuían en las proximidades de esta. Por el contrario, en la LCI, presente en el paciente con EMRR el nivel de expresión del gen *CD68* fue superior en la zona exterior de la lesión y cercana al vaso e inferior en el centro de lesión. En la placa de remielinización la expresión del gen fue muy disminuida. Por ello, y principalmente para el caso de la LA, los niveles de expresión para el gen *CD68* observados en los cortes se asemejaron con los observados en la tinción con inmunohistoquímica (Figura 8D).

Por último, no se visualizó expresión del gen *CD3D*, correspondiente a la subunidad delta del complejo CD3 receptor de células T en ninguna de las muestras a excepción de la LA. En esta lesión se observó cierta expresión del gen *CD3D*, pero en menor grado que en la inmunohistoquímica para CD3 (Figura 8C). Esta ausencia de expresión se correlacionó con los resultados de las inmunohistoquímicas para los cortes de tejido C064, MS341 y MS403 dado que no se observó tinción de linfocitos T en estas muestras (Figura 9C, 10C, 11C).

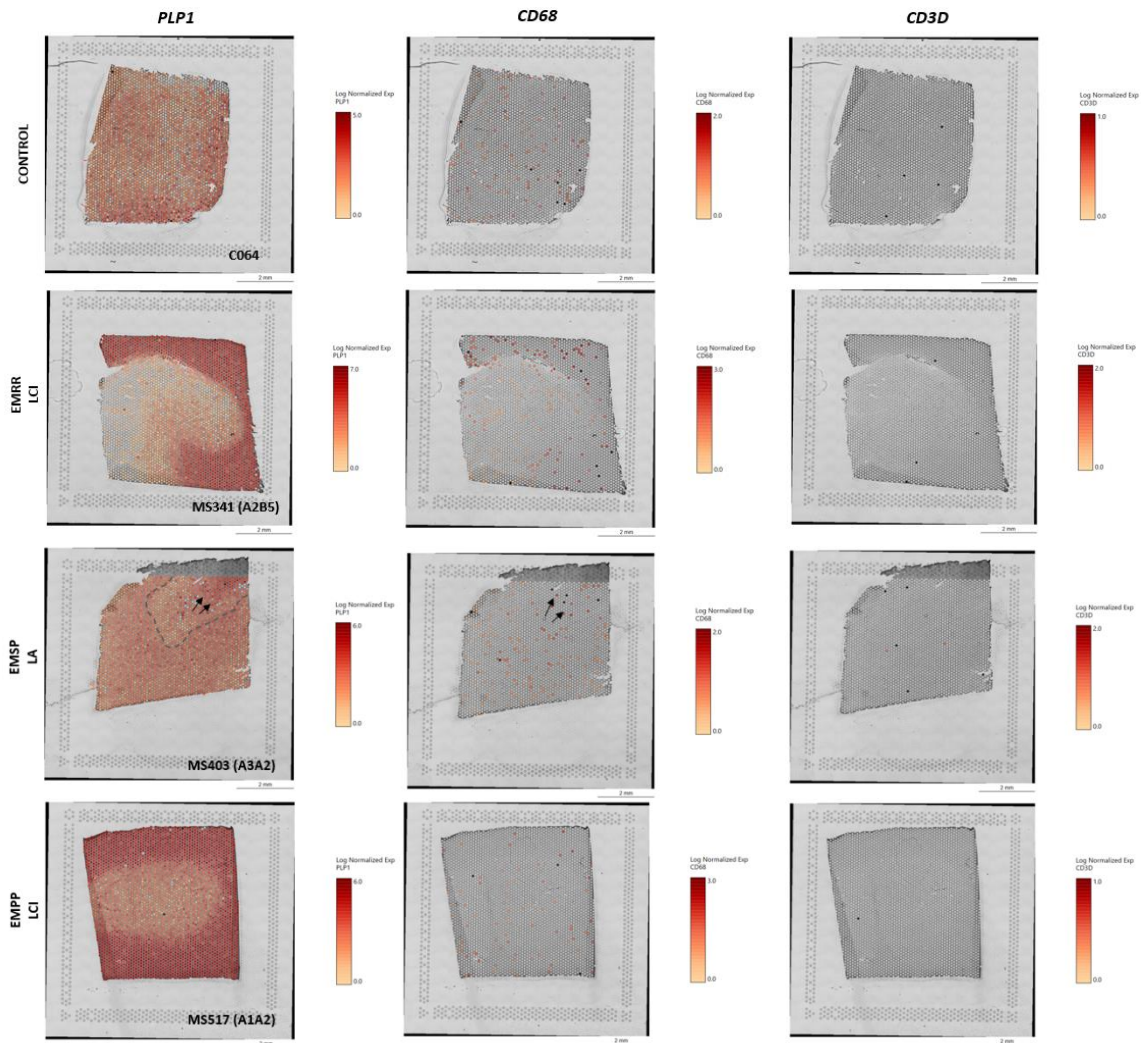
#### **4.2. Caracterización de las lesiones mediante transcriptómica espacial**

A continuación, con el objetivo de definir el microambiente celular intrínseco y colindante de las lesiones más representativas, se seleccionaron una serie de marcadores genéticos en base a la bibliografía existente que nos permitieron caracterizar los tipos celulares presentes en la lesión y su patrón de expresión (Figura 14).

En el control se visualiza una expresión uniforme y abundante del gen *MAP2*, que codifica a la proteína 2 asociada a microtúbulos. Esta proteína es un regulador predominante en el citoesqueleto de las dendritas neuronales y debido a su abundancia y especificidad es un sólido marcador somatodendrítico en neuronas de estado maduro (DeGiosio et al., 2022). Asimismo, el control mostró una expresión uniforme pero más reducida del gen *CNP*, que codifica para la 2',3'-Nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa. Esta enzima promueve la diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (CPO) a oligodendrocitos maduros, pero se mantiene su

expresión en estos últimos, por lo que se trata de un marcador de oligodendrocitos en diferentes estadios (Pooyan et al., 2020). Por último, el control exhibió una expresión notable y homogénea del gen *GFAP*, que codifica la proteína ácida fibrilar glial. Esta proteína es un componente esencial del citoesqueleto de los astrocitos (filamento intermedio) y constituye el marcador clásico de astrocitos maduros debido a su alta especificidad (Jurga et al., 2021).

Considerando la LCI presente en el individuo EMRR (Figura 14), el patrón de expresión del gen *MAP2* se focalizó en la zona de mayor desmielinización donde se observaron la mayor expresión del gen, correspondiente a la SG.



**Figura 13. Distribución de la expresión génica para los genes *PLP1*, *CD68* y *CD3D*.** Representación de los niveles de expresión génica para los genes *PLP1*, *CD68* y *CD3D* mediante spots para las muestras control (C048) y EM (EMRR, EMSP y EMPP) y su localización a nivel espacial en el tejido. En la lesión del paciente EMSP se muestra el centro activa delimitada por una línea de puntos gris y los niveles más altos de expresión señalados con una punta de flecha. Los datos se representan como el logaritmo normalizado de la expresión génica y en la leyenda se indica el código de colores utilizado por el software. La barra de escala se estableció en 2mm. *PLP1*: gen de la proteína proteolípídica 1; *CD68*: gen del clúster de diferenciación 68; *CD3D*: gen de la subunidad delta del complejo CD3 receptor de células T; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; LA: lesión activa; LCI: lesión crónica inactiva.

Por otro lado, la expresión del gen *CNP* se ubicó en la región opuesta al caso anterior, alcanzando los mayores niveles en la región con mayor proporción de mielina correspondiente a la SB. La expresión del gen *GFAP* se localizó por toda el área de lesión, observándose un incremento de la expresión del gen en los alrededores de la lesión en comparación con la expresión en la zona de lesión.

En la LA procedente del paciente con EMSP (Figura 14), los niveles de expresión *MAP2* se vieron incrementados en los puntos que rodean a la zona activa de lesión y se observó una ausencia de expresión en determinados puntos de esta zona. En el caso del gen *CNP*, los niveles más altos de expresión se alcanzaron en la zona de mayor actividad donde se observó también una ausencia de expresión, y disminuían en la región colindante a esta zona. Un patrón de expresión similar se visualizó con el gen *GFAP*, pero en este caso la expresión en el núcleo activo de la lesión fue destacada y no se observó una ausencia de expresión tan marcada en el centro activo.

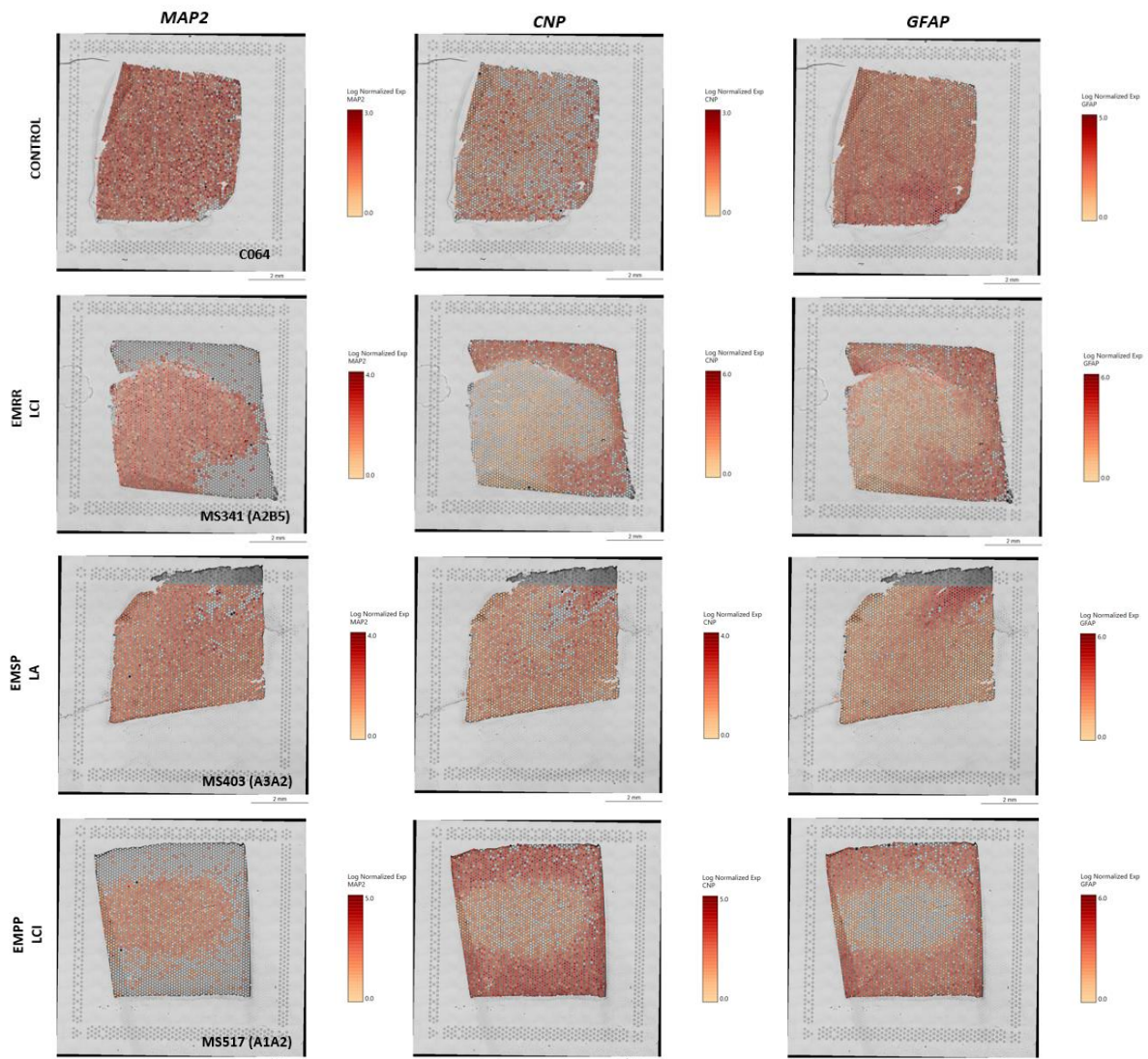
En el corte de tejido referente a la lesión crónica inactiva remielinizada del paciente con EMPP (Figura 14), los niveles de expresión del gen *MAP2* fueron ausentes en la periferia de la placa, pero se observó un aumento de los niveles de expresión en el centro de esta dada la presencia de SG. Los niveles más altos de expresión del gen *CNP* se observaron en los bordes del tejido debido a la abundancia de mielina en la SB presente alrededor de la lesión, donde se observó expresión, pero en menor grado. En último lugar, se observó un patrón similar de expresión al gen anterior con el gen *GFAP*, pero en este caso la expresión de este gen en el interior de la placa fue muy escasa.

#### **4.3. Análisis de expresión génica diferencial en la lesión activa**

El análisis de expresión génica diferencial entre el núcleo activo de la lesión activa y el tejido restante resultó en la detección de 20 genes sobreexpresados en esta región (Tabla 4). La búsqueda de los tipos celulares donde se ha descrito la expresión de estos genes permitió establecer su clasificación:

Son genes que se expresan en su mayoría en astrocitos (*GFAP, AQP4, CTSH, NFIA, S100B, PAQR6, SNORC, GJA1, SPARC, RHOBTB3, ADD3*), oligodendrocitos en diferentes fases de desarrollo (*NFIA, BCAS1, MOBP, MBP, PAQR6, TPPP3*) y en menor proporción, neuronas (*B3GAT2, ID4, B3GALT2*), células endoteliales debido a la presencia de vasos sanguíneos (*IGFB5*) y microglía (*CD74*).

Como se indica en la Tabla 4, el *GFAP* fue el gen más sobreexpresado en el CA, ya que se expresó 2,43 veces más en el CA de la LA en comparación con el TR. Asimismo, el segundo gen más sobreexpresado fue el *B3GAT2* en el CA, expresándose 2 veces más en el CA de la LA en comparación con el TR. En último lugar, el tercer gen más sobreexpresado fue *AQP4* con una expresión 1,87 veces superior en el CA de la LA en comparación con el TR. En todos ellos se observaron diferencias altamente significativas entre ambos clústeres ( $p < 0.001$ ).



**Figura 14. Distribución de la expresión génica para los genes *MAP2*, *CNP* y *GFAP*.** Representación de los niveles de expresión génica para los genes *MAP2*, *CNP* y *GFAP* mediante spots para las muestras control (C048) y EM (EMRR, EMSP y EMPP) y su localización a nivel espacial en el tejido. Los datos se representan como el logaritmo normalizado de la expresión génica y en la leyenda se indica el código de colores utilizado por el software. La barra de escala se estableció en 2 mm. *MAP2*: gen de la proteína asociada a microtúbulos 2; *CNP*: gen de la 2',3'-Nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa; *GFAP*: gen de la proteína ácida fibrilar glial; EMRR: Esclerosis múltiple remitente-recurrente; EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva. LA: lesión activa; LCI: lesión crónica inactiva.

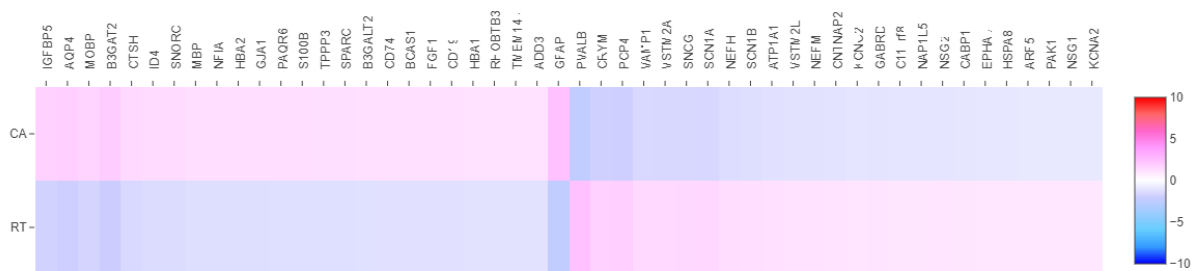
Los datos mencionados se muestran representados como un mapa de calor en la Figura 15, donde los genes más sobreexpresados se muestran en un color rojo más intenso, mientras que los genes más infraexpresados en un color azul más intenso.

Para el CA, el color rojo más intenso se obtuvo en el gen *GFAP*, seguido del gen *B3GAT2* y después el gen *AQP4*, mientras que el azul más intenso se obtuvo en el gen *PVALB*, seguido del

gen *PCP4* y después el gen *CRYM*; todos ellos marcadores de neuronas. En el caso del clúster TR, el gráfico del mapa de calor es opuesto al del clúster CA, donde el gen más sobreexpresado es el *PVALB* y el más infraexpresado es el *GFAP*.

**Tabla 4.** Listado de los 20 principales genes sobreexpresados de la región activa de la lesión activa y la significancia de la expresión del gen en la misma región expresado en *p*-valor (\*\*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ )

	Gen	Log2 Fold change	p-valor		Gen	Log2 Fold change	p-valor
1	<i>GFAP</i>	2,43	$1,04 \times 10^{-17}$ (****)	11	<i>SNORC</i>	1,38	$8,24 \times 10^{-4}$ (****)
2	<i>B3GAT2</i>	2,00	$8,61 \times 10^{-9}$ (****)	12	<i>GJA1</i>	1,28	$8,96 \times 10^{-4}$ (****)
3	<i>AQP4</i>	1,87	$2,25 \times 10^{-9}$ (****)	13	<i>ID4</i>	1,28	$1,20 \times 10^{-3}$ (***)
4	<i>IGFB5</i>	1,78	$4,67 \times 10^{-7}$ (****)	14	<i>TPPP3</i>	1,26	$1,76 \times 10^{-3}$ (***)
5	<i>MOBP</i>	1,69	$1,91 \times 10^{-7}$ (****)	15	<i>SPARC</i>	1,25	$2,50 \times 10^{-3}$ (***)
6	<i>CTSH</i>	1,48	$1,42 \times 10^{-4}$ (****)	16	<i>B3GALT2</i>	1,23	$4,14 \times 10^{-3}$ (***)
7	<i>MBP</i>	1,31	$2,58 \times 10^{-4}$ (****)	17	<i>BCAS1</i>	1,18	$4,14 \times 10^{-3}$ (***)
8	<i>NFIA</i>	1,31	$5,25 \times 10^{-4}$ (****)	18	<i>CD74</i>	1,17	$4,97 \times 10^{-3}$ (***)
9	<i>S100B</i>	1,28	$6,21 \times 10^{-4}$ (****)	19	<i>RHOBTB3</i>	1,15	$5,80 \times 10^{-3}$ (***)
10	<i>PAQR6</i>	1,27	$7,33 \times 10^{-4}$ (****)	20	<i>ADD3</i>	1,14	$5,80 \times 10^{-3}$ (***)



**Figura 15. Mapa de calor.** Representación de los 25 principales genes más sobreexpresados (representados en tonos rojos) e infraexpresados (representados en tonos azules) con presentes en el centro activo (CA) y el tejido restante (TR) de la lesión activa. Los datos se representan como cambio de expresión génica en escala logarítmica (del inglés *Log2 fold change*). CA: centro activo; RT: resto del tejido.

## V. DISCUSIÓN

Los nuevos métodos de transcriptómica espacial basados en secuenciación han avanzado en la conservación del contexto espacial mediante la vinculación de secuencias de ARNm de tejido con coordenadas X,Y en un portaobjetos. Las numerosas ventajas de los métodos basados en *microarrays* hicieron de esta tecnología un candidato óptimo para su empleo en este trabajo. Entre ellas destacan que permiten utilizar secciones de tejido mayores que los métodos basados en imágenes ( $13 \text{ mm}^2 > 1 \text{ mm}^2$ ), el flujo de trabajo se reduce a pocos días de experimentación, es posible perfilar el transcriptoma entero para cualquier organismo con ARNm poliadenilado y la variabilidad técnica entre muestras es muy baja. Específicamente, se ha empleado la tecnología Visium debido a su alta resolución (55  $\mu\text{m}$  de diámetro por punto con una distancia entre centros de 100  $\mu\text{m}$ ) y sensibilidad, ya que es capaz de detectar más de 10.000 transcritos por punto (Rao et al., 2021).

Una paso previo y necesario en el desarrollo del protocolo Visium es la localización y caracterización de la zona de interés, en nuestro caso de las lesiones, mediante técnicas histopatológicas convencionales. En este trabajo, se ha empleado la tinción con hematoxilina-eosina para realizar una distinción entre SG y SB e inmunohistoquímicas para estudiar la desmielinización (marcaje de mielina con anticuerpo anti-PLP) y el estado de activación de las lesiones (marcaje de macrófagos-microglía con anti-CD68 y de linfocitos T y B con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD20, respectivamente).

Estos criterios de clasificación de las lesiones han sido empleados por numerosos autores en las últimas décadas, estableciendo múltiples clasificaciones que han sido objeto de diversas modificaciones e introducción de nuevos conceptos a lo largo de los años que han permitido una caracterización más detallada y extensa de las lesiones (Bö et al., 1994; Kuhlmann et al., 2017; Lassmann et al., 1998; Lucchinetti et al., 2000). No obstante, la clasificación más simple es aquella basada en la distinción de 3 tipos de lesiones: activa, crónica activa y crónica inactiva. Esta clasificación constituye la base de todas las clasificaciones posteriores y es suficiente para interpretar los hallazgos patológicos, por ello ha sido la utilizada en este trabajo.

Las lesiones desmielinizantes corticales se describieron por primera vez en la EMSP y EMPP, pero ahora se sabe que también son una característica de las fases más tempranas de la EM (Lucchinetti et al., 2011). En nuestro trabajo, todas las lesiones estudiadas, correspondientes a los tres fenotipos clínicos de la EM, se localizaron en el córtex cerebral. Se identificó 1 LA en el paciente EMSP y 4 LCI en los pacientes EMRR y EMPP. Asimismo, atendiendo a su localización, 4 de las lesiones eran subpiales (en los pacientes EMRR, EMSP y EMPP) y 1 lesión fue intracortical (en el paciente con EMPP).

Pese a que las LA suelen ser más comunes en fases tempranas de la enfermedad, estas lesiones también pueden encontrarse en individuos con formas clínicas progresivas de la EM. Además, las LCI se encuentran más frecuentemente en la EM crónica, con un mayor tiempo de evolución de la enfermedad (Frischer et al., 2015). Por ello, los resultados concuerdan con lo esperado, ya

que la LA estaba presente en el individuo con EMSP y las LCI estaban presentes en los individuos con formas EM crónicas (>15 años de duración de la EM). Dada la similitud encontrada en los patrones de desmielinización y contenido celular de controles y lesiones crónicas inactivas, únicamente se consideraron para los análisis posteriores las cuatro muestras que representaban todos los tipos de lesiones encontradas y los fenotipos de la enfermedad.

Con la tecnología Visium, la calidad del estudio depende en gran medida de la elección correcta del tiempo óptimo de permeabilización, ya que un tejido poco permeabilizado tendrá consecuencias en la baja diversidad de las bibliotecas, y un tejido sobrepermeabilizado puede provocar la difusión de ADNc y una localización espacial menos precisa. Otros autores que han empleado tejido de cerebro humano en sus estudios han seleccionado tiempos de permeabilización entre 12 y 18 minutos (Chen et al., 2020; Lerma-Martin et al., 2022). No obstante, en nuestro caso se seleccionaron 24 minutos porque este resultó ser el tiempo de permeabilización con mejor intensidad de la señal y menor difusión.

En el estudio de transcriptómica espacial, en primer lugar, se estudiaron los niveles de expresión del ARNm de los genes cuya proteína se detectó en las inmunohistoquímicas (*PLP1*, *CD68* y *CD3D*), permitiendo establecer un paralelismo entre las observaciones a nivel histológico y transcriptómico. La expresión de los genes *PLP1*, *CD68* y *CD3D* y su localización espacial en el tejido se correlacionó en gran medida con lo observado en las inmunohistoquímicas, siendo más evidente para el caso del gen *PLP1*. La LA mostró un patrón de expresión homogéneo, acentuándose en la zona de mayor actividad, mientras que la LCI mostró una expresión muy reducida del gen *PLP1* en la zona de mayor desmielinización en comparación con el control. Resultados similares fueron expuestos por T. Zeis et al., los cuales realizaron un análisis de expresión génica diferencial de la SB de apariencia normal (NAWM) (del inglés *Normal Appearing White Matter*) en lesiones desmielinizantes activas e inactivas y remielinizantes a través del uso de *arrays*. Estos autores identificaron una disminución acentuada de la expresión de *PLP1* en los tejidos de lesión desmielinizantes inactivas en comparación con la SB de apariencia normal (Zeis et al., 2018). Por otro lado, la expresión del gen *CD68* fue superior en la zona activa de la lesión activa en comparación con el resto de las lesiones y la expresión del gen *CD3D* fue más notable en la lesión activa en comparación con el resto de las lesiones. En un estudio similar al presente, pero empleando lesiones en SB subcorticales, Lerma-Martin et al. mapearon macrófagos y microglía en el núcleo inflamado de la LA en EM, mientras que únicamente pudieron mapear muy pocos macrófagos y microglía en los tejidos con lesión crónica inactiva y controles (Lerma-Martin et al., 2022).

Recientemente se ha descrito que el incremento de los marcadores CD11c y CD68 en materia gris desmielinizada podría suponer un aumento de la actividad fagocítica y eliminación de desechos en estas lesiones, lo que podría indicar una remielinización más eficiente y una disminución de la inflamación (Van Wageningen et al., 2022). Dado que en la zona activa también se observó un incremento del gen *PLP1*, sería necesario un estudio más exhaustivo empleando un mayor número de marcadores para determinar el papel de estas células CD68+ y su contribución a la remielinización.



Por otro lado, se examinaron los diferentes tipos celulares presentes en cada una de las lesiones y su distribución con el fin de caracterizar más ampliamente el microambiente celular de estas. En primer lugar, el empleo del marcador de expresión génica específico de neuronas (*MAP2*) se expresó y localizó mayoritariamente en las zonas correspondientes al córtex cerebral, correspondiéndose con el patrón de expresión esperado. En el caso de la LA, se observó una ausencia de expresión del gen *MAP2* en ciertos puntos de la zona con mayor actividad como posible fruto de la neurodegeneración asociada a esa zona. Por el contrario, en esa misma región se observaron niveles aumentados de los genes específicos de oligodendrocitos (*CNP*).

Como se ha mencionado, el gen *CNP* aumenta su expresión en los oligodendrocitos inmaduros antes del comienzo de la mielinización y se mantiene durante toda la vida. Estudios que han llevado a cabo un análisis *post mortem* de las lesiones en SB en pacientes con EM han mostrado un elevado número de oligodendrocitos inmaduros en lesiones activas, que se caracterizan por una fuerte respuesta inflamatoria. Este hecho sugiere que se puede producir una regeneración extensa de oligodendrocitos en ciertas placas al inicio de la lesión, y se considera que el ambiente inflamatorio durante la desmielinización puede estimular el proceso de remielinización (Kalafatakis & Karagogeos, 2021). Además, se ha constatado que las lesiones crónicas en SB normalmente muestran una disminución de la densidad de oligodendrocitos inmaduros, combinado con una falta de diferenciación de estas células y una pérdida de oligodendrocitos maduros (Tepavčević & Lubetzki, 2022). En la LCI no se observó expresión del gen *CNP* en la zona más desmielinizada y una reducción de su expresión alrededor de esta zona, lo que indica una ausencia de células del linaje oligodendrial.

Por otra parte, en la lesión activa se observaron niveles aumentados del gen *GFAP*, el marcador genético más representativo de astrocitos. Estudios recientes como el llevado a cabo por Cubas-Núñez et al. también describen la presencia de astrocitos GFAP+ en lesiones activas de córtex cerebral asociados a neurodegeneración. En el caso de la LCI, la expresión del gen *GFAP* mostró una expresión homogénea en la lesión desmielinizada con menor intensidad en el centro de la lesión, pero mayores niveles en el borde de esta. Por el contrario, P Koning *et al.* detectaron que los niveles de expresión de ARNm de *GFAP* aumentaban en todas las áreas donde se puede encontrar gliosis, es decir en el borde y centro de lesiones crónicas (Koning et al., 2007).

Considerando la LCI presente en el paciente con EMPP, se ha sugerido la presencia de una placa de sombra (del inglés *shadow plaque*) dada la tenue tinción de PLP en esa zona. En pacientes con EM se ha inferido que representan áreas parcialmente remielinizadas y son raras, por lo que resulta difícil caracterizarlas. Según un estudio de S. Y. Yeung *et al.* es posible que estas placas de sombra no contengan CPOs y representen áreas focales de adelgazamiento de mielina de oligodendrocitos maduros supervivientes a la desmielinización (Yeung et al., 2019). Basándonos en la transcriptómica, la expresión leve de los genes *PLP1* y *CNP* en el centro de la lesión se ajusta con las observaciones a nivel inmunohistoquímico.

El incremento en la expresión de *GFAP* en el núcleo activo de la LA fue posteriormente validado mediante un análisis de expresión génica diferencial entre esa región y el resto del tejido, donde se mostró a este gen como el más sobreexpresado en comparación con el resto del tejido y en

el que se observaron las mayores diferencias significativas entre ambos clusters ( $p < 0,001$ ). Los astrocitos responden a una lesión cerebral mediante un proceso complejo de activación que integra cambios morfológicos (hipertrofia) y transcripcionales. Este proceso se asocia con un aumento de la expresión de *GFAP*, y es por lo que se utiliza como marcador de astrocitos reactivos. Esta sobreexpresión y otros signos de reactividad astrocitaria se han asociado a una amplia gama enfermedades neurodegenerativas, incluida la EM (Pekny & Pekna, 2016). Los astrocitos, presentes en el centro y borde de lesión donde comprenden el tipo celular más prevalente, juegan un papel crítico en la patogénesis de la EM, induciendo cascadas inflamatorias y ocasionando daño tisular (Aharoni et al., 2021). Del resto de genes sobreexpresados, la mayor parte fueron marcadores del linaje astrocitario, entre los que destacó el gen *AQP4*, que codifica a la aquaporina 4. En EM, Martin-Lerma *et al.*, mediante la integración de datos de secuenciación de ARN de núcleo único y transcriptómica espacial, pudieron identificar 5 estados diferentes de astrocitos que caracterizaron mediante la diferente expresión de genes marcadores de cada uno de los estados. Particularmente, el estado celular 2 de astrocitos se caracterizó por el enriquecimiento de genes marcadores de estrés celular y glía reactiva, entre los que destacaron dos marcadores sobreexpresados en este trabajo: *AQP4* y *GJA1*. Estos subtipos de astrocitos (estado celular 2) se localizaron en las zonas de borde activo de LA y crónicas activas. El incremento de la inmunorreactividad de *AQP4* es una característica clave de la astrogliosis reactiva y se observa en diversos trastornos neuropatológicos como NMO, Alzheimer o Parkinson (Ikeshima-Kataoka, 2016; Lerma-Martin et al., 2022). El exceso de otro de los marcadores sobreexpresados, el gen *S100B*, también ha mostrado tener una alta relación con la reactividad astrocitaria en la EM (Barros et al., 2022). En un estudio llevado a cabo por Barateiro *et al.* los astrocitos reactivos se identificaron como la fuente celular predominante de *S100B* y describieron una alta expresión de este gen en lesiones activas en SB de muestras de cerebro de pacientes con EM *post mortem* (Barateiro et al., 2016). Por ello, la firma genética de los astrocitos encontrada en este estudio sugiere un fenotipo reactivo en el centro activo de lesión, contribuyendo de forma crítica al desarrollo de las lesiones en EM e impulsando respuestas inflamatorias y neurotóxicas.

El gen *B3GAT2* resultó ser el tercer gen más sobreexpresado en el centro activo de la LA, y se trata de un marcador de neuronas asociado con el crecimiento axonal. No se ha encontrado ningún estudio que estudie el papel de este gen en la EM, pero en la enfermedad del Alzheimer se ha visto por ARN-seq que el ARNm de este gen se encuentra alterado en múltiples regiones cerebrales (Tang et al., 2021). Por ello, se requieren estudios futuros que validen los resultados obtenidos en este trabajo y que permitan esclarecer el papel de este gen en la patogenia de la EM.

Del total de genes sobreexpresados, se encontraron genes que se expresan en diferentes fases del desarrollo oligodendrial, destacando genes de oligodendrocitos mielinizantes (*MBP* y *MOBP*) y microglía (*CD74*). Otros autores también han descrito una sobreexpresión del gen *MBP* en lesiones activas de SB y de los genes *MBP* y *MOBP* en lesiones remielinizantes al tratarse de constituyentes esenciales de la mielina (Elkjaer et al., 2022)

Por último, este trabajo presenta algunas limitaciones. En primer lugar, los controles de este estudio no pueden considerarse totalmente sanos, puesto que uno de ellos padecía migrañas (C064) y el otro tenía algunos ovillos neurofibrilares Tau+ (C048) que, junto con el efecto de la edad, hace que no pueda descartarse la ausencia total de neurodegeneración. En segundo lugar, la necesidad de realizar pasos previos de caracterización de lesiones para seleccionar las zonas de interés que se introducen posteriormente en el portaobjetos resulta en que las secciones estudiadas por inmunohistoquímica puedan diferir levemente de las introducidas en el protocolo de transcriptómica espacial. Además, el pequeño tamaño del área de captura del portaobjetos implica una alta precisión en la adherencia del tejido completo al portaobjetos. El escaso número de muestras que se pueden incluir por portaobjetos (4 muestras) y elevado coste de la tecnología limita la extensión y complejidad del estudio. En tercer lugar, es necesario llevar a cabo cuatro controles de calidad en diferentes fases del protocolo de expresión génica lo que implica la superación de estos para la continuación con las muestras de partida del estudio. En cuarto lugar, el software empleado para el análisis de expresión génica *Loupe Browser* no permite la identificación de genes que se expresan de manera simultánea en un mismo spot y realiza una normalización de la expresión considerando la propia muestra de tejido y no el resto de las muestras. Dado que esta técnica no consigue reducir la resolución de la expresión a una sola célula, sería necesario complementar este estudio con datos de secuenciación de ARN en célula única para conseguirlo.

A pesar de sus limitaciones, el empleo de la transcriptómica espacial, en este caso implementada con la tecnología Visium, posibilita un estudio exhaustivo de la expresión génica del tejido cerebral y la distribución de cada gen en el espacio analizado. Hasta la fecha, este es el primer estudio que emplea esta tecnología para el estudio de lesiones en corteza de pacientes con EM. Por ello, a pesar de analizar un número reducido de muestras por el coste que supone, la información que se puede obtener de cada una de ellas es inmensa. En una segunda fase de este trabajo, un análisis bioinformático permitirá una exploración más profunda de los resultados para entender más detalladamente la patogenia de la esclerosis múltiple y elucidar posibles nuevos candidatos a biomarcadores de la enfermedad.

## VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido una caracterización a nivel histológico y transcriptómico de las lesiones encontradas en el córtex cerebral de pacientes con EM en las tres formas clínicas principales de la enfermedad, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- A través de la tecnología de transcriptómica espacial Visium, se ha confirmado que las diferencias observadas a nivel inmunohistoquímico se observan también a nivel transcriptómico en los genes *PLP1* (mielina), *CD68* (macrófagos y microglía) y *CD3D* (linfocitos T).
- El uso de marcadores genéticos ha permitido definir los tipos celulares presentes en el centro y periferia de las lesiones. En la lesión activa estudiada, se halló una disminución de la expresión de *MAP2* sugiriendo la presencia de neurodegeneración, un aumento de la expresión de *CNP* que podría implicar una remielinización en proceso, así como un aumento en la expresión de *GFAP*, el marcador por excelencia de astrocitos.
- El *GFAP* ha sido el gen más sobreexpresado en el centro de la lesión activa, y junto con otros genes sobreexpresados (*AQP4*, *S100B* y *GJA1*) ha permitido establecer una firma genética característica de astrocitos reactivos que actúan contribuyendo al microambiente inflamatorio de la lesión.
- La presencia de otros genes sobreexpresados que no han sido estudiados previamente en la EM, como *B3GAT2*, abre la puerta a futuros estudios que puedan esclarecer su papel en la enfermedad.
- En definitiva, el método de transcriptómica espacial Visium es una tecnología altamente innovadora y con grandes ventajas que ha mostrado ser altamente adecuada para el estudio de lesiones cerebrales en la EM; sus resultados sirven de base para posteriores análisis bioinformáticos que ahonden en la investigación y su futura aplicación a la clínica.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aharoni, R., Eilam, R. & Arnon, R. (2021). Astrocytes in Multiple Sclerosis—Essential Constituents with Diverse Multifaceted Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11):5904. <https://doi.org/10.3390/IJMS22115904>
- Barateiro, A., Afonso, V., Santos, G., Cerqueira, J. J., Brites, D., van Horsen, J. & Fernandes, A. (2016). S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 53(6): 3976–3991. <https://doi.org/10.1007/S12035-015-9336-6>
- Barros, C., Barateiro, A., Neto, A., Soromenho, B., Basto, A. P., Mateus, J. M., Xapelli, S., Sebastião, A. M., Brites, D., Graça, L. & Fernandes, A. (2022). S100B inhibition protects from chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Communications*, 4(3): fcac076. <https://doi.org/10.1093/BRAINCOMMS/FCAC076>
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L. & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578): 296–301. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABJ8222>
- Bö, L., Mörk, S., Kong, P. A., Nyland, H., Pardo, C. A. & Trapp, B. D. (1994). Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroimmunology*, 51(2): 135–146. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0165-5728(94)90075-2)
- Bø, L., Vedeler, C. A., Nyland, H. I., Trapp, B. D. & Mørk, S. J. (2003). Subpial Demyelination in the Cerebral Cortex of Multiple Sclerosis Patients. In *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(7): 723-32. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.7.723>
- Bradl, M. & Lassmann, H. (2009). Progressive multiple sclerosis. *Seminars in Immunopathology*, 31(4): 455–465. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0182-3>
- Calabrese, M., Filippi, M. & Gallo, P. (2010). Cortical lesions in multiple sclerosis. In *Nature Reviews Neurology*, 6(8): 438–444. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.93>
- Calabrese, M., Magliozzi, R., Ciccarelli, O., Geurts, J. J. G., Reynolds, R. & Martin, R. (2015). Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. In *Nature Reviews Neuroscience* 16(3): 147-58. <https://doi.org/10.1038/nrn3900>
- Chen, W. T., Lu, A., Craessaerts, K., Pavie, B., Sala Frigerio, C., Corthout, N., Qian, X., Laláková, J., Kühnemund, M., Voytyuk, I., Wolfs, L., Mancuso, R., Salta, E., Balusu, S., Snellinx, A., Munck, S., Jurek, A., Fernandez Navarro, J., Saido, T. C., ... De Strooper, B. (2020). Spatial Transcriptomics and In Situ Sequencing to Study Alzheimer’s Disease. *Cell*, 182(4): 976-991.e19. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.06.038>

- Chiricosta, L., Blando, S., D'Angiolini, S., Gugliandolo, A. & Mazzon, E. (2023). A Comprehensive Exploration of the Transcriptomic Landscape in Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2): 1448. <https://doi.org/10.3390/IJMS24021448>
- Cubas-Núñez, L., Gil-Perotín, S., Castillo-Villalba, J., López, V., Solís Tarazona, L., Gasqué-Rubio, R., Carratalá-Boscá, S., Alcalá-Vicente, C., Pérez-Miralles, F., Lassmann, H. & Casanova, B. (2021). Potential Role of CHI3L1+ Astrocytes in Progression in MS. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 8(3): e972. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000972>
- Darmanis, S., Sloan, S. A., Zhang, Y., Enge, M., Caneda, C., Shuer, L. M., Gephart, M. G. H., Barres, B. A. & Quake, S. R. (2015). A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(23): 7285–7290. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1507125112>
- DeGiosio, R. A., Grubisha, M. J., MacDonald, M. L., McKinney, B. C., Camacho, C. J. & Sweet, R. A. (2022). More than a marker: potential pathogenic functions of MAP2. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15: 974890. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.974890>
- Dendrou, C. A., Fugger, L. & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. In *Nature Reviews Immunology*. 15(9): 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis – a review. In *European Journal of Neurology*. 26(1): 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Elkjaer, M. L., Röttger, R., Baumbach, J. & Illes, Z. (2022). A Systematic Review of Tissue and Single Cell Transcriptome/Proteome Studies of the Brain in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 13:761225. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.761225>
- Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S. & Rocca, M. A. (2018). Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1):43. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0041-4>
- Frischer, J. M., Weigand, S. D., Guo, Y., Kale, N., Parisi, J. E., Pirko, I., Mandrekar, J., Bramow, S., Metz, I., Brück, W., Lassmann, H. & Lucchinetti, C. F. (2015). Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Annals of Neurology*, 78(5): 710–721. <https://doi.org/10.1002/ANA.24497>
- Gh Popescu, B. F. & Lucchinetti, C. F. (2012). Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. *BMC Neurology*, 12:11. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-12-11>
- Grigoriadis, N. & van Pesch, V. (2015). A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. In *European Journal of Neurology*, 22(S2): 3–13. <https://doi.org/10.1111/ene.12798>
- Guerrero, B. L. & Sicotte, N. L. (2020). Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? In *Frontiers in Immunology*, 11:374. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00374>

- Hemmer, B., Kerschensteiner, M. & Korn, T. (2015). Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. In *The Lancet Neurology*, 14(4): 406–419. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70305-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70305-9)
- Heß, K., Starost, L., Kieran, N. W., Thomas, C., Vincenten, M. C. J., Antel, J., Martino, G., Huitinga, I., Healy, L. & Kuhlmann, T. (2020). Lesion stage-dependent causes for impaired remyelination in MS. *Acta Neuropathologica*, 140(3): 359–375. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02189-9>
- Ikeshima-Kataoka, H. (2016). Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8):1306. <https://doi.org/10.3390/IJMS17081306>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., Kadluczka, J., & Kuter, K. Z. (2021). Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. *Biomolecules*, 11(9):1361. <https://doi.org/10.3390/BIOM11091361>
- Kalafatakis, I. & Karagogeos, D. (2021). Oligodendrocytes and Microglia: Key Players in Myelin Development, Damage and Repair. *Biomolecules*, 11(7):1058. <https://doi.org/10.3390/BIOM11071058>
- Karlsson, M., Zhang, C., Méar, L., Zhong, W., Digre, A., Katona, B., Sjöstedt, E., Butler, L., Odeberg, J., Dusart, P., Edfors, F., Oksvold, P., von Feilitzen, K., Zwahlen, M., Arif, M., Altay, O., Li, X., Ozcan, M., Mardonoglu, A., ... Lindskog, C. (2021). A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Science Advances*, 7(31): eabh2169. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2169>
- Kaufmann, M., Schaupp, A. L., Sun, R., Coscia, F., Dendrou, C. A., Cortes, A., Kaur, G., Evans, H. G., Mollbrink, A., Navarro, J. F., Sonner, J. K., Mayer, C., DeLuca, G. C., Lundeberg, J., Matthews, P. M., Attfield, K. E., Friese, M. A., Mann, M. & Fugger, L. (2022). Identification of early neurodegenerative pathways in progressive multiple sclerosis. *Nature Neuroscience*, 25(7): 944–955. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01097-3>
- Klineova, S. & Lublin, F. D. (2018). Clinical course of multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(9): a028928. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028928>
- Koning, N., Bö, L., Hoek, R. M. & Huitinga, I. (2007). Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, 62(5): 504–514. <https://doi.org/10.1002/ANA.21220>
- Kooi, E. J., Strijbis, E. M. M., Van Der Valk, P. & Geurts, J. J. G. (2012). Heterogeneity of cortical lesions in multiple sclerosis: clinical and pathologic implications. *Neurology*, 79(13): 1369–1376. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E31826C1B1C>
- Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W. & Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathologica*, 133(1): 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1653-y>

- La Manno, G., Gyllborg, D., Codeluppi, S., Nishimura, K., Salto, C., Zeisel, A., Borm, L. E., Stott, S. R. W., Toledo, E. M., Villaescusa, J. C., Lönnerberg, P., Ryge, J., Barker, R. A., Arenas, E. & Linnarsson, S. (2016). Molecular Diversity of Midbrain Development in Mouse, Human, and Stem Cells. *Cell*, 167(2): 566-580.e19. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.09.027>
- Lake, B. B., Ai, R., Kaeser, G. E., Salathia, N. S., Yung, Y. C., Liu, R., Wildberg, A., Gao, D., Fung, H. L., Chen, S., Vijayaraghavan, R., Wong, J., Chen, A., Sheng, X., Kaper, F., Shen, R., Ronaghi, M., Fan, J. B., Wang, W., ... Zhang, K. (2016). Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science*, 352(6293), 1586–1590. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF1204>
- Lassmann, H., Brück, W., & Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: An overview. *Brain Pathology*, 17(2): 210–218. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x>
- Lassmann, H., Raine, C. S., Antel, J. & Prineas, J. W. (1998). Immunopathology of multiple sclerosis: Report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *Journal of Neuroimmunology*, 86(2): 213–217. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00031-9)
- Lein, E., Borm, L. E. & Linnarsson, S. (2017). The promise of spatial transcriptomics for neuroscience in the era of molecular cell typing. *Science*, 358(6359): 64–69. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN6827>
- Lerma-Martin, C., Badia-i-Mompel, P., Flores, R. O. R., Sekol, P., Hofmann, A., Thäwel, T., Riedl, C. J., Wünnemann, F., Ibarra-Arellano, M. A., Trobisch, T., Eisele, P., Schapiro, D., Haeussler, M., Hametner, S., Saez-Rodriguez, J. & Schirmer, L. (2022). Spatial cell type mapping of multiple sclerosis lesions. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.11.03.514906> (En proceso de publicación)
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. & Heterogeneity, L. H. (2000). Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Annals of neurology*, 47(6): 707–717 [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200006\)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q)
- Lucchinetti, C. F., Popescu, B. F. G., Bunyan, R. F., Moll, N. M., Roemer, S. F., Lassmann, H., Brück, W., Parisi, J. E., Scheithauer, B. W., Giannini, C., Weigand, S. D., Mandrekar, J. & Ransohoff, R. M. (2011). Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 365(23): 2188–2197. <https://doi.org/10.1056/NEJMOMA1100648>
- Mancinelli, C. R., De Rossi, N. & Capra, R. (2021). Ocrelizumab for the treatment of multiple sclerosis: Safety, efficacy, and pharmacology. In *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 17:765-776 <https://doi.org/10.2147/TCRM.S282390>



- Moses, L. & Pachter, L. (2022). Museum of spatial transcriptomics. *Nature Methods*, 19(5), 534–546. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01409-2>
- Olsson, T., Barcellos, L. F. & Alfredsson, L. (2016). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. In *Nature Reviews Neurology*, 13(1): 26–36. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.187>
- Ortiz, C., Carle acute n, M. & Meletis, K. (2021). Spatial Transcriptomics: Molecular Maps of the Mammalian Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 44: 547–562. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-100520-082639>
- Pekny, M. & Pekna, M. (2016). Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862(3), 483–491. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2015.11.014>
- Pérez-Carmona, N., Fernández-Jover, E. & Sempere, Á. P. (2019). Epidemiology of multiple sclerosis in Spain. *Revista de Neurología*, 69(1): 32–38. <https://doi.org/10.33588/rn.6901.2018477>
- Piquet, A. L. & Alvarez, E. (2021). Neuroimmunology: Multiple sclerosis, autoimmune neurology and related diseases. Ed. Springer. 535 pp. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-61883-4>
- Pooyan, P., Karamzadeh, R., Mirzaei, M., Meyfour, A., Amirkhan, A., Wu, Y., Gupta, V., Baharvand, H., Javan, M., & Salekdeh, G. H. (2020). The dynamic proteome of oligodendrocyte lineage differentiation features planar cell polarity and macroautophagy pathways. *GigaScience*, 9(11):giaa116. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa116>
- Popescu, B. F. G., Pirko, I. & Lucchinetti, C. F. (2013). Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum*. 19(4): 901–921. <https://doi.org/10.1212/01.CON.0000433291.23091.65>
- Rao, A., Barkley, D., França, G. S. & Yanai, I. (2021). Exploring tissue architecture using spatial transcriptomics. *Nature*, 596(7871): 211–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03634-9>
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F. & Calabresi, P. A. (2018). Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 378(2): 169–180. <https://doi.org/10.1056/nejmra1401483>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7): 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Ståhl, P. L., Salmén, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J. F., Magnusson, J., Giacomello, S., Asp, M., Westholm, J. O., Huss, M., Mollbrink, A., Linnarsson, S., Codeluppi, S., Borg, Å., Pontén, F., Costea, P. I., Sahlén, P., Mulder, J., Bergmann, O., ... Frisén, J. (2016). Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*, 353(6294): 78–82. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF2403>

- Tang, X., Lebrilla, C. B., Jin, L. W., Maezawa, I., Harvey, D. J. & Zivkovic, A. M. (2021). Brain-region-specific, glycosylation-related transcriptomic alterations in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 17(S3): e051117. <https://doi.org/10.1002/ALZ.051117>
- Tepavčević, V. & Lubetzki, C. (2022). Oligodendrocyte progenitor cell recruitment and remyelination in multiple sclerosis: the more, the merrier? *Brain*, 145(12): 4178–4192. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAC307>
- Van Wageningen, T. A., Gerrits, E., Brouwer, N., Breve, J. J. P., Geurts, J. J. G., Eggen, B. J. L., Erik Boddeke, H. W. G. M. & Van Dam, A. M. (2022). Distinct gene expression in demyelinated white and grey matter areas of patients with multiple sclerosis. *Brain Communications*, 4(2):fcac005. <https://doi.org/10.1093/BRAINCOMMS/FCAC005>
- Williams, C. G., Lee, H. J., Asatsuma, T., Vento-Tormo, R. & Haque, A. (2022). An introduction to spatial transcriptomics for biomedical research. *Genome Medicine*, 14(1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01075-1>
- Yeung, M. S. Y., Djelloul, M., Steiner, E., Bernard, S., Salehpour, M., Possnert, G., Brundin, L. & Frisén, J. (2019). Dynamics of oligodendrocyte generation in multiple sclerosis. *Nature*, 566(7745): 538–542. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0842-3>
- Zeis, T., Howell, O. W., Reynolds, R. & Schaeren-Wiemers, N. (2018). Molecular pathology of Multiple Sclerosis lesions reveals a heterogeneous expression pattern of genes involved in oligodendroglioneogenesis. *Experimental Neurology*, 305: 76–88. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2018.03.012>
- Zeisel, A., M̂oz-Manchado, A. B., Codeluppi, S., Lönnerberg, P., Manno, G. La, Juréus, A., Marques, S., Munguba, H., He, L., Betsholtz, C., Rolny, C., Castelo-Branco, G., Hjerling-Leffler, J. & Linnarsson, S. (2015). Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*, 347(6226): 1138–1142. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1934>
- Zhang, L., Chen, D., Song, D., Liu, X., Zhang, Y., Xu, X. & Wang, X. (2022). Clinical and translational values of spatial transcriptomics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1): 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00960-w>

## **ANEXO 1**

### **PROTOCOLO TINCIÓN HEMATOXILINA & EOSINA**

1. Incubación 1 minuto a 37 grados utilizando un termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ (12363653, Fisher Scientific)
2. Fijación de los portaobjetos mediante una inmersión en metanol durante 30 minutos a -20 °C.
3. Añadir 500 µL de isopropanol a ≥ 99.5 % (I9516, Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, EEUU) e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Descartar el isopropanol mediante drenaje en un tubo de centrifuga de 50 mL y dejar secar durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 500 µL de Hematoxilina (S330930, Agilent, Santa Clara, California, EEUU) e incubar 7 minutos a temperatura ambiente.
6. Descartar la hematoxilina mediante drenaje y realizar lavados seriados en agua MiliQ: 5 lavados en un tubo de centrifuga de 50 mL, 15 lavados en un vaso de precipitados de 1L y 15 lavados en un vaso de precipitados de L.
7. Para garantizar la alcalinidad adecuada, añadir 500 µL de tampón *bluing buffer* (6769001, Fisher Scientific) a cada sección e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
8. Descartar el *bluing buffer* mediante drenaje y realizar 5 lavados en agua MiliQ en el segundo vaso de precipitados de 1L usado previamente
9. Añadir 500 µL de eosina diluida 1:100 (HT110216, Millipore Sigma) en tampón de ácido tris-acético (0.45 M pH 6.0) (Tris Base, BP152, Thermo Fisher Scientific) (Ácido acético, A6283, Millipore Sigma) e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
10. Descartar la mezcla de eosina mediante drenaje y lavar las secciones 15 veces en el tercer vaso de precipitados de 1L. ´
11. Secar al aire los cortes hasta que el tejido se torne a opaco y posteriormente incubar 5 minutos a 37 grados en el termociclador previamente empleado.
12. Montar los cortes con cubreobjetos utilizando el medio de montaje EUKITT.

**PROCOLO INMUNOHISTOQUÍMICA PARA SECCIONES DE TEJIDO FRESCO CONGELADO**  
**CORTADAS EN CRIOSTATO**

- 1) Dejar secar 1 min a 37°C en termociclador (o 30 min a T. amb)
- 2) Fijar 10 min en metanol a -20°C
- 3) Lavar con TBS en cubeta 3-5X
- 4) Inhibir peroxidasa → 0,6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en Metanol 10 min a T. Amb
- 5) Lavar con TBS en cubeta 3-5X
- 6) Desenmascarar: EDTA buffer pH9 60 min (*en vaporeta, dentro de cubeta de plástico sin tapa*)
- 7) Dejar enfriar 20 min
- 8) Lavar con TBS 3-5X
- 9) Secar con papel y poner DAKO pen si se desea ahí
- 10) Bloqueo 15 min a T. amb (10% NGS en TBS) (*200 ul por corte, extender con punta*)
- 11) Incubar con Ac 1º en 10% NGS a 4°C overnight
  - a. Ratón a-PLP → 1:500
  - b. Ratón a-CD68 → 1:100
  - c. Ratón a-CD3 → 1:100
  - d. Ratón a-CD20 → 1:250
- 12) Lavar con TBS en cubeta 3-5X
- 13) Incubar con Ac 2º en 10% NGS 1h a T. amb (*Goat a-mouse biotinilado, BA9200 Vector*)
- 14) Lavar con TBS en cubeta 3-5X
- 15) Incubar con streptavidina 1h a T.amb
- 16) Lavar con TBS en cubeta 3-5X
- 17) Revelar con DAB
- 18) Deshidratar:
  - a. Sumergir en EtOH 95% hasta que dejen de verse restos de agua
  - b. Sumergir en EtOH 100% hasta que dejen de verse restos de agua
  - c. Sumergir en Xyleno
- 19) Montar con EUKITT

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,6% en MetOH:

Stock H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 30%

Solución de trabajo 0'6% = 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%  
49 ml MetOH

### Tampón TBS:

- TBS - Solución madre pH 7,5 (20X):

- 60,57 g Tris
  - 180 g NaCl.
  - 400 ml 1N HCl\*
- } Enrasar a 1L H<sub>2</sub>O destilada

▪ HCl 1N:

HCl 37% = 12N

V1 x 12N = 500 ml x 1N

V1 = 41,7 ml HCl 37%

458,3 ml H<sub>2</sub>O destilada

- TBS - Solución de trabajo (1X):

- 50 ml Stock
- 950 ml H<sub>2</sub>O destilada

### HIER (recuperación de epítomos inducida por calor)

1) Tampón citrato pH 6,0

2,10 g de ácido cítrico en 1L de H<sub>2</sub>O destilada  
(1418008/Panreac)

2) Tampón EDTA

Solución madre 20X: 50 ml a. bidest  
1,21 g TRIS (10 mM) → (141940 Panreac)  
0,37 g EDTA (1 mM) → (E6511 Sigma)

pH 8,5 o pH 9 según la fijación del material

Solución de trabajo: 2,5 ml de solución madre en 50 ml de a.bidest (2,5 ml de solución madre + 47,5 ml de H<sub>2</sub>O)

Procedimiento: colocar los portaobjetos en un recipiente de plástico lleno de tampón TRIS-EDTA o citrato, introducir el recipiente en una vaporeta durante 1 hora, sacar la olla a temperatura ambiente y dejar enfriar los portaobjetos. durante al menos 20 minutos, enjuague las secciones en TBS.

## ANEXO 2

### **Obtención de los datos de los pasos 5.3 y 5.4 de Materiales y métodos**

El número de spots cubiertos para cada una de las ocho áreas de captura totales se muestra en la Tabla 5. El porcentaje del área de captura cubierta se calculó a partir del dato del número total de spots cubiertos y considerando como el número de spots totales 5000 spots de expresión génica. Todas las muestras superaron el 50% de cobertura del área de captura, siendo la muestra 6 la que presentó el mayor porcentaje de cobertura del área de captura (86%).

La realización de la PCR en tiempo real nos proporcionó los datos de Cq (Tabla 5) que se encontraron dentro de los rangos esperados (12.2-15.7). Redondeando estos valores, se determinó el número de ciclos para el desarrollo de la amplificación de ADNc, obteniendo 13 ciclos para las muestras 2,3,5,6 y 7; y 14 ciclos para las muestras 1, 4 y 8 (Tabla 5).

Los valores de concentración de ADNc se extrajeron de los resultados del Bioanalizador de alta sensibilidad Agilent en los que se obtuvieron datos de concentración de ADNc con valores entre 1,62-2,58 ng/μL (Tabla 5). Este dato se utilizó posteriormente para el cálculo del rendimiento del ADNc, el cual fue necesario para la determinación del número de ciclos para indexar las librerías. El rendimiento del ADNc se obtuvo multiplicando la concentración de ADNc por el volumen de elución (40 μL).

El número de ciclos para la realización de la *Sample Index PCR* se obtuvo mediante el cálculo del 25% del rendimiento ADNc total, ya que el protocolo para la generación de la biblioteca de expresión génica espacial Visium se ha optimizado para utilizarse una proporción fija (25%) del ADNc total. Así, la complejidad de esta biblioteca será comparable a la generada utilizando una proporción mayor (>25%) del ADNc.

Para determinar el número de ciclos de PCR, en el protocolo se indicaba que para muestras de ADNc con una concentración de partida de entre 0.25-25 ng el número total de ciclos debía ser entre 17-19. Por ello, se seleccionaron 17 ciclos para la realización de la indexación de las librerías como se indica en la Tabla 5.

Al igual que los datos de concentración de ADNc, los valores de concentración de la librería se extrajeron de los resultados del Bioanalizador de alta sensibilidad Agilent, los cuales mostraron valores entre 31,29-45,19 ng/μL (Tabla 6) y fueron similares a los esperados. Asimismo, los datos de longitud media de la librería se encontraron dentro de los rangos establecidos (200-500 pb) (Tabla 6). Por último, los datos de profundidad de secuenciación, así como la cantidad de librería en nM fueron precisas para configurar los requisitos de la secuenciación y fueron calculadas como se indica a continuación:

*Profundidad de secuenciación (lecturas)*

$$= (\text{Área de captura cubierta}) * (n^{\circ} \text{ total de spots}) * 50.000 \text{ pares de lecturas/spot}$$

$$\text{Cantidad de librería (nM)} = \frac{\text{Concentración de la librería } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}\right)}{\text{Peso molecular ADN } \left(660 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) * \text{longitud librería (pb)}} * 10^6$$

**Tabla 5.** Valores obtenidos de la puesta a punto del protocolo de expresión génica Visium (pasos 5.3 y 5.4 de Materiales y Métodos).

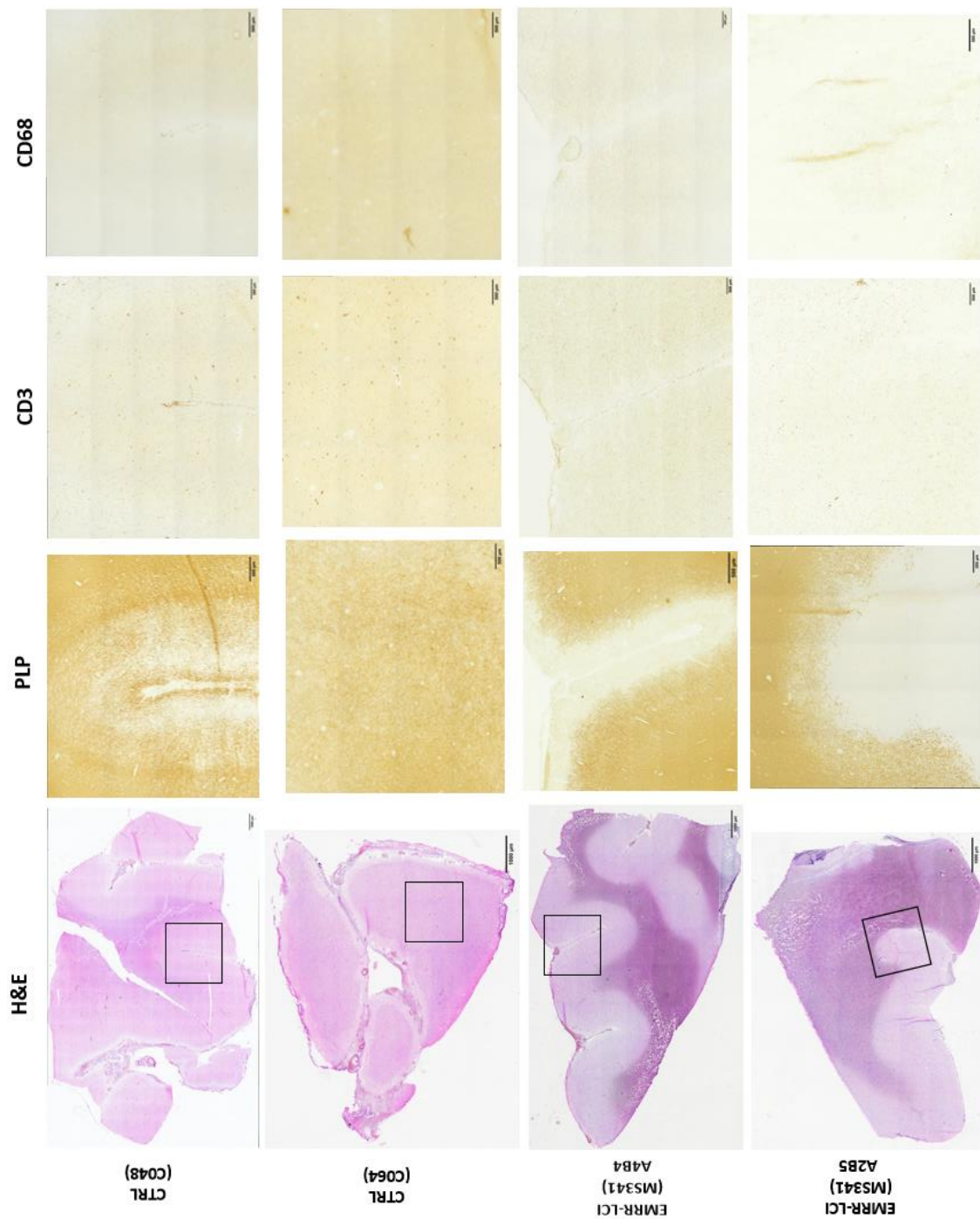
Muestra	ID TUBO	Área de captura	Spots cubiertos	% Área de captura cubierta	Valor CQ	Número de ciclos Amp DNAC	Concentración ADNc (ng/ $\mu$ L)	ADNc total (ng)	25% del DNAC (ng)	Número ciclos <i>Sample index</i> PCR
<b>C048</b>	1	V12M21-011_A1	2576	51,52	14,434	14	1,626	65,056	16,264	17
<b>MS 341 (A4B4)</b>	2	V12M21-011_B1	3770	75,4	12,849	13	2,059	82,376	20,594	17
<b>MS 403 (A3A2)</b>	3	V12M21-011_C1	2628	52,56	13,183	13	2,468	98,720	14,680	17
<b>MS 403 (A3A5)</b>	4	V12M21-011_D1	3150	63	14,003	14	1,950	78,012	19,503	17
<b>C064</b>	5	V12M21-055_A1	2381	56,62	13,326	13	2,587	103,496	25,874	17
<b>MS 341 (A2B5)</b>	6	V12M21-055_B1	3288	67,76	13,295	13	1,628	65,100	16,275	17
<b>MS 517 (A3C4)</b>	7	V12M21-055_C1	4300	85	12,751	13	2,328	93,108	23,277	17
<b>MS 517 (A1A2)</b>	8	V12M21-055_D1	3187	63,74	13,533	14	2,396	95,848	23,962	17

**Tabla 6.** Valores obtenidos de la puesta a punto del protocolo de expresión génica Visium (5.4 de Materiales y Métodos).

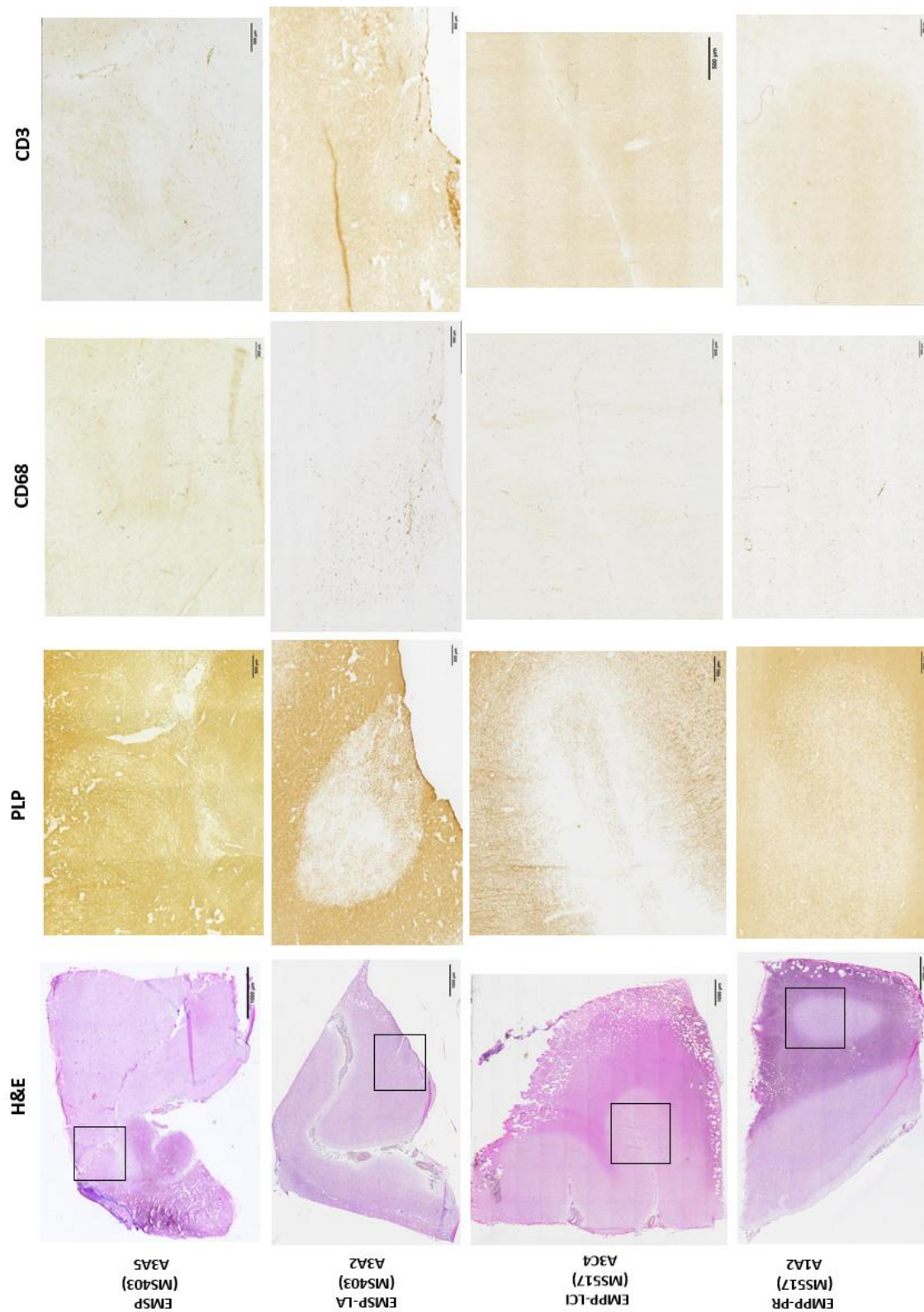
Muestra	Área de captura	Concentración Librería (ng/μL)	Concentración Librería sin dilución (ng/μL)	Longitud media de la librería (pb)	Profundidad de secuenciación (pares de lecturas)	Profundidad de secuenciación (total de lecturas)	Cantidad de librería (nM)
<b>C048</b>	V12M21-011_A1	3,383	33,83	460	12800000	257600000	111,413
<b>MS 341 (A4B4)</b>	V12M21-011_B1	4,519	45,19	458	188500000	377000000	149,503
<b>MS 403 (A3A2)</b>	V12M21-011_C1	3,825	38,25	417	131400000	262800000	123,049
<b>MS 403 (A3A5)</b>	V12M21-011_D1	3,649	36,49	455	157500000	315000000	121,502
<b>C064</b>	V12M21-055_A1	3,408	34,08	457	141550000	283100000	113,00
<b>MS 341 (A2B5)</b>	V12M21-055_B1	3,630	36,30	443	164400000	328800000	124,157
<b>MS 517 (A3C4)</b>	V12M21-055_C1	4,060	40,60	463	215000000	430000000	132,856
<b>MS 517 (A1A2)</b>	V12M21-055_D1	3,129	31,29	444	159350000	318700000	106,784



### ANEXO 3



**Figura 16. Detalle de la caracterización de las lesiones corticales.** Evaluación de los tejidos control (C048 y C064) y EMRR (MS341 A4B4 y A2B5 mediante histología utilizando la tinción con hematoxilina-eosina (4x) donde se indica la zona seleccionada para el desarrollo del protocolo de transcriptómica espacial e inmunohistoquímicas de la zona seleccionada a 10x para PLP, CD68 y CD3. Barra de escala imágenes panorámicas: 1000  $\mu$ m y zona de lesión: 500  $\mu$ m. CTRL: control; EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente; LCI: lesión crónica inactiva, H&E: hematoxilina- eosina; PLP: proteína proteolípídica.



**Figura 17. Detalle de la caracterización de las lesiones corticales.** Evaluación de los tejidos de EMSP (MS 403; A3A5 y A3A2) y EMPP (MS517; A3C4 y A1A2) mediante histología utilizando la tinción con hematoxilina- eosina (4x) donde se indica la zona seleccionada para el desarrollo del protocolo de transcriptómica espacial e inmunohistoquímicas de la zona seleccionada a 10x para PLP, CD68 y CD3. Barra de escala imágenes panorámicas: 1000  $\mu\text{m}$  y zona de lesión: 500  $\mu\text{m}$ . *EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva; EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva; LA: lesión activa LCI: lesión crónica inactiva, H&E: hematoxilina-eosina; PLP: proteína proteolipídica.*