

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Efecto de la sinucleína en la fisiología de células neuronales cultivadas en 3D en la enfermedad del Parkinson

Effect of synuclein on the physiology of 3D-cultured neural cells in Parkinson's disease

Autora

Laura Bueno Martínez

Directores

José Alberto Carrodegua Villar

José Manuel García Aznar

Instituto de Biocomputación y física de sistemas complejos (BIFI)

Curso 2020/2021

Agradecimientos

A mi madre, por escucharme, no con los oídos sino con el corazón. A mi padre, por haberme brindado la oportunidad de estudiar con la tranquilidad y suerte de saber que cuento con tu respaldo y apoyo incondicional; y a los dos, por estar en las buenas y las “no tan buenas”, porque malas con vosotros no hay. A mi hermano, por tus abrazos eternos y sinceros que me transmiten seguridad y confianza. Mención especial a mis abuelos y mi tía, pues aún a kilómetros de distancia, vuestro abrigo y cariño me siguen en todo momento, os quiero mucho yayos y tata. Lo hemos conseguido.

ÍNDICE

RESUMEN/ ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN/ANTECEDENTES	2
1.1. La enfermedad del Parkinson	2
1.1.1. Epidemiología.....	2
1.1.2. Patogenia.....	2
1.2. Proteína patológica en el Parkinson, la α -sinucleína	3
1.2.1. Estructura y localización.....	3
1.2.2. Función, papel e interacciones de la α -sinucleína	3
1.2.3. Malplegamiento y agregación de la α -sinucleína.....	4
1.2.4. Progresión de la enfermedad, propagación de la α -sinucleína en la enfermedad del Parkinson..	4
1.3. Terapias contra el Parkinson.....	5
1.4. Línea celular modelo, SH-SY5Y.....	5
1.4.1. Diferenciación de la línea SH-SY5Y.....	5
1.5. Cultivos tridimensionales. Microfluídica y μ -slides	6
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1. Cultivo celular de la línea SH-SY5Y	6
3.1.1. <i>Descongelación y mantenimiento de las células SH-SY5Y</i>	<i>6</i>
3.1.2. <i>Diferenciación de células SH-SY5Y a neuronas</i>	<i>7</i>
3.2. Crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota	7
3.2.1. <i>Crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y usando 100, 200, 400 y 800 células totales y 25, 50 y 100% ECM.....</i>	<i>7</i>
3.2.2. <i>Crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y a 200, 400, 800 y 1.600 células totales y 60 y 80% ECM8</i>	<i>8</i>
3.2.3. <i>Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y a 400, 800, 1.600, 3.200 y 6.400 células totales cultivadas en 30, 50% de matriz ECM y matriz colágeno.....</i>	<i>9</i>
3.2.4. <i>Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y a densidad celular 6.400 células totales cultivadas en 5, 10% de matriz ECM y matriz colágeno, en placa de 96 pocillos.....</i>	<i>9</i>
3.3. Chips de microfluídica	10
3.4. μ -slides	11
3.5. Tinciones con fluorocromos	11
3.6. Microscopía	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1. Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y en 2D vs 3D	12
4.1.1. <i>Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 100, 200, 400 y 800 células totales y 25, 50 y 100% ECM.....</i>	<i>12</i>
4.1.2. <i>Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 200, 400, 800 y 1.600 células totales y 60 y 80% ECM.....</i>	<i>12</i>
4.1.3. <i>Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 400, 800, 1.600, 3.200 y 6.400 células totales cultivadas en 30 y 50% de matriz ECM y matriz colágeno</i>	<i>14</i>

4.1.4.	<i>Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 6.400 células totales cultivadas en 5 y 10% de matriz ECM y matriz colágeno</i>	15
4.2.	Chips de microfluídica	16
4.3.	μ -slides	17
4.4.	Tratamiento de la línea celular con α -sinucleína	18
5.	CONCLUSIONES	22
6.	BIBLIOGRAFÍA	23
7.	ANEXOS	26
7.1.	Anexo 1. Crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota	26
	<i>Anexo 1.1 (cálculos del crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota a 100, 200, 400 y 800 células y 25, 50 y 100% ECM)</i>	26
	<i>Anexo 1.2 (cálculos, tablas resumen e imágenes esquemáticas del crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota a 200, 400, 800 y 1.600 células y 80% ECM)</i>	26
	<i>Anexo 1.3 (cálculos, tablas resumen e imágenes esquemáticas del crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota a 400, 800 y 1.600 células y 50% ECM)</i>	28
	<i>Anexo 1.4 (cálculos, tablas resumen e imágenes esquemáticas del cultivo en 3D de SH-SY5Y mediante gota a 3.200 y 6.400 células y 30% ECM y colágeno, respectivamente)</i>	28
	<i>Anexo 1.5 (cálculos y representaciones esquemáticas del crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y a 6.400 células totales y 5 y 10% ECM y matriz colágeno, respectivamente)</i>	30
7.2.	Anexo 2. Chips de microfluídica.....	32
	<i>Anexo 2.1 (volumen a tomar de cada flask para alcanzar una concentración final de $1 \cdot 10^6$ células/ml)</i>	33
	<i>Anexo 2.2 (g de ATRA 30 μM a añadir en el microchip)</i>	33
7.3.	Anexo 3. μ -slides.....	33
7.4.	Anexo 4. Crecimiento y diferenciación de la línea celular SH-SY5Y en 2D vs 3D.....	38
	<i>Anexo 4.1. (análisis del crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 100, 200, 400 y 800 células totales y 25, 50 y 100% ECM)</i>	38
	<i>Anexo 4.2. (estudio del comportamiento de la línea SH-SY5Y con 200, 400, 800 y 1.600 células totales y 60, 80% ECM)</i>	39
	<i>Anexo 4.3. (estudio de la viabilidad y comportamiento de la línea celular SH-SY5Y tras la irradiación o no con fluorescencia)</i>	40
	<i>Anexo 4.4. (análisis y comparación del comportamiento de la línea celular cultivada en matriz ECM 30% y matriz colágeno)</i>	40
	<i>Anexo 4.5. (estudio del crecimiento y diferenciación de la línea celular con 6.400 células totales cultivadas en matriz colágeno)</i>	41
	<i>Anexo 4.6 (tabla comparativa de todos los ensayos realizados para el estudio del crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y en 3D)</i>	41
7.5.	Anexo 5. Estudio del comportamiento de la línea celular SH-SY5Y en chips de microfluídica	42
	<i>Anexo 5.1 (estudio del comportamiento, crecimiento y morfología de las líneas celulares HeLa y SH-SY5Y)</i> .42	
7.6.	Anexo 6. Estudio del comportamiento de la línea celular SH-SY5Y en μ -slides (Ibidi) .	43
	<i>Anexo 6.1 (análisis del crecimiento de la línea celular SH-SY5Y cultivada en matrices ECM, diluida 1/10 y 1/20, y colágeno)</i>	43

<i>Anexo 6.2 (análisis del crecimiento y diferenciación de la línea celular SH-SY5Y cultivada en matriz colágeno)</i>	44
7.7. Anexo 7. Análisis del efecto de la adición de fibras de α -sinucleína	44
<i>Anexo 7.1 (efecto de la adición exógena de fibras de aSyn fusionada al fluorocromo Alexa FluorTM 488)</i>	44
7.8. Anexo 8. URLs y Códigos QR de los distintos vídeos que analizan el comportamiento de la línea celular SH-SY5Y	45

ABREVIATURAS

AFC	Adaptative Focus Control
aSyn	Alfa-sinucleína (Alpha-synuclein)
ATRA	All-trans retinoic acid
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CL	Cuerpos de Lewy
DIC	Differential interferential contrast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ECM	Extracelular matrix
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EP	Enfermedad del Parkinson
FBS	Fetal bovine serum
HeLa	Henrietta Lacks
IMC	Integrated modulation contrast
LB	Lewy bodies
MAM	Mitochondria-associated ER membranes
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NAC	Non Amyloid Component
NGF	Nerve growth factor
PD	Parkinson's disease
pH	Potencial de hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PKC	Protein-kinase C
ROS	Reactive oxygen substances
SNC	Sistema nervioso central
SNCA	SyNuClein Alpha
SNpc	Sustancia Negra pars compacta
TH	Tirosina Hidroxilasa
TPA	Tissue plasminogen activator
WT	wild type
2D	2 dimensiones
3D	3 dimensiones
6-OHDA	6-hydroxydopamine
Mutaciones	
A30P (Ala30Pro)	Ala: alanina, Pro: prolina
E46K (Glu46Lys)	Glu: ácido glutámico, Lys: lisina
H50Q (His50Gln)	His: histidina, Gln: glutamina
G51D (Gly51Asp)	Gly: glicina, Asp: ácido aspártico
A53T (Ala53Thr)	Ala: alanina, Thr: treonina
A53E (Ala53Glu)	Ala: alanina, Glu: ácido glutámico

RESUMEN/ ABSTRACT

La enfermedad del Parkinson (EP) es el trastorno neurológico degenerativo más común, después de la enfermedad del Alzheimer, cuya principal característica anatomopatológica es la presencia de agregados de α -sinucleína (aSyn), una proteína intrínsecamente desordenada presináptica, que desencadenará en la formación de fibrillas dando lugar a los cuerpos de Lewy (CL). La etiología y mecanismos patogénicos de la EP siguen sin comprenderse. Por tal motivo, resulta importante mejorar su conocimiento a partir de ensayos *in vitro*. Dado que las neuronas dopaminérgicas humanas son difíciles de obtener y mantener como células primarias, la investigación se realiza con modelos de células neuronales establecidos, como la línea celular SH-SY5Y. Las plataformas para cultivo celular bidimensional no recapitulan eficazmente los requerimientos espaciales esenciales para la organización e interacciones celulares que ocurren entre las células *in vivo*. La limitación del contacto célula-célula y la alteración de la señalización celular que ocurren *in vitro* puede resultar en grandes discrepancias entre la información obtenida en investigaciones *in vivo* e *in vitro*. Por tanto, el desarrollo de andamios tridimensionales puede facilitar el crecimiento celular en un macro y microambiente adecuados. En el presente trabajo, se procura comparar los resultados obtenidos en base a la diferenciación y comportamiento de la línea modelo en el cultivo en monocapa y tridimensional para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de las SH-SY5Y cultivadas en 3D. Así, para ello, se cultiva la línea en dispositivos, como chips de microfluídica y μ -slides, que permiten el estudio del efecto en la viabilidad, diferenciación y contactos célula-célula de la adición de fibras de α -sinucleína. Esto posibilita que las células se comporten de la manera en que lo harían en la porción compacta de la sustancia negra (SNpc) del mesencéfalo pudiendo determinar así, los efectos de la adición α -sinucleína de forma similar a la que ocurre *in vivo*.

Parkinson's disease (PD) is the most common degenerative neurological disorder, after Alzheimer's disease, whose most characteristic pathological finding is the aggregation of α -synuclein (aSyn), an intrinsically disordered presynaptic protein, which will trigger the formation of fibrils giving rise to Lewy bodies (LB). The etiology and pathogenetic mechanisms of PD remain poorly understood. For this reason, it is important to improve the knowledge from *in vitro* tests. Since human dopaminergic neurons are difficult to obtain and maintain as primary cells, the research is conducted with established neuronal cell models, such as the SH-SY5Y cell line. Two-dimensional cell culture platforms do not effectively recapitulate the spatial requirements essential for cellular organization and interactions that occur between cells *in vivo*. The limitation of cell-cell contact and the alteration of cell signaling that occur *in vitro* can result in large discrepancies between the information obtained in *in vivo* and *in vitro* investigations. Therefore, the development of three-dimensional scaffolds can facilitate cell growth in a suitable macro and microenvironment. In the present work, an attempt is made to compare the results obtained based on the differentiation and behavior of the model line in monolayer and three-dimensional culture to determine the optimal growth conditions of SH-SY5Y cultured in 3D. Thus, to do that, the line is cultured in devices, such as microfluidic chips and μ -slides, that allow the study of the effect on viability, differentiation, and cell-cell contacts of the addition of α -synuclein fibers. This enables the cells to behave in the way they would in the compact portion of the substantia nigra (SNpc) of the midbrain, thus being able to determine the effects of the α -synuclein addition more reliably and realistically to the one occurring *in vivo*.

1. INTRODUCCIÓN/ANTECEDENTES

1.1. La enfermedad del Parkinson

La enfermedad del Parkinson (EP) es el trastorno neurológico degenerativo más común, después de la enfermedad del Alzheimer. No es una enfermedad terminal a corto plazo, ya que los pacientes pueden vivir entre 15-25 años desde el momento del diagnóstico, lo que la convierte en una enfermedad crónica, a largo plazo. Fue descrita por el doctor James Parkinson en 1817. La EP parece ser el resultado de una complicada interacción de factores genéticos, responsables del 10% de los casos descritos, identificándose varios genes implicados entre los que destaca el gen que codifica la proteína α -sinucleína (aSyn), y ambientales, responsables del 90% restante, que afectan a numerosos procesos fundamentales.

Los síntomas principales de la enfermedad están relacionados con el sistema motor, aunque existen otros muchos asociados o secundarios. La muerte de las neuronas dopaminérgicas desencadena problemas motores como bradicinesia, rigidez muscular, temblor y alteraciones en la postura y forma de caminar, mientras que la pérdida de las terminaciones nerviosas está relacionada con problemas no motores, afectando a funciones automáticas y provocando, entre otros, pérdida del olfato, trastornos del sueño, depresión y ansiedad (1–4).

1.1.1. Epidemiología

La prevalencia y la incidencia de la EP varían ampliamente a lo largo del mundo. En general, en Europa y Estados Unidos, la prevalencia es más alta que en el resto de los países. Estas diferencias podrían deberse en parte a la mayor mortalidad por menores recursos económicos, habida cuenta de que el Parkinson afecta principalmente a personas de edad avanzada. Se estima que actualmente hay entre 7 y 10 millones de personas con EP en el mundo. En países industrializados la prevalencia en la población oscila entre el 0,3% y el 1% en sujetos mayores de 60 años, y alcanza el 3% en los de 80 años o más, con tasas de incidencia que varían entre 0,08 y 0,18 por 1.000 personas/año (5). Además de la edad, otro factor influyente es el sexo, habiendo mayor incidencia de la EP en hombres. La mortalidad no aumenta en la primera década después del inicio de la EP, pero aumenta a partir de entonces duplicándose eventualmente (6).

1.1.2. Patogenia

La EP está caracterizada por la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la porción compacta de la sustancia negra (SNpc) del mesencéfalo y se engloba dentro de las α -sinucleinopatías. En el sistema nervioso actúan dos neurotransmisores (dopamina y acetilcolina) que están en desequilibrio en esta enfermedad. Se produce un aumento colinérgico (acetilcolina) y disminución dopaminérgica (dopamina) (7).

El hallazgo anatomopatológico más característico de la EP es la agregación de la **α -sinucleína**, una proteína intrínsecamente desordenada abundante en las terminales neuronales presinápticas (8). La agregación desencadenará en la formación de fibrillas que darán lugar a los cuerpos de Lewy (CL), marcador histopatológico más característico (4). Estos CL se distribuyen por diferentes estructuras cerebrales como el núcleo olfatorio, corteza cerebral, troncoencéfalo, así como a lo largo del tubo digestivo. Los cuerpos de Lewy son inclusiones intracitoplasmáticas neuronales, compuestas mayoritariamente por α -sinucleína, que también aparecen en otras patologías como en el Alzheimer o demencia con cuerpos de Lewy (4,9–11).

La pérdida de las neuronas de la sustancia negra produce el agotamiento de la dopamina en el núcleo estriado y la cara dorsal del putamen (parte de los ganglios basales). El estriado está implicado en el control del movimiento a través de la proyección corticoestriada y regula dicho movimiento mediante una vía indirecta (inhibidora) y directa (activadora), las cuales se encuentran influenciadas por la dopamina procedente de la SNpc. Esto causa muchas de las manifestaciones motoras de la enfermedad de Parkinson (12). Además de la lesión distintiva en la sustancia negra, en la EP también puede producirse pérdida neuronal en otros sistemas no dopaminérgicos como el colinérgico, noradrenérgico e incluso el sistema vegetativo autónomo. La lesión degenerativa de múltiples sistemas neuronales da lugar a complejas alteraciones bioquímicas y fisiopatológicas que pueden explicar la heterogeneidad clínica de la EP (4,7).

1.2. Proteína patológica en el Parkinson, la α -sinucleína

Varias enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la presencia de agregados proteicos; en el caso de la EP, la principal proteína causante de estos agregados es la α -sinucleína. Recibe su nombre debido a que inicialmente se identificó en las vesículas sinápticas (sin) y en la membrana nuclear (nucleína) del órgano eléctrico del pez torpedo (8,13).

1.2.1. Estructura y localización

La α -sinucleína es una proteína intracelular neuronal pequeña compuesta por 140 aminoácidos y un peso molecular de 14.460 Da. Está codificada por el gen SNCA que se expresa en diversos tejidos. De ahí que las enfermedades relacionadas con la mala función de esta proteína afecten a todo el organismo (14,15). Pertenece a la familia de las sinucleínas que incluye, además, a la beta y gamma-sinucleína (16).

Es una proteína intrínsecamente desordenada en solución acuosa, aunque tiene capacidad de formar hélices alfa mediante la unión a lípidos cargados negativamente (16). En su estructura pueden distinguirse tres regiones, la región amino-terminal que contiene los 60 primeros residuos, es anfipática y está implicada en la unión de la proteína con lípidos. La parte central, formada por los residuos 61-95, es una región hidrofóbica denominada región NAC (non-amyloid component) que constituye el dominio de agregación. Por último, el extremo C-terminal está relacionado con la unión a calcio, la interacción con otras proteínas como tau e inhibición de la agregación (17).

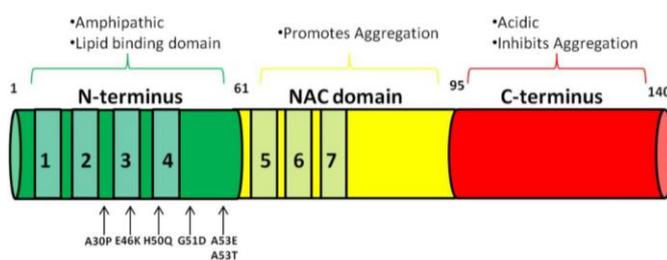


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la α -sinucleína. Se delimitan las regiones principales de la proteína (extremos C y N terminal y dominio NAC) con sus funciones. En el extremo N-terminal se representan las mutaciones más características de la enfermedad. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 5];2(2). Available from: /pmc/articles/PMC3281589/

La α -sinucleína se expresa preferentemente en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) principalmente en el núcleo estriado, neocortex, hipocampo, tálamo y cerebelo. Intracelularmente se localiza mayoritariamente en los terminales presinápticos, aunque también se ha confirmado su presencia en núcleo y mitocondrias. Se ha descrito también en otros órganos como el corazón y músculo esquelético (18).

1.2.2. Función, papel e interacciones de la α -sinucleína

Aún no se le ha podido asignar una función específica a la α -sinucleína. *In vitro*, se asocia a membranas de fosfolípidos o micelas de detergentes, por lo que se cree que sus funciones principales estarían

ligadas al transporte de vesículas en el citosol, ya sea entre retículo endoplásmico y distintos sacos del Golgi, la membrana plasmática y endo/lisosomas (19).

Dado que carece de un claro dominio transmembrana, la α -sinucleína depende de las repeticiones en el extremo N-terminal para la unión a membranas. Se ha visto que tiene preferencia por membranas con gran curvatura, como son las de las vesículas debido a su pequeño tamaño, y por determinados dominios ricos en colesterol tipo balsas lipídicas debido a la presencia de la parte hidrofóbica de la hélice alfa N-terminal de la α -sinucleína. No obstante, la interacción con las vesículas sinápticas parece ser débil y la proteína muestra gran movilidad comportándose como una proteína soluble (20–22).

Una de las características de las sinucleinopatías es la actividad deficiente de las mitocondrias. De hecho, una de las maneras de generar modelos de la EP es el uso de toxinas que inducen disfunción mitocondrial (13). Existe un grupo de 32 aminoácidos en la región N-terminal de la α -sinucleína que actúa de secuencia señal para su localización en la mitocondria donde se encuentra mayoritariamente en la membrana interna asociada al complejo I, cuya deficiencia en la sustancia negra, es responsable de la oxidación de las subunidades del complejo y el consiguiente aumento de la producción de ROS y daño oxidativo en la neurona (23). La α -sinucleína puede afectar, también, a la dinámica del citoesqueleto por una asociación con los microtúbulos (24).

1.2.3. Malplegamiento y agregación de la α -sinucleína

Generalmente las proteínas intrínsecamente desordenadas tienen una secuencia primaria que previene la agregación. En el caso de la α -sinucleína, la región NAC, más hidrofóbica, es la responsable de la agregación, pero en condiciones fisiológicas las cargas de los extremos terminales la estabilizan evitando que la proteína agregue (13). No obstante, este equilibrio puede ser alterado por cambios en el entorno, mutaciones o modificaciones postraduccionales. Alteraciones en el entorno como, por ejemplo, un pH más ácido (presentes en algunas localizaciones intracelulares, incluidos endosomas y lisosomas) promueve la agregación de la α -sinucleína como consecuencia de reacciones secundarias de nucleación mucho más rápidas (25). Por otro lado, fosforilaciones y glicosilaciones en varios residuos promueven, *in vitro*, la formación de fibrillas insolubles y variaciones en el extremo 3'-UTR del mRNA de la α -sinucleína están relacionadas con la EP. La metilación puede contribuir a la edad de inicio de la enfermedad ya que la expresión del gen SNCA depende de la metilación del intrón 1 de forma negativa (26,27). Así mismo, se han descrito al menos 6 mutaciones puntuales en la α -sinucleína relacionadas con sinucleinopatías hereditarias: A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T y A53E. Las dos mutaciones principales en la proteína, A53T y A30P, están relacionadas directamente con el Parkinson ya que aumentan la vulnerabilidad de las células al estrés oxidativo y la formación de agregados, siendo la mutación A53T la más comprometida (28,29). Se ha observado que esta agregación precede a la muerte celular. Primero se forman oligómeros, éstos dan lugar a fibrillas que más tarde se asocian para formar las fibras amiloides las cuales crecen rápidamente mediante la adición de monómeros (25).

1.2.4. Progresión de la enfermedad, propagación de la α -sinucleína en la enfermedad del Parkinson

En relación con la progresión de la enfermedad, la transferencia neurona-neurona en el cerebro es la responsable (la α -sinucleína transferida intercelularmente interactúa con la α -sinucleína citoplasmática propagando la enfermedad de forma similar a como lo hacen los priones) (30). La transmisión está mediada por procesos de endocitosis (sobre todo) o exocitosis, y la fracción transferida de α -sinucleína se encuentra en el compartimento lisosomal o endosomas. Es por ello por lo que los sistemas lisosomales y proteicos están relacionados con la formación de agregados proteicos (23,31).

Una ruta de entrada de la α -sinucleína malplegada en el cerebro es el **intestino**. Se ha definido el tracto gastrointestinal como un importante lugar de inicio de la agregación de α -sinucleína y el nervio vago como la ruta hacia el cerebro. Debido a la relación tan estrecha entre el intestino y el cerebro, el Parkinson puede provocar disbiosis de la microbiota del intestino y la expresión de α -sinucleína en el tracto gastrointestinal puede inducir infecciones (reflejando un mecanismo de defensa) (32).

1.3. Terapias contra el Parkinson

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son patologías que no tienen cura, o sea, no existe un tratamiento eficaz. No obstante, existen varias terapias prometedoras. De momento, solo se dispone de tratamientos sintomáticos, por ello, con el fin de desarrollar una terapia modificadora de la enfermedad verdaderamente eficiente, es fundamental mejorar el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares de la progresión y patogénesis de la EP.

1.4. Línea celular modelo, SH-SY5Y

Dado que las neuronas dopaminérgicas humanas son difíciles de obtener y mantener como células primarias, la investigación actual se realiza principalmente con modelos de células neuronales establecidos permanentemente, como la línea celular de **neuroblastoma humano SH-SY5Y**. Esta línea es una sublínea de la línea celular SK-N-SH que se estableció a partir de una biopsia de médula ósea de un neuroblastoma metastásico. Las SH-SY5Y pueden mostrar un fenotipo catecolaminérgico ya que tienen la maquinaria necesaria para sintetizar tanto dopamina como noradrenalina (actividad dopamina- β -hidroxilasa y tirosina hidroxilasa, en mayor medida) (33,34).

1.4.1. Diferenciación de la línea SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y se pueden diferenciar de un estado neuroblástico a neuronas humanas maduras por medio de una gran variedad de mecanismos que incluyen el uso de ácido retinoico, ésteres de forbol, cAMP, neurotrofinas específicas como BDNF... El uso de distintos métodos puede concluir en subtipos neuronales distintos como adrenérgico, colinérgico o dopaminérgico.

- Las células no diferenciadas están distinguidas morfológicamente por un fenotipo neuroblástico, no polarizado y ramificaciones cortas con una rápida proliferación. Estas células tienden a crecer en grupos. Se trata de neuronas catecolaminérgicas inmaduras.
- Las células diferenciadas se extienden mucho, contienen ramificaciones largas, disminuyen su proliferación; y, en algunos casos, están polarizadas.

Uno de los métodos de diferenciación mejor caracterizados es la adición de ácido retinoico (se suele usar el ácido all-trans retinoico: ATRA) al medio de cultivo. El ácido retinoico es un derivado de la vitamina A que posee propiedades inhibitorias del crecimiento y diferenciadoras. Además, promueve la supervivencia de las células SH-SY5Y ya que estas son menos vulnerables a la muerte inducida por agentes tóxicos. Este tratamiento está asociado con la inducción de un fenotipo colinérgico más que adrenérgico (33,35).

Una vez se han diferenciado las SH-SY5Y, un trabajo clave posterior es convertirlas en **modelos celulares** del Parkinson. Para ello, se han establecido varias estrategias basadas en tratamientos con drogas o aproximaciones genéticas a través de la manipulación de la expresión de genes de interés como la adición extracelular de variantes de α -sinucleína o la formación de variantes mutadas de α -sinucleína (A53T, A30P) que promueven la formación de agregados, ya que, una de las señas de identidad del Parkinson es la agregación de la α -sinucleína. Tanto las células diferenciadas como no diferenciadas son sensibles a la toxicidad inducida por α -sinucleína extracelular. Los componentes más usados en las

aproximaciones basadas en drogas son el MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium), la rotenona y el 6-OHDA (6-hidroxipamina) (33).

1.5. Cultivos tridimensionales. Microfluídica y μ -slides

Las plataformas bidimensionales no recapitulan eficazmente los requerimientos espaciales que son esenciales para la organización e interacciones celulares que ocurren entre las células *in vivo*. Es más, la limitación del contacto célula-célula y la alteración de la señalización celular que ocurren *in vitro* puede resultar en grandes discrepancias entre la información obtenida en investigaciones *in vivo* e *in vitro*. Por ello, el desarrollo de andamios tridimensionales puede facilitar el crecimiento celular en un macro y microambiente adecuado (36).

En los cultivos en 3D, la relación entre la superficie y el volumen aumenta a medida que disminuye el tamaño. Esto hace muy ventajoso el uso de **chips de microfluídica**, dispositivos usados para realizar reacciones químicas y separaciones con fluidos a escala de microlitros. El pequeño tamaño hace que sea favorable para que los microcanales capturen dianas como células y proporciona un amplio suministro de nutrientes y gases disueltos. Alternativamente, los campos eléctricos y magnéticos son más efectivos a distancias cortas, haciendo, por todo esto, la microfluídica ideal para la detección o señalización celular (37). Un sistema similar a los chips de microfluídica útil para experimentos de flujo y ensayos de células vivas son los **μ -slides** (Ibidi). Estos dispositivos son cámaras todo en uno en la que la distribución celular es homogénea sobre la superficie del canal, independientemente de las prácticas de manipulación, lo que permite el crecimiento celular óptimo tanto en 2D como en 3D (38). Las técnicas mencionadas proporcionan una ruta muy eficiente para personalizar el descubrimiento de fármacos a escala industrial.

2. OBJETIVOS

El objetivo central de este trabajo es el cultivo y diferenciación a neuronas de células SH-SY5Y tanto en 2D (puesta a punto) como en 3D. Para ello, se compara la diferenciación y comportamiento de la línea celular tanto en cultivo en 3D mediante gota, como en chips de microfluídica y μ -slides. Una vez se han determinado las condiciones óptimas de cultivo, las células se tratan con fibras de α -sinucleína extracelularmente, para determinar el efecto en la viabilidad, diferenciación y contactos célula-célula a partir de cocultivos celulares con células que sobreexpresan α -sinucleína fusionada a proteínas fluorescentes (Alexa FluorTM 488), junto a células que no la sobreexpresan.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo celular de la línea SH-SY5Y

Es importante trabajar en condiciones de esterilidad cuando se emplean cultivos celulares para evitar contaminaciones microbiológicas o el cruce entre distintas líneas celulares que es muy difícil de detectar. Así pues, toda la manipulación celular se lleva a cabo en cabinas de flujo laminar. Todos los materiales a utilizar para el manejo de los cultivos (material de vidrio, puntas de pipeta y microtubos) se esterilizan en el autoclave. Así mismo, el material empleado en la cabina se esteriliza previamente con etanol al 70%.

3.1.1. Descongelación y mantenimiento de las células SH-SY5Y

Las líneas celulares son genéticamente inestables y esta inestabilidad aumenta conforme crece el número de pases. Por ello, es imprescindible almacenar un stock de células congeladas en nitrógeno líquido (-196°C). Así, para utilizar un nuevo vial de células, es necesario descongelarlas. Este proceso de

descongelación es importante que se haga rápido ya que el DMSO, dimetilsulfóxido, (que se añade como crioprotector) es tóxico para las células a temperatura ambiente.

Para el mantenimiento de la línea celular SH-SY5Y (DSMZ ACC209) se han cultivado en frascos T de 25 o 75 cm² en función de los experimentos. A estas se les adiciona medio completo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; PAN-Biotech™) suplementado con suero fetal bovino 10% (FBS) y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) y suplementado con L-glutamina (2 mM). Se mantienen en un incubador de CO₂ para que el cultivo crezca en una atmósfera controlada, saturada con vapor de agua para evitar la evaporación del cultivo y con un 5% de CO₂ para regular el pH del medio. La temperatura se mantiene a 37°C, temperatura óptima para el crecimiento de estas células.

3.1.2. Diferenciación de células SH-SY5Y a neuronas

La diferenciación de la línea celular se realiza en placas de 6, 24 o 96 pocillos o en los chips de microfluídica o µ-slides. Para la diferenciación de las células se siembran junto con medio DMEM completo 10% FBS y pasadas 24/48 h, evitando que las células alcancen una confluencia alta, se cambia el medio a DMEM 5% FBS y 30 µM ATRA (Sigma-Merck R2625). Se reduce a la mitad el % de FBS para inducir el estrés de las células y favorecer su diferenciación, ya que, el FBS es un suplemento del medio de cultivo celular que favorece el crecimiento y adhesión celular. Posteriormente, se incuban las células en el incubador hasta el día 7 donde se vuelve a cambiar el medio por medio DMEM con 5% FBS y 30 µM ATRA.

3.2. Crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota

Una modificación del método de la gota colgante permite crecer las células en 3D de una manera mucho más rápida. Así, se puede probar distintas condiciones como número de células, cantidad de matriz, densidad, tipo de matriz a usar... para **determinar las condiciones más adecuadas para cultivar y diferenciar las SH-SY5Y**. El método de la gota colgante se trata de una técnica sencilla que consiste en crear gotas de una suspensión celular que provienen del cultivo en placa (2D) sobre la cara inferior de una superficie de vidrio o plástico. En cada gota así creada, las células se desplazan hacia el fondo de esta donde forman un agregado. En este caso, para evitar la formación de este agregado y facilitar que las células se dispersen en el interior de la gota se voltea la placa que soporta las gotas alternativamente varias veces durante la polimerización de la matriz.

Lo primero que se va a probar es una matriz con varios componentes, la matriz ECM (8-12 mg/ml) en DMEM, (Sigma E1270-5ML). La matriz extracelular (ECM) representa una red tridimensional que engloba todos los órganos, tejidos y células del organismo. Es el soporte estructural de las células y un andamio complejo compuesto por una variedad de moléculas biológicamente activas altamente reguladas. Estas moléculas son glucosaminoglicanos y proteoglicanos que resisten fuerzas compresivas, glicoproteínas adhesivas como laminina, y proteínas fibrosas que proporcionan resistencia a la tracción como colágeno y elastina (39). Además de la matriz mencionada, se elaboran experimentos en paralelo con matriz únicamente de colágeno (Corning 354236), para comparar el comportamiento de la línea celular.

3.2.1. Crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y usando 100, 200, 400 y 800 células totales y 25, 50 y 100% ECM

En una placa de 6 pocillos se colocan en cada uno 4 gotas, cada una con un número distinto de células (100, 200, 400 y 800) y una concentración determinada de matriz.

- Todas estas variables van por duplicado ya que las células están tratadas o no con ATRA.
- Se forman gotas de 10 μl que, aunque no cubren el pocillo por completo, es interesante porque así las células crecen tanto en 3D como en 2D pudiendo comparar su comportamiento.

Se diluyen las SH-SY5Y con medio DMEM 10% FBS para obtener una concentración final de 40.000 células/ml. Una vez obtenida esta densidad de células se toma el volumen que contiene cada cantidad de células indicada anteriormente. Esta cantidad se lleva a 4 tubos los cuales serán centrifugados y el pellet celular resuspendido en 50 μl de DMEM 10% FBS. En la tabla siguiente se muestran los volúmenes a tomar para alcanzar las distintas densidades celulares.

Tabla 1. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar las densidades determinadas.

Número de células totales a obtener	[] de cada gota (5 μl)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 40.000 células) para obtener las respectivas células
100 células	20 células/ μl	1.000 células	25 μl
200 células	40 células/ μl	2.000 células	50 μl
400 células	80 células/ μl	4.000 células	100 μl
800 células	160 células/ μl	8.000 células	200 μl

El cálculo de las distintas concentraciones de matriz requiere diluir la matriz ECM con DMEM 10% FBS en función del % a alcanzar.

- Para conseguir 100% ECM se toman directamente 5 μl de ECM
- Para conseguir 50% ECM se mezcla la misma cantidad de ECM que de DMEM 10% FBS
- Para conseguir 25% ECM se mezclan 6 μl de ECM+18 μl de DMEM 10% FBS

De estos 4 tubos, se toman 5 μl y se mezclan con 5 μl de matriz ECM a los distintos %, de esta forma se obtienen gotas de 10 μl con las cantidades de células indicadas precedentemente. *Precaución: realizar este procedimiento en frío, sino, la matriz polimeriza.* Se deja incubar durante 30 min volteando la placa cada 5-10 min. Se disponen en placas de 6 pocillos con cuatro gotas en cada pocillo. Se recubren los pocillos con medio DMEM 5%/10% FBS en función de si el medio es inductor de diferenciación o no y, algunos de ellos, con ATRA 30 μM para diferenciarse. *Para ver en detalle los cálculos realizados ver el apartado 7. Anexos, Anexo 1, sección Anexo 1.1.*

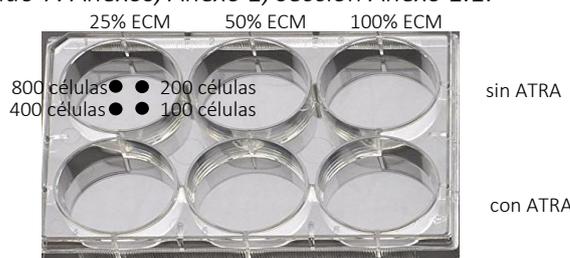


Figura 2. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 6 pocillos. En la parte superior se indica el % de matriz utilizado en cada columna. En la esquina derecha se representa la fila que ha sido tratada con ATRA. Cada punto hace referencia a la gota en la que se revela la densidad de células que contiene.

3.2.2. Crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y a 200, 400, 800 y 1.600 células totales y 60 y 80% ECM

Se quiere obtener ahora, una densidad de 80.000 células/ml en el vial de partida para las diluciones. Para ello, se sigue el mismo procedimiento mencionado en el apartado 3.2.1. teniendo en cuenta la nueva densidad a alcanzar. En este caso se utilizan placas de 24 pocillos, colocando dos gotas en cada pocillo, de forma que, una vez dispuestas las gotas en los pocillos, estos se recubren con medio DMEM 10% FBS que contenga células para que secreten factores de crecimiento y, algunos de ellos, con DMEM 5% FBS y ATRA 30 μM para diferenciarse. La adición de células para que secreten factores de crecimiento permite observar, en el mismo pocillo, las diferencias entre las células embebidas en la matriz y las que crecen en 2D. Se realizan dos experimentos en paralelo con concentraciones de matriz

60 y 80%. Para ver más en detallado los cálculos realizados y la disposición de las gotas, ir al apartado 7. Anexos, Anexo 1, sección Anexo 1.2.

3.2.3. Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y a 400, 800, 1.600, 3.200 y 6.400 células totales cultivadas en 30, 50% de matriz ECM y matriz colágeno

En una placa de 96 pocillos se dispone una gota por pocillo, cada una con un número distinto de células (400, 800 y 1.600) con 50% ECM. El fondo de los pocillos está recubierto con matriz ECM diluida 1:1 (15 μ l de medio+15 μ l de ECM) con medio completo DMEM 5%/10% FBS en función de si las células siguen un procedimiento de diferenciación o no. Esa capa inferior de ECM funciona como un colchón para impedir que las células se depositen en el fondo del pocillo y crezcan en monocapa. Se incuba durante 30 min en el incubador de CO₂ para dejar polimerizar la matriz. Sobre esta, se dispone la solución que contiene matriz ECM y SH-SY5Y (8 μ l de matriz ECM+8 μ l de células). Para obtener una densidad de 80.000 células/ml se sigue el mismo procedimiento mencionado en el apartado 3.2.1. De cada uno de los microtubos que contiene las distintas cantidades de células se toman 8 μ l y se mezclan con 8 μ l de matriz ECM. Se disponen en placas de 96 pocillos una gota por pocillo (no se usan todos los pocillos). Se recubren los pocillos con 100 μ l de medio DMEM 5%/10% FBS y, algunos de ellos, con ATRA 30 μ M para diferenciarse, como se muestra a continuación. Para ver más en detalle los cálculos realizados y la disposición de las gotas, ir al apartado 7. Anexos, Anexo 1, sección Anexo 1.3.



Figura 3. Esquema de uno de los pocillos de la placa de 96 donde se muestra el orden de las soluciones añadidas. Izda. Esquema de las soluciones añadidas en el pocillo que no ha sido sometido a diferenciación, no contiene ATRA. Dcha. Esquema de las distintas soluciones añadidas para el caso en que las células se someten a diferenciación, contiene ATRA.

Se realiza un experimento en paralelo en una placa de 96 pocillos donde se cultiva, por pocillo, 3.200 y 6.400 células SH-SY5Y y 30% ECM y matriz colágeno 1,5 mg/ml. La elaboración y cultivo de las gotas que contienen matriz ECM se lleva a cabo siguiendo los mismos pasos mencionados anteriormente, pero teniendo en cuenta que la gota, en este caso, contiene 8 μ l de matriz ECM +16 μ l de células.

Las gotas que contienen matriz colágeno siguen un protocolo distinto. Primero es necesario neutralizar el pH de la matriz, lo que se hace usando la cantidad apropiada de hidróxido sódico. La matriz de colágeno contiene además medio DMEM 10% FBS, por lo que, para la formación del fondo de los pocillos se adicionan directamente 30 μ l de la matriz. Para las gotas basta con reducir la cantidad de medio DMEM 10% FBS que contiene la matriz y sustituirlo por medio DMEM 10% FBS con SH-SY5Y a las densidades mencionadas. De esta nueva matriz se toman 24 μ l para formar las gotas que se recubrirán, una vez polimerizadas, con 100 μ l de DMEM 10% FBS. Los cálculos más detallados y explicados de la elaboración de la matriz de colágeno y el cultivo en 3D mediante gota, se encuentran en 7. Anexos, Anexo 1, sección Anexo 1.4. En este sentido, no se va a añadir ATRA a ninguno de los pocillos ya que únicamente se quiere comparar el crecimiento y comportamiento de la línea celular, no su diferenciación.

3.2.4. Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y a densidad celular 6.400 células totales cultivadas en 5, 10% de matriz ECM y matriz colágeno

Como último ensayo del cultivo de la línea celular en matriz ECM, se diluye la matriz 1/10 y 1/20 respectivamente, para determinar el crecimiento de las SH-SY5Y en matrices menos densas. Para realizar este experimento se siguen los mismos pasos mencionados en el apartado anterior, 3.2.3, que

hacen referencia a la matriz ECM, pero teniendo en cuenta que la gota, en este caso, contiene 20 μl totales. *La relación de volúmenes a añadir de ECM y SH-SY5Y varía en función del % de matriz a alcanzar.* Con respecto a la prueba en matriz colágeno, se sigue el mismo protocolo mencionado anteriormente para esta matriz (3.2.3), pero con la modificación de que, para este ensayo, se aplica un método de diferenciación. Un pocillo se recubre, una vez añadida la gota, con 100 μl de DMEM 10% FBS y, el otro, con 100 μl de DMEM 5% FBS+ATRA 30 μM . Para el cultivo en monocapa, se disponen las células directamente en el pocillo recubiertas con medio de diferenciación o no, según convenga. *Para más información sobre los cálculos realizados y representaciones gráficas esquemáticas del experimento, acceder a 7. Anexos, Anexo 1, sección 1.5.*

3.3. Chips de microfluídica

El dispositivo microfluídico permite usar soluciones que contengan células para estudiar su comportamiento. En este caso, es necesario que la concentración final a la que se encuentren las células sea alrededor de $1 \cdot 10^6$ células/ml. Se cultivan células HeLa y células SH-SY5Y. Además de la línea de interés, se cultivan células HeLa, ya que esta línea celular es muy resistente y sencilla de manejar, facilitando la puesta a punto del sistema. Así, se puede comparar el crecimiento de ambas líneas embebidas en el chip. Se determina el número de células iniciales (explicado con más detalle en el apartado 7. Anexos, Anexo 2, sección 2.1) de cada uno de los flask a emplear en el experimento para calcular el volumen necesario para alcanzar la concentración final requerida.

Una vez determinado el volumen a tomar, se montan los chips. Para ello, primero se añade DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline; PAN Biotech™ P04-36500) para lavar y enjuagar las células junto con rojo fenol para determinar el pH del microchip y asegurar que es el adecuado (en torno a 7). *En caso de que el pH se aleje del neutro se añade hidróxido de sodio para ajustarlo.* A continuación, se añade colágeno con puntas de baja adherencia y muy cuidadosamente para evitar la formación de burbujas que limitarían mucho la resolución. Se usa colágeno como matriz debido a su densidad y capacidad de atrapamiento de células en cultivos en 3D. Después, se adiciona DMEM 10% FBS o DMEM 5% FBS en función de si se aporta un medio para la diferenciación celular o no.

Para cargar los chips, se añaden las células a los pocillos de los extremos de forma rápida para evitar variaciones de temperatura.

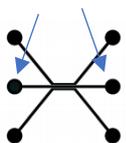


Figura 4. Esquema de un chip de microfluídica donde se indican los pocillos a cargar con las células (flechas). En el resto de los pocillos se añade la matriz de colágeno. Así, en la zona intermedia se alcanza un contexto adecuado que simula las condiciones in vivo para el crecimiento de las células. Chips de microfluídica. Overview - What is microfluidics? What is microfluidic chip? | uFluidix [Internet]. [cited 2021 Mar 22]. Available from: <https://www.ufluidix.com/resources/definitions/>

Para evitar la aglomeración de las células en un único plano, se incuban los chips y se voltean cada 5 min para asegurar la dispersión de las células por todo el pocillo. Por último, se añade a los 4 pocillos restantes DMEM 10% FBS que aporta los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células.

- Algunos tipos celulares se mueven dentro de la matriz ya que poseen proteasas que la van degradando y se desplazan dentro de ella.
- Las interacciones en los bordes de la matriz suelen ser distintas a las interacciones dentro de la matriz.

3.4. μ -slides

El dispositivo utilizado en el presente trabajo es el μ -slide VI 0.4 (Ibidi 80606). Se trata de una placa de 12 pocillos conectados dos a dos por seis canales, los cuales tienen una altura de 0,4mm. (40)

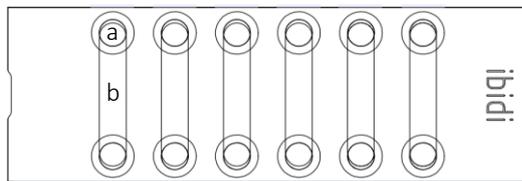


Figura 5. Configuración del μ -slide VI 0.4 donde se ilustran los 12 pocillos (a) conectados por los 6 canales (b). Las células se cultivan en la región del canal y los reservorios (pocillos) permiten el mantenimiento de las líneas celulares a través de la adición de medio completo, por ejemplo. Kim SB. Fabrication of bioluminescent capsules and live-cell imaging. *Methods Mol Biol.* 2014;1098:117–25.

Se cultivan células SH-SY5Y para estudiar las condiciones que permiten su crecimiento y diferenciación. Para la elaboración del experimento, se recubren los canales con la línea celular de estudio junto con matriz, ECM/colágeno según convenga, lo que permite el cultivo en 3D. Los reservorios se recubren con medio completo/medio de diferenciación que incluye SH-SY5Y para secretar factores de crecimiento y comparar, además, el cultivo en 3D de los canales con el cultivo en monocapa de los pocillos.

Estos dispositivos permiten el correcto crecimiento y diferenciación de la línea de estudio. Por ello, se realiza un último experimento donde se cotejan los efectos que tiene la adición de fibras de α -sinucleína marcadas con el fluorocromo Alexa FluorTM 488 (Invitrogen) en las SH-SY5Y tanto en su diferenciación, contactos célula-célula, como en su viabilidad. La α -sinucleína induce muerte celular. Este experimento, sin embargo, no permite determinar la causa de la muerte celular observada. Para comprobar si se mueren por la adición de la α -sinucleína o por fototoxicidad se realiza en paralelo un control sobre las SH-SY5Y crecidas en monocapa. *Para obtener más información sobre el procedimiento del experimento, acceder a 7. Anexos, Anexo 3.*

3.5. Tinciones con fluorocromos

El marcaje de las células, en el presente trabajo, con fluorocromos permite diferenciar mejor las ramificaciones celulares de las fibras de colágeno cuando estas están cultivadas en 3D con esta matriz (marcaje con **calceína** (Invitrogen C3100MP)), analizar el efecto de la adición exógena de α -sinucleína sobre la viabilidad, diferenciación y contactos célula-célula (marcaje con **Alexa FluorTM 488**) y la fototoxicidad producida por el fluorocromo **Hoechst 33342**. La α -sinucleína exógena está marcada directamente con el fluorocromo Alexa FluorTM 488. Por lo tanto, para visualizar el efecto de la adición de la proteína únicamente es necesario adicionar 1 μ l de las fibras marcadas (25 μ M) a las células a estudiar y hacer un lavado tras esperar 15 min (tiempo suficiente para que las células capten una cantidad adecuada de α -sinucleína para su visualización) con medio completo DMEM 10% FBS para mejorar el contraste. Las tinciones con Hoechst y calceína siguen el mismo protocolo mencionado anteriormente, pero, en estos casos, no es necesario lavar porque estos fluorocromos aumentan considerablemente su fluorescencia al unirse al DNA o al ser procesados por enzimas celulares, respectivamente.

3.6. Microscopía

La visualización, estudio y comparación de las células SH-SY5Y tras los tratamientos y técnicas realizadas se lleva a cabo con el microscopio Leica DMI6000 B (Leica Microsystems). Es la herramienta definitiva para grabaciones por intervalos de corta o larga duración (timelapse) combinadas con experimentos de multiposicionamiento, stacks en Z y fluorescencia multicanal, entre otros (41). El equipo está acoplado a una cámara que permite mantener las células a la temperatura y atmósferas adecuadas (37°C y 5% CO₂). Los ensayos *in vivo* se realizan gracias a la función que dispone el microscopio de timelapse que permite programar la adquisición de imágenes a determinados puntos temporales a diferentes

longitudes de onda, en distintas posiciones de la platina, en distintos planos Z y con distintos objetivos. Para la visualización y procesamiento de las imágenes fuera del microscopio se emplea el software Fiji, Image J. El dispositivo emplea un software para la toma y procesamiento de las imágenes, MetaMorph® Microscopy Automation and Image Analysis Software. Para más información sobre el microscopio acceder a <https://www.bifi.es/es/equipamiento-cientifico/#bioquimica> y <http://www.leica-microsystems.com/>.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para acceder y observar todas las imágenes y videos del presente trabajo ir al MEGA <https://mega.nz/folder/tbYFCaII#bqAHdCCtaW8qbb-5y8YxOq>.

4.1. Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y en 2D vs 3D

El estudio de las condiciones óptimas de crecimiento de la línea celular en 3D se realiza mediante pruebas de ensayo-error, a partir del crecimiento en gota mediante cultivo 3D, hasta determinar las condiciones más adecuadas para el posterior crecimiento y estudio de la línea en los chips de microfluídica y μ -slides a distintos tratamientos. Se basa en publicaciones en las que se han descrito experimentos similares, pero realizando la puesta a punto en el laboratorio y con los medios del mismo.

4.1.1. Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 100, 200, 400 y 800 células totales y 25, 50 y 100% ECM

Considerando las imágenes de la figura 6, la matriz es demasiado densa lo que impide el correcto desplazamiento e intercambio de nutrientes y factores de crecimiento entre las células y, por tanto, el adecuado crecimiento de las SH-SY5Y. Con respecto al número de células óptimo no se han observado diferencias notables entre las distintas gotas. Ninguna de las células, salvo casos concretos, ha adquirido la morfología particular de las células SH-SY5Y cuando crecen en monocapa. La mayoría de ellas alcanzan una morfología esférica, similar a la que obtienen cuando sufren muerte celular. De este modo, se efectúan otros experimentos con un rango de densidades mayor, para seguir estudiando las condiciones óptimas de crecimiento en la matriz ECM. Para obtener más información ir a 7. Anexos, Anexo 4, sección 4.1 y al Anexo 8, cultivo en 3D mediante gota, vídeo 1.1 que contiene la URL y código QR de un vídeo explicativo o ir directamente a https://drive.google.com/file/d/1O4QkocioAIn_0CKLxMhKVC6KrArHqPFSX/view?usp=sharing.

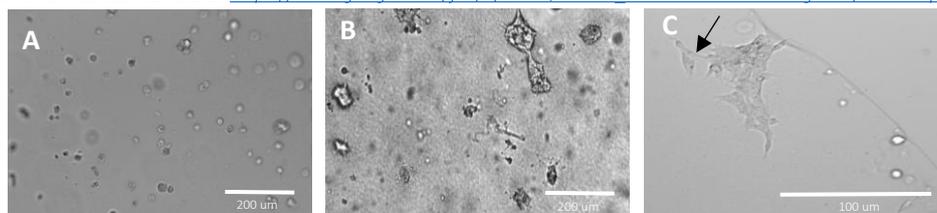


Figura 6. Células SH-SY5Y crecidas y diferenciadas mediante cultivo 3D en gota vistas en campo claro a 100 y 400 aumentos. A. Gota que contiene 800 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación (100X). B. Gota que contiene 400 células al 50% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación (100X). C. Gota que contiene 400 células al 25% de matriz ECM cultivada con medio de diferenciación (400X). Las células de la imagen B tienen una morfología más similar a la que adquieren estas células cuando crecen en monocapa, en comparación con la morfología adquirida en la imagen A. Esto indica que el % de matriz de la imagen A es demasiado elevado e impide el desplazamiento y crecimiento de las SH-SY5Y. Las células de la imagen C tienen una morfología más característica de la línea celular cuando crece en monocapa y parece que forman ramificaciones típicas de las células diferenciadas (flecha). En todos los casos las células tienden a formar grumos. Barra escalado: 200 μ m (A, B) y 100 μ m (C).

4.1.2. Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 200, 400, 800 y 1.600 células totales y 60 y 80% ECM

Atendiendo a las imágenes de la figura 7, las células que crecen fuera de la gota, en monocapa, tienen la morfología característica de las células SH-SY5Y y, al tratarlas con medio de diferenciación, adquieren

morfología de células diferenciadas. Sin embargo, las células que crecen en 3D, dentro de la gota, siguen teniendo morfología circular y no parecen responder a la adición de ATRA. Esto indica que la matriz sigue siendo demasiado densa en ambos experimentos. Por ello, se realizan otros ensayos disminuyendo el % de matriz. Además, se han medido las micras del enfoque más bajo y alto del campo Z de las imágenes E y F. Estos enfocan el borde inferior del pocillo (plano Z más bajo, 90 micras) y la última célula situada en el borde superior de la gota (plano Z más alto, 560 micras) pudiendo determinar así el grosor de la gota 0,46 mm. *Para obtener más información ir a 7. Anexos, Anexo 4, sección 4.2 y el vídeo explicativo mencionado a continuación.*

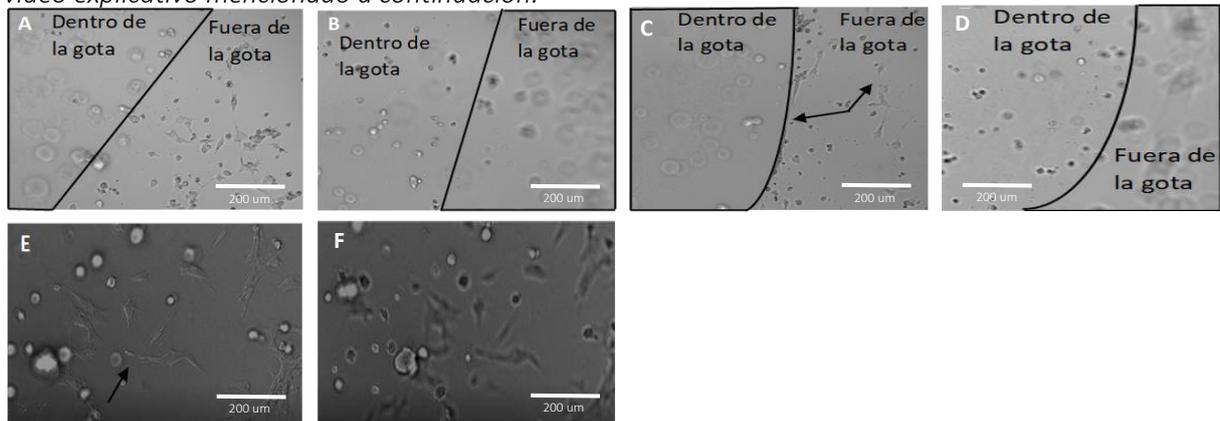


Figura 7. Células SH-SY5Y crecidas en monocapa (2D) y mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 aumentos en campo claro. A y B. Gota que contiene 1.600 células al 80% de matriz ECM cultivadas en medio DMEM 10% FBS. C y D. Gota que contiene 400 células al 80% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. E y F. Gota que contiene 1.600 células al 60% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. En las 4 primeras imágenes está marcada la zona de la foto que corresponde a la parte de fuera de la gota y la parte interior de la gota. Las imágenes A y B; y C y D, corresponden a la misma zona, respectivamente, pero con dos enfoques distintos en función de si se estudia el interior de la gota (imágenes B y D) o el exterior de la gota (imágenes A y C). Se puede apreciar muy bien el borde de la gota ya que cambia la morfología y el enfoque de las células. Los planos en los que se encuentran las células son distintos, ya que, fuera de la gota crecen en monocapa y dentro de la gota en 3D pudiendo alcanzar distintos planos Z. En algunos casos, imágenes E y F, sobre todo, se distinguen células que crecen en monocapa en planos Z superiores a las células que crecen en el interior de la gota. Esto puede ser indicativo de células que hayan quedado dispuestas sobre la gota, pero que crecen fuera de esta. Las flechas resaltan las ramificaciones características de las SH-SY5Y diferenciadas. Barra escalado: 200 μm.

Como prueba complementaria se añade el fluorocromo Hoechst 33342 (colorante fluorescente que permite la visualización de núcleos) a la placa de 24 pocillos que contiene las células SH-SY5Y cultivadas con 60% de matriz ECM. Los resultados del efecto de la fluorescencia se exponen seguidamente. Considerando las imágenes de la figura 8, se observa muerte celular por el uso del fluorocromo. Es decir, las células han muerto por fototoxicidad. Esto se distingue muy fácilmente ya que se forma una separación clara entre las células no sometidas a fluorescencia (células vivas) y las células vistas con fluorescencia, células muertas. *Para obtener más información ir a 7. Anexos, Anexo 4, sección 4.3 y al Anexo 8, cultivo en 3D mediante gota, vídeo 1.2 que contiene la URL y código QR de un vídeo explicativo o ir directamente a <https://drive.google.com/file/d/1rlDocM5YntpbjioCNYoeBLxEvHBF6DY/view?usp=sharing>.*

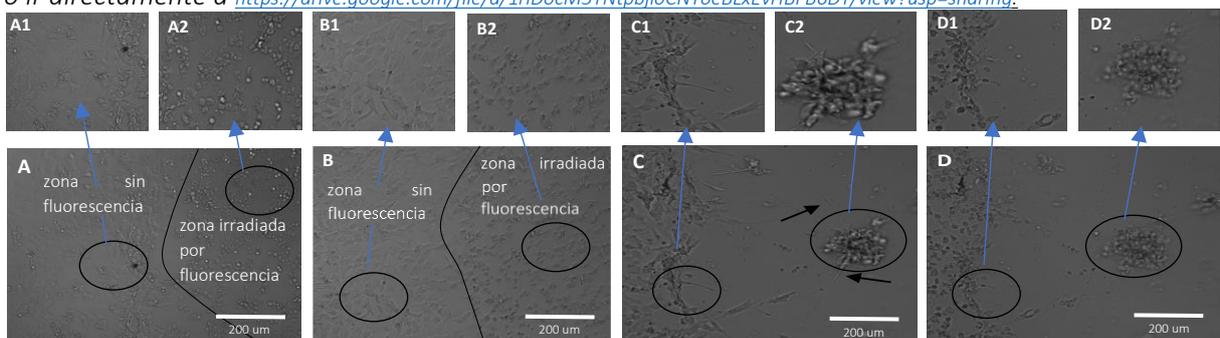


Figura 8. A y B. Células SH-SY5Y crecidas en monocapa (2D) y mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 aumentos en campo claro, junto con zooms de zonas representativas (círculos) tanto sin (A1 y B1) como irradiadas (A2 y B2) con fluorescencia. A. Gota que contiene 200 células al 60% de matriz ECM cultivadas con DMEM 10 % FBS. B. Igual que A, pero cultivadas en medio de diferenciación. En ambos casos se aprecia muy fácilmente (marcado con una línea negra) el límite de la fluorescencia ya que, a partir de este límite, las células son viables, tienen morfología característica de las SH-SY5Y. La zona irradiada por fluorescencia provoca la muerte celular cómo se puede apreciar en ambas imágenes por la morfología circular de las células. C y D. Sucesión de fotos del timelapse de la gota que contiene 200 células al 60% ECM cultivadas con medio de diferenciación irradiadas con fluorescencia vistas a 100 aumentos, junto con zooms de zonas representativas (círculos) de las mismas células, a distintos tiempos, cultivadas en 2D (C1 y D1) y 3D (C2 y D2). En la imagen C se observan pequeñas ramificaciones (flechas negras) que intentan formar conexiones entre la célula cultivada en 3D (derecha) y las células cultivadas en 2D (izquierda). Tras pocos minutos de exposición continua a la fluorescencia se observa, en el panel D, la muerte de prácticamente todas las células. Barra escalado: 200 μ m.

4.1.3. Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 400, 800, 1.600, 3.200 y 6.400 células totales cultivadas en 30 y 50% de matriz ECM y matriz colágeno

Debido a la alta densidad de la matriz que impide el correcto crecimiento de las células, se hace otro ensayo en placa de 96 pocillos con porcentajes de matriz menores, 50% y 30%. Además, se modifica el cultivo en 3D mediante gota con las indicaciones mostradas en el apartado 3.2.3. Con respecto a las gotas cubiertas con la matriz de colágeno, las dos últimas únicamente contienen la gota formada por las células SH-SY5Y y la matriz, recubiertas con medio DMEM 10% FBS. No disponen de una base de matriz de colágeno, así se compara su comportamiento. Atendiendo a las imágenes de la figura 9, se observa que la densidad de matriz ECM sigue siendo elevada lo que impide el correcto crecimiento y desarrollo de la línea celular. Por ello, se hace un último ensayo a una concentración muy baja de matriz ECM. Para asegurar que efectivamente la matriz ECM es adecuada para el cultivo 3D, se considera un ensayo adicional control con fibroblastos de ratón. Estos fibroblastos expresan numerosas proteasas que permiten el desplazamiento sobre esta matriz. De esta forma, se determina si efectivamente la matriz permite el desplazamiento de líneas celulares o no.

Sin embargo, si se contemplan las ilustraciones correspondientes al cultivo de la línea celular en matriz colágeno, se nota que las células alcanzan el fenotipo característico de las SH-SY5Y cuando crecen en monocapa, se desplazan correctamente por la matriz, forman interacciones... Es decir, las **condiciones de crecimiento y supervivencia, en este caso, son correctas**. Por ello, se suprime el ensayo control con fibroblastos, ya que, al observar el comportamiento de las SH-SY5Y en la matriz de colágeno, permite certificar que efectivamente, esta línea celular es capaz de crecer en 3D adecuadamente. *Para obtener más información acceder a 7. Anexos, Anexo 4, sección 4.4 y al Anexo 8, cultivo en 3D mediante gota vídeo 1.3 que contiene la URL y código QR de un vídeo explicativo o ir directamente a https://drive.google.com/file/d/1Ow1gy_5X34K5sLudAZE1Y0OVRGI9ipu1/view?usp=sharing.*

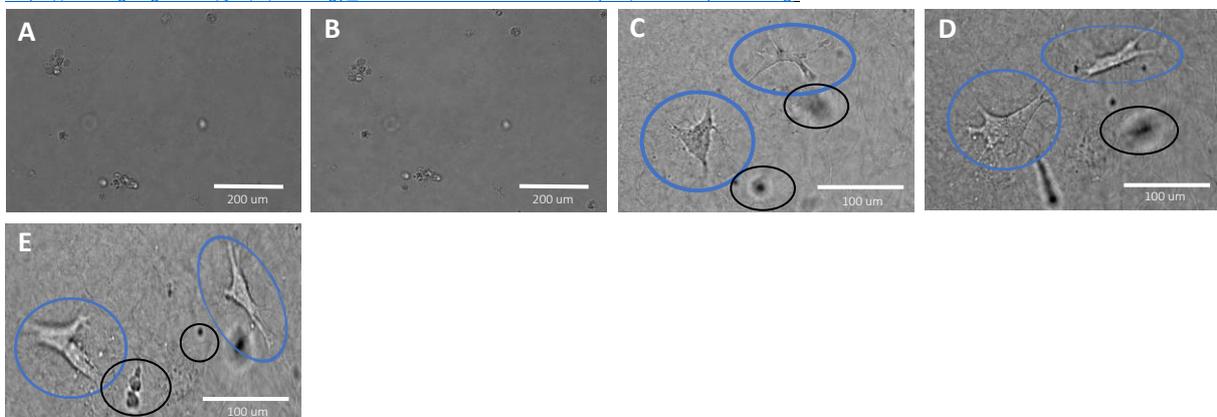


Figura 9. Células SH-SY5Y crecidas mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 (A, B) y 200 (C-E) aumentos en campo claro. Las imágenes corresponden a las gotas que contienen 6.400 células. A y B. Células cultivadas con matriz ECM al 30%. Sucesión de fotos del timelapse de 24 h. No se observan apenas diferencias entre ambas fotos lo que confirma que la densidad de la matriz sigue siendo demasiado elevada. La morfología de las células sigue siendo circular, inadecuada. C-E. Células cultivadas con matriz colágeno 1,5 mg/ml. Sucesión de fotos del timelapse de 24h donde se distinguen células que crecen en monocapa (círculos azules) y células que crecen en 3D (círculos negros). Barra escalado: 200 μ m (A, B) y 100 μ m (C-E).

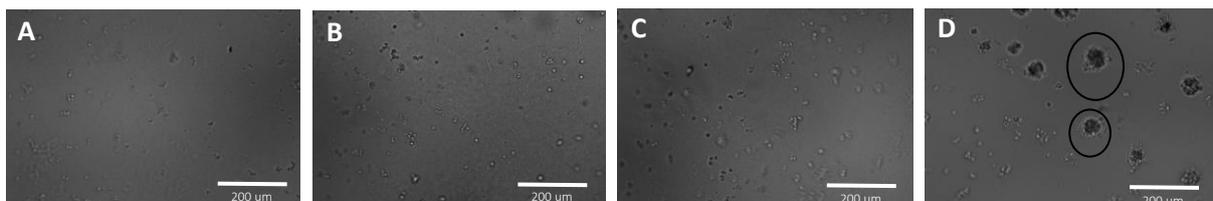
De estas imágenes se sacan 3 conclusiones en claro:

- La matriz colágeno permite el correcto desplazamiento y morfología de la línea celular
- Se forman interacciones entre las células
- La cantidad celular, 6.400 células, permite esta interacción celular

4.1.4. Crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 6.400 células totales cultivadas en 5 y 10% de matriz ECM y matriz colágeno

Como último ensayo con la matriz ECM se cultivan las células SH-SY5Y en ECM diluida 1/10 y 1/20, respectivamente. Así, al reducir la concentración de la matriz 10 y 20 veces más de la recomendada (1:2, ECM:SH-SY5Y) ⁴³ se determina si esta matriz es correcta y adecuada para el crecimiento de la línea de estudio. En el estudio anterior se han determinado las condiciones óptimas de crecimiento de la línea SH-SY5Y: SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno 1,5 mg/ml con 6.400 células totales. Por ello, se tratan estas células con medio de diferenciación para determinar y estudiar, en este caso, las condiciones de diferenciación de las SH-SY5Y en gota.

Considerando las imágenes de la figura 10, la matriz ECM sigue siendo demasiado densa (o presenta algún problema adicional) e impide el crecimiento, diferenciación y supervivencia de la línea celular en el cultivo en 3D en gota. Por ello, se termina descartando esta matriz para el estudio de la línea. Sin embargo, como se muestra en el panel D de la figura 10, si las SH-SY5Y crecen formando grupos, parece que su viabilidad mejora. Esto se observa en experimentos realizados *in vivo* donde dentro de la matriz se aprecia movimiento, aunque quedan confinadas en estos grupos. La matriz de colágeno, por el contrario, aporta las condiciones adecuadas de crecimiento e interacción. Con respecto a las SH-SY5Y que no han seguido ningún proceso de diferenciación (Fig 10, H e I), no se observan diferencias significativas entre las células vistas a distintos tiempos (24 y 72 h). Sin embargo, tras varios días (72h) induciendo la diferenciación de las SH-SY5Y se observa que conforme avanza el tiempo, las células comienzan a adquirir las características propias de células diferenciadas ya que dejan de proliferar y comienzan a formar neuritas (Fig 10, J y K). Adicionalmente se cultivan SH-SY5Y en monocapa a las que se les induce diferenciación. Estas células se toman como control para comparar el crecimiento y comportamiento de las células diferenciadas y sin diferenciar en 3D. *Para obtener más información acceder a 7.Anexos, Anexo 4, sección 4.5 y al Anexo 8, cultivo en 3D mediante gota videos 1.4.1, 1.4.2 y 1.4.3 que contiene las URLs y códigos QR de videos explicativos o ir directamente a <https://drive.google.com/file/d/162ZYLcyPthBXDV2xuH1zpnUUhOOGWo8A/view?usp=sharing>, <https://drive.google.com/file/d/1TbPxaFuAqI6MPHnGfMGZv4J8N60wixzI/view?usp=sharing>, <https://drive.google.com/file/d/1gRDmRF6bFyb-jhrsZAKClrGgLyHQqEA/view?usp=sharing>.*



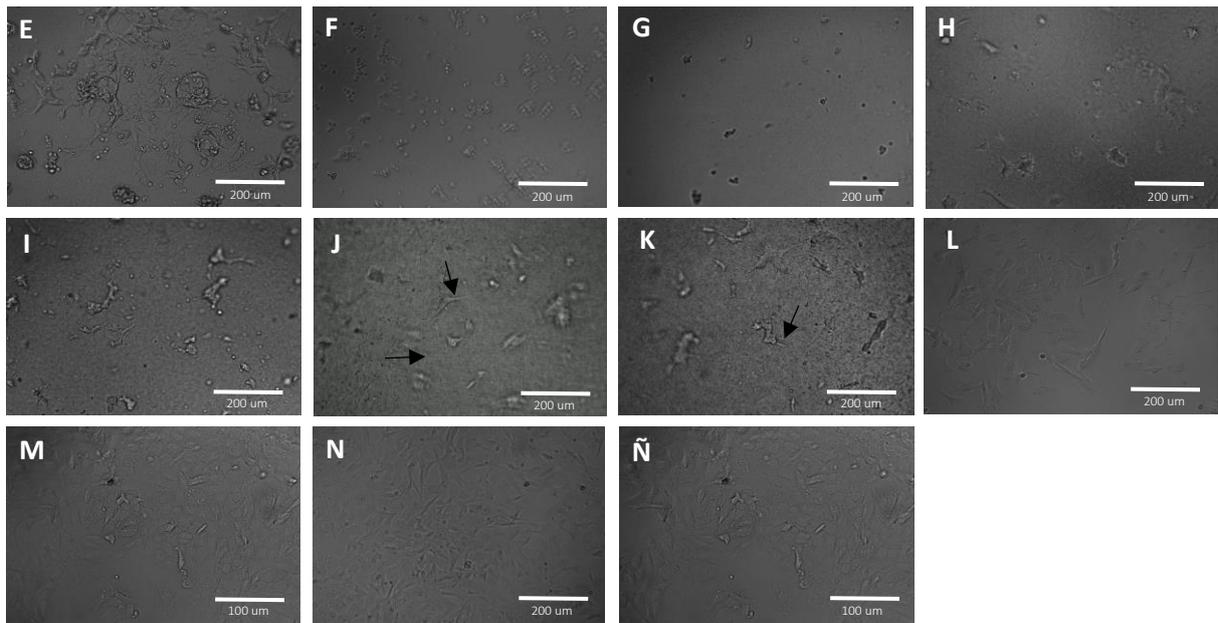


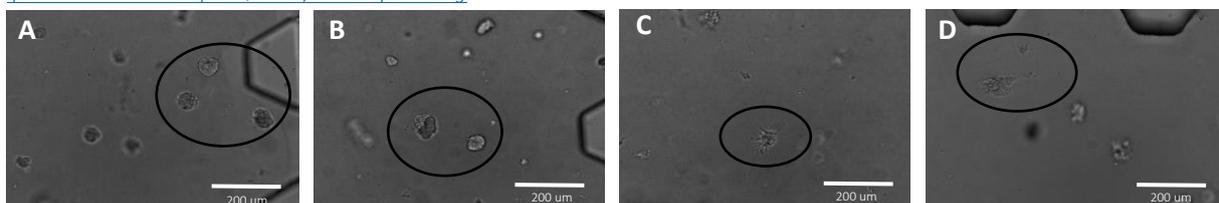
Figura 10. Estudio del comportamiento, crecimiento, viabilidad, diferenciación y contactos célula-célula de las células SH-SY5Y cultivadas en monocapa y 3D en matrices ECM y colágeno. A-G. Contraste del comportamiento y diferenciación de SH-SY5Y crecidas en matriz ECM diluida 1/10 y 1/20 respectivamente. A y B. Timelapse de 24h y stack planos Z (1 micra/plano Z) de SH-SY5Y cultivadas en matriz ECM 1/10 sin ATRA vistas a 100 aumentos. Estudio a las 24 y 72h, respectivamente. C. Timelapse de 24 h de SH-SY5Y cultivadas en matriz ECM 1/10 con ATRA vistas a 100 aumentos. Estudio a las 72h. D y E. Timelapse de 24h y stack planos Z (1 micra/plano Z) de SH-SY5Y cultivadas en matriz ECM 1/20 sin ATRA vistas a 100 aumentos. Estudio a las 24 y 72h, respectivamente. En el panel D se recalcan los grumos formados. F y G. Igual que D y E, pero con ATRA vistas a 100 aumentos. Estudio a las 24 y 72h, respectivamente. H- K. Cotejo del crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno. H e I. Timelapse de 24h, enfocado a 20 micras con respecto a la base del pocillo, y stack planos Z (1 micra/plano Z) de SH-SY5Y en colágeno sin ATRA vistas a 100 aumentos. Estudio a las 24 y 72h, respectivamente. J y K. Igual que H e I, pero con ATRA vistas a 100 aumentos. Estudio a las 24 y 72h, respectivamente. Las flechas distinguen las neuritas formadas en respuesta al tratamiento con ATRA. L- Ñ. Equiparación del crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y cultivadas en monocapa. L y M. Timelapse de 24h y stack planos Z (1 micra/plano Z) de SH-SY5Y en monocapa sin ATRA vistas a 200 aumentos. Estudio a las 24 y 72h, respectivamente. N y Ñ. Igual que L y M, pero con ATRA vistas a 100 aumentos y 200 aumentos, respectivamente. Estudio a las 24 y 72h, respectivamente. Barra escalado: 200 μm (todos los paneles excepto L, M y Ñ) y 100 μm (L, M y Ñ).

4.2. Chips de microfluídica

Considerando las imágenes de la figura 11, las SH-SY5Y crecen de forma aislada, pero con fenotipo completamente distinto al que adquieren cuando crecen mediante cultivo 2D. Se aprecian en algunos casos protrusiones lo que manifiesta que las células intentan desplazarse por la matriz para adquirir nutrientes y crecer, pero no se observa un movimiento significativo. Además, algunas crecen formando grumos (sobre todo aquellas células que no han sido tratadas con medio de diferenciación). Esto puede ser indicativo de que la matriz es demasiado densa (colágeno 4,3 mg/ml) e impide el crecimiento adecuado de esta línea celular. Por ello, se estudian las condiciones óptimas de la línea celular a partir del crecimiento en gota mediante cultivo en 3D como se ha ido mencionando en el apartado, 4.1. *Para ver el comportamiento de la línea celular HeLa y obtener más información acceder a 7.Anexos, Anexo 5, sección 5.1 y al Anexo 8, chips de microfluídica, vídeos 2.1 y 2.2 que contiene las URLs y códigos QR de vídeos explicativos o ir directamente a*

https://drive.google.com/file/d/1Ht_uADAx45k51a_nldknoze1Ujk8YPIO/view?usp=sharing,

<https://drive.google.com/file/d/1ZKrc-q71Dax604XiAwaSh90p9AQSvFOd/view?usp=sharing>.



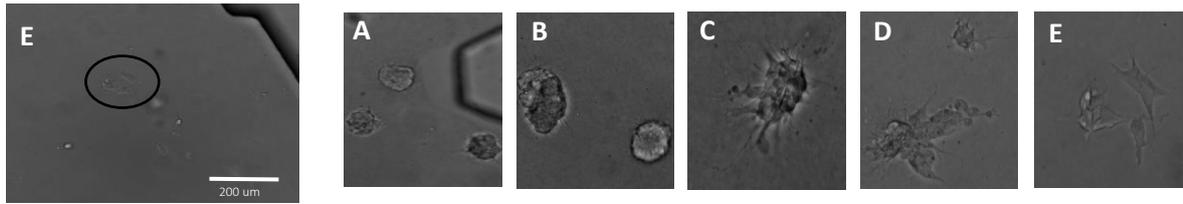


Figura 11. Sucesión de fotos del timelapse de 24h, junto con zooms de zonas distintivas (marcadas con círculos negros), de las células SH-SY5Y vistas en campo claro a 100 aumentos tratadas con y sin medio de diferenciación. Las imágenes corresponden a distintos planos Z donde se encuentran cada una de las células. A y B. Células SH-SY5Y cultivadas con medio DMEM 10% FBS enfocadas a 100 micras con respecto a la base inferior del chip. C-E. Células SH-SY5Y cultivadas con medio de diferenciación enfocadas a 80, 20 y 80 micras, respectivamente. Como se puede apreciar en algunos casos (figura E, sobre todo) la morfología de las SH-SY5Y es más similar a la que tiene esta línea cuando crece en monocapa en cultivo 2D. Barra escalado: 200 μm .

4.3. μ -slides

Considerando las ilustraciones de la figura 12, la matriz ECM sigue siendo demasiado densa, lo que impide el correcto crecimiento de la línea celular (Fig 12, A). Por ello, se termina descartando esta matriz para el estudio y cultivo de estas células, ya que, incluso con proporciones 10 y 20 veces más bajas que la recomendada (1:2, ECM:SH-SY5Y)⁴³ la densidad parece que sigue siendo demasiado elevada o puede haber problemas con la composición de la matriz. El colágeno, por el contrario, aporta las condiciones adecuadas para el crecimiento de las células ya que estas alcanzan una morfología adecuada e interaccionan entre sí (Fig 12). Por consiguiente, se realiza un segundo experimento únicamente con esta matriz e induciendo la diferenciación de las SH-SY5Y para determinar su comportamiento frente a este tratamiento. Con respecto a las SH-SY5Y crecidas en monocapa no se observa ningún cambio en especial. Crecen adecuadamente y alcanzan la morfología característica de esta línea (Fig 13). Las SH-SY5Y cultivadas en 3D con colágeno se han marcado fluorescentemente con el fluorocromo calceína que es capaz de atravesar la membrana celular y teñir las células por completo, para diferenciar mejor las ramificaciones de celulares de las fibras de colágeno. Para obtener más información acceder a 7. Anexos, Anexo 6, sección 6.1 y 6.2 y al Anexo 8, micro-slides vídeos 3.1 y 3.2 que contiene las URLs y códigos QR de vídeos explicativos o ir directamente a <https://drive.google.com/file/d/1fhFFGDlrzTXQacseBu1RyQewRzAReclF/view?usp=sharing> y <https://drive.google.com/file/d/15MnLUYmfCNgDNqu5eh0I7WB60kY7pl70/view?usp=sharing>.

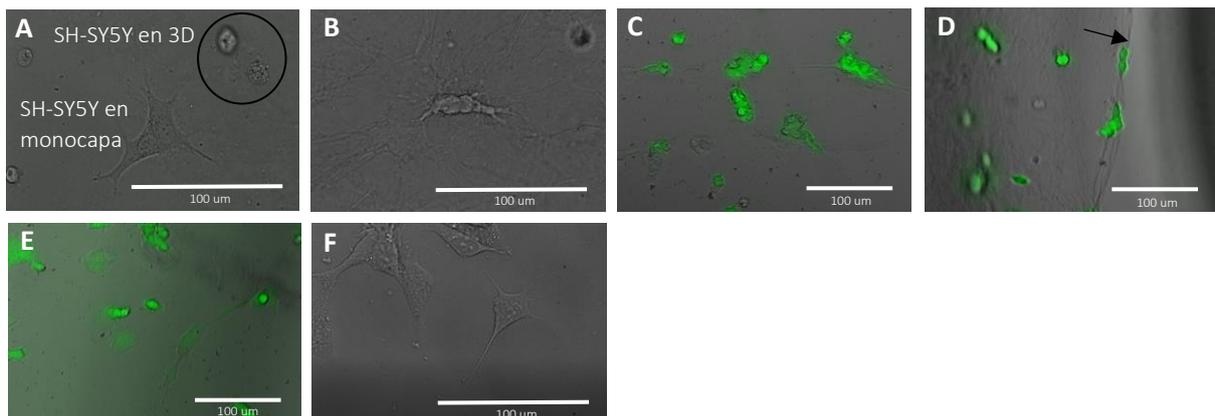


Figura 12. Análisis del comportamiento y crecimiento de la línea SH-SY5Y en matrices ECM y colágeno. El estudio se realiza a partir de stacks de planos Z (1 micra/ plano Z) y timelapses de 10 min. A. Stack plano Z de canal 1 (12.800 SH-SY5Y con matriz ECM 1/10) vistas a 400 aumentos en campo claro. B. Stack plano Z de canal 3 (6. 400 SH-SY5Y con matriz colágeno) vistas a 400 aumentos en DIC. C y D. Stacks planos Z de regiones representativas del canal 3 vistas a 200 aumentos con el fluorocromo calceína. La flecha marca el borde de la matriz. E. Stack plano Z de canal 4 (12.800 SH-SY5Y con matriz colágeno) vistas a 200 aumentos con calceína. F. Stack planos Z de canal 6 (12.800 SH-SY5Y en monocapa) vistas a 400 aumentos en campo claro. Barra escalado: 100 μm .

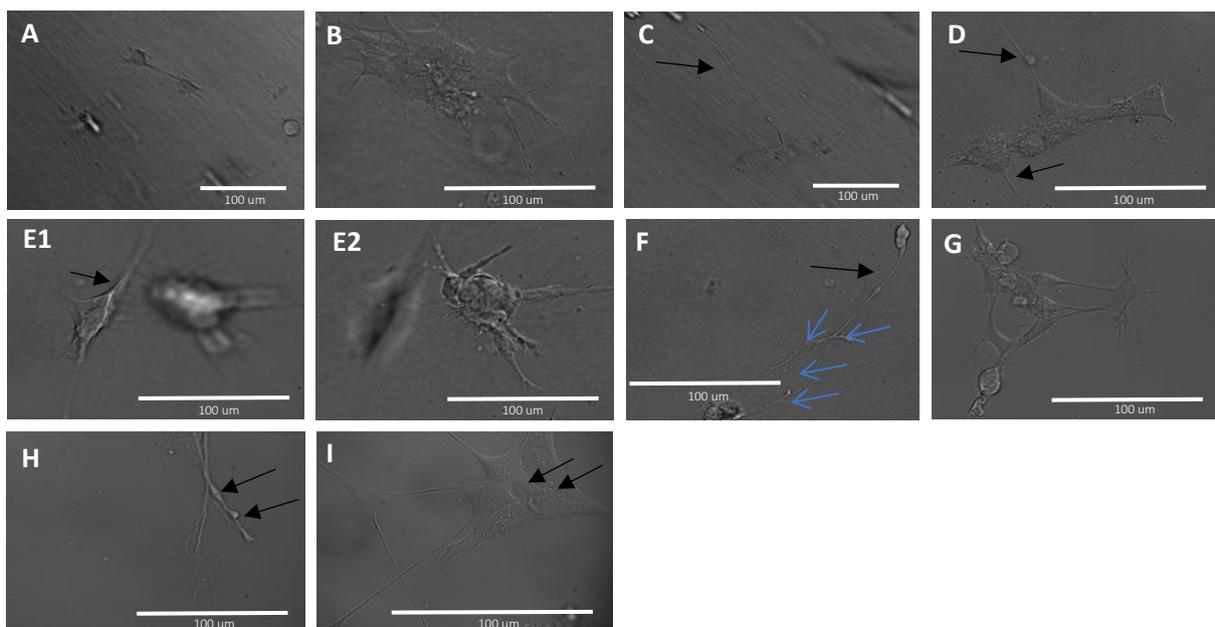


Figura 13. Estudio del crecimiento y diferenciación de las SH-SY5Y cultivadas en monocapa y 3D en matriz colágeno a partir de timelapses de 16h y stacks planos Z (1 micra/plano Z). A y B. Stack planos Z de regiones representativas del canal 1 (3.200 SH-SY5Y en colágeno sin ATRA). A. Vistas en IMC a 200 aumentos. B. Vistas en DIC a 400 aumentos. C-E. Stacks planos Z regiones representativas del canal 2 (3.200 SH-SY5Y en colágeno con ATRA). C. Vistas en IMC a 200 aumentos. D. Vistas en DIC a 400 aumentos. Las flechas resaltan las ramificaciones formadas. E. Misma región del canal con dos enfoques distintos (E1 y E2), vistas a 400 aumentos, lo que permite comparar el crecimiento de la célula que crece en monocapa (flecha negra) y la que crece en 3D (dcha.). Se aprecia que las neuritas de la célula que crece en monocapa (flecha negra) crecen en 3D ya que se enfocan en un plano superior (-1296,11 micras) con respecto a la célula (-1304, 02 micras). F. Stacks planos Z del canal 4 (6.400 SH-SY5Y en colágeno con ATRA) vistas en DIC a 400 aumentos. Se distingue una gran neurita (flecha negra) característica de células diferenciadas donde, además, se observan varios botones sinápticos (flechas azules). G. Stacks planos Z canal 5 (3.200 SH-SY5Y en monocapa sin ATRA) vistas en DIC a 400 aumentos. H e I. Stacks planos Z canal 6 (3.200 SH-SY5Y en monocapa con ATRA). H. Neurita con botones sinápticos (flechas negras) vista en DIC a 400 aumentos donde se observa conexión con otra SH-SY5Y situada debajo de ella. I. Vistas en DIC a 630 aumentos. Se diferencia que las células establecen conexiones entre sí ya que las neuritas que asoman de la SH-SY5Y de la derecha (flechas negras) no crean la bifurcación característica que se forma si provinieran de esa misma célula. Es decir, estas neuritas proceden de la SH-SY5Y situada a la izquierda, lo que recalca la

Analizando los resultados previos, se puede concluir que estos dispositivos permiten la diferenciación adecuada de las SH-SY5Y tanto en monocapa, como en 3D en matriz colágeno, ya que se observa formación de neuritas y botones sinápticos característicos de SH-SY5Y diferenciadas. Además, las células establecen conexiones entre sí, aunque no se puede afirmar que se formen contactos célula-célula, ya que, considerando las imágenes previas (Fig 13, H e I), parece que las células se cruzan y, aunque se tocan, podrían no estar estableciendo verdaderos contactos de tipo sinapsis. Por ello, se utilizan estas placas para determinar el efecto que tiene la adición de fibras de α -sinucleína marcada con el fluorocromo Alexa Fluor™ 488 sobre la viabilidad, diferenciación y contactos célula-célula.

4.4. Tratamiento de la línea celular con α -sinucleína

Teniendo en cuenta las imágenes de las figuras siguientes, se aprecia que una parte de la α -sinucleína se queda atrapada en las fibras de colágeno, ya que, al observar con el microscopio de fluorescencia, la matriz emite fluorescencia observándose las fibras claramente con el objetivo de 63 aumentos (Fig 14, B). No se observa ninguna fluorescencia emitida por las células ya que la intensidad irradiada por la α -sinucleína que se ha quedado pegada en la matriz (tras el lavado con medio completo) es mucho mayor por albergar, esta, una mayor concentración de proteína y, por tanto, oculta la emitida por las células. Atendiendo al panel C de la figura 14, se evidencia la necesidad del lavado de los pocillos una vez ha sido adicionada la α -sinucleína marcada, ya que esta tiene, de forma basal, mucha fluorescencia que, al endocitarse en las células no aumenta, por ello se forma tanto ruido. Además, en experimentos de

timelapse a tiempos cortos se distingue el movimiento de los endosomas que transportan las fibras de α -sinucleína. El proceso de endocitosis es mucho más eficaz en el soma neuronal que en las neuritas: las neuritas no captan eficazmente la α -sinucleína, por lo que no emiten fluorescencia (Fig 14, J y K). En general, se retraen las neuritas de las SH-SY5Y lo que indica que la α -sinucleína o la fluorescencia está afectándolas negativamente (Fig 14, H-I). Hecho que se confirma cuando se observa que, pasadas 3h desde la adición de las fibras, las células se mueren, aparentemente por apoptosis seguida de necrosis. Para determinar si las células se mueren por la adición de α -sinucleína o por fototoxicidad se realiza un ensayo en células crecidas en monocapa donde se comparan SH-SY5Y con y sin α -sinucleína exógena y vistas a fluorescencia y SH-SY5Y tratadas con α -sinucleína y vistas a campo claro (Fig 15). *Para obtener más información acceder a 7. Anexos, Anexo 7, sección 7.1 y al Anexo 8, micro-slides vídeo 3.3 que contiene la URL y código QR de un vídeo explicativo o ir directamente a https://drive.google.com/file/d/1dBDZWU1bvZwKz6o4duyQIEjOz1_1sZX/view?usp=sharing.*

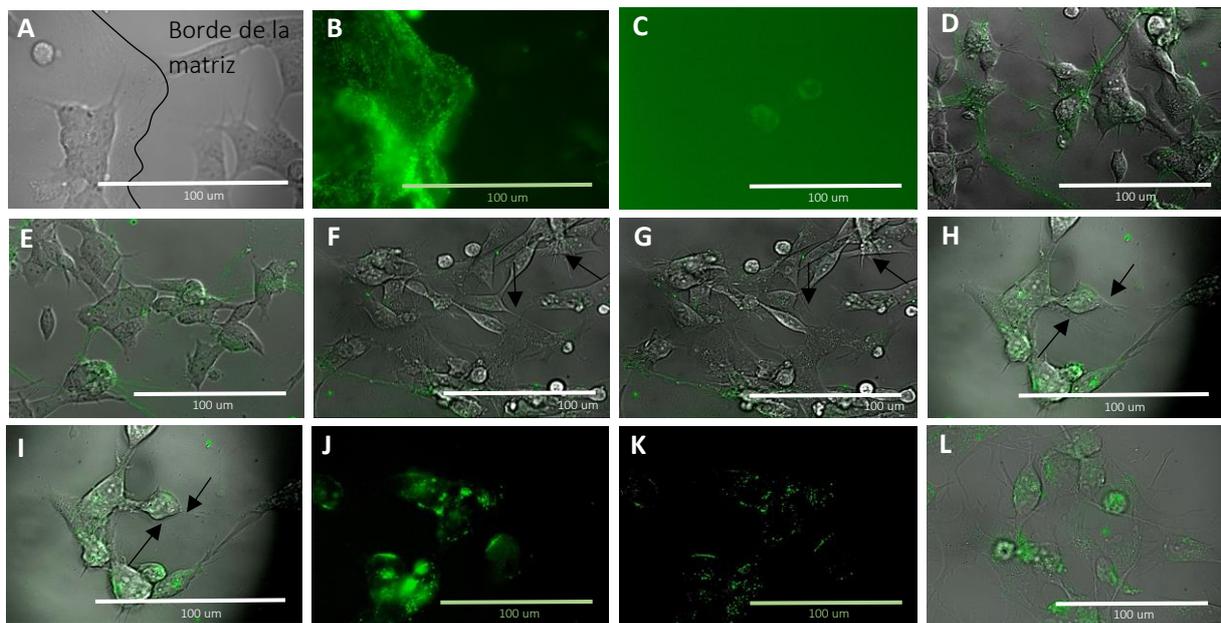


Figura 14. Efecto de la adición exógena de fibras de α -sinucleína fusionada al fluorocromo Alexa Fluor™ 488 en la viabilidad, crecimiento y contactos célula-célula en la línea modelo, SH-SY5Y. A y B. Fotos de la misma región del canal que contiene 6.400 SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno vistas a 630 aumentos en DIC (A) donde se aprecia el crecimiento en 3D de las células, y vistas con el filtro para GFP (B) con el cual se observan los lugares donde se dispone la α -sinucleína. C. Stack plano Z (1micra/plano Z) vistas a 400 aumentos del pocillo que contiene 6.400 SH-SY5Y cultivadas en colágeno previo al lavado con medio completo. D-I. Timelapses (10 min) y stacks planos Z (1 micra/plano Z) de SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno tras 30 min de la adición de α -sinucleína. D y E. Stack planos Z tras 10 y 15 min, respectivamente, del lavado del pocillo vistas a 400 aumentos en DIC y GFP superpuestas. F y G. Timelapse (10 min) tras 30 min del lavado del pocillo vistas a 400 aumentos en DIC y GFP superpuestas. F. Imagen a t= 2 min. G. Imagen a t=10 min. Se observan algunas neuritas que se retraen (flechas). H e I. Timelapse (10 min) tras 110 min del lavado del pocillo vistas a 630 aumentos en DIC y GFP superpuestas. H. Imagen a t=3 min. I. Imagen t=10 min. Se vuelve a apreciar retracción (flechas) lo que indican muerte celular. Las imágenes J y K hacen referencia a la edición de la imagen L (30.000 SH-SY5Y cultivadas en monocapa, tratadas con α -sinucleína durante 150 minutos, vistas a 400 aumentos en DIC y GFP superpuestas) aplicando un filtro estadístico primero, para eliminar el fondo (J) y deconvolución (K), posteriormente, para mejorar la claridad de la imagen. Se observa que la fluorescencia se distribuye sobre el soma neuronal, las neuritas no emiten fluorescencia (efecto que se distingue mejor en las imágenes J y K). Barra escalado: 100 μ m.

Las imágenes de la figura 15 corroboran que la muerte de las SH-SY5Y es debida a la fototoxicidad, no a la adición exógena de α -sinucleína. Se realizan ensayos de 20 min irradiando o no con fluorescencia las células SH-SY5Y Wild Type (WT) y SH-SY5Y tratadas con fibras de α -sinucleína marcada. Se observa que en aquellos pocillos que no han sido sometidos a fluorescencia, independientemente del marcaje con α -sinucleína, las células siguen vivas (Fig 15, A, B y D); mientras que los pocillos a los que se les ha sometido a fluorescencia, las células han sufrido procesos de muerte celular (Fig 15, C y E). Esta hipótesis

se confirma cuando al examinar los timelapses del experimento anterior se observa que las células sufren retracción de neuritas, “membrane blebbing” (característica de la apoptosis) y posteriormente liberación de contenido celular (característico de la necrosis) mientras se están realizando los vídeos, esto es, cuando se irradia con fluorescencia. Se concluye, por tanto, que la muerte observada de las células no se debe a la α -sinucleína, sino a la fototoxicidad. Esto no excluye que la α -sinucleína pueda afectar negativamente sobre la viabilidad de la línea modelo a tiempos más largos. Además, aparentemente, las células pierden las fibras de α -sinucleína o estas se degradan, ya que, al observar las células en GFP (“no mostrado”, puesto que, al no emitir fluorescencia no se distingue la imagen) no se observa ninguna fluorescencia emitida por las SH-SY5Y. *Para obtener más información acceder al Anexo 8, micro-slides vídeo 3.4 que contiene la URL y código QR de un vídeo explicativo o ir directamente a <https://drive.google.com/file/d/1CUwET6PmnUXvbtESqviObFqtSfs0u2fy/view?usp=sharing>.*

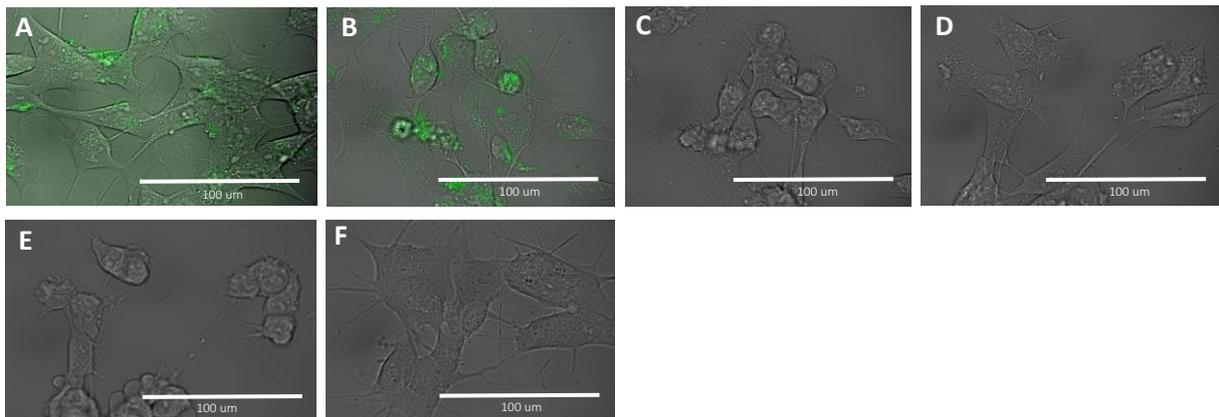


Figura 15. Estudio para determinar la causa de la muerte de las células SH-SY5Y en monocapa tratadas con y sin α -sinucleína y vistas a campo claro o fluorescencia. A. Pocillo 1 del dispositivo μ -slide que contiene 30.000 células tratadas con α -sinucleína. La imagen corresponde a las SH-SY5Y vistas a 400 aumentos en DIC y GFP superpuestas, tras 60 min de la adición de α -sinucleína sin irradiar fluorescencia durante 20 min. Se observa que las células mantienen un aspecto viable. B y C. Pocillo 2 del dispositivo μ -slide que contiene 30.000 células tratadas con α -sinucleína e irradiadas durante 20 min con fluorescencia. B. SH-SY5Y vistas a 400 aumentos en DIC y GFP superpuestas tras 150 min de la adición de α -sinucleína y a tiempo 0 de fluorescencia. C. SH-SY5Y vistas a 400 aumentos en DIC tras 170 min de la adición de α -sinucleína y 20 min con fluorescencia. Como se puede ver la fluorescencia ha provocado la muerte de las células ya que estas adquieren morfología característica de células en procesos apoptóticos y necróticos. D-F. Pocillo 4 que contiene 30.000 células irradiadas con fluorescencia durante 20 min. D. SH-SY5Y vistas a 400 aumentos en DIC tras 120 min de cultivo sin ser irradiadas con fluorescencia. E. SH-SY5Y vistas a 400 aumentos en DIC tras 20 min con fluorescencia. En ningún caso las células emiten fluorescencia, lo que es lógico, ya que no están tratadas con α -sinucleína. Igualmente, las SH-SY5Y terminan muriendo tras los 20 min en las que han sido irradiadas con fluorescencia. La muerte que se observa efectivamente se produce por fototoxicidad cuando al ver, en DIC, una zona anexa a las células que han sido vistas con fluorescencia, las células siguen viables (F). Barras escalado: 100 μ m.

Recopilación de datos y ampliación de la discusión de los resultados obtenidos. Se ha cultivado la línea modelo en 3D mediante gota utilizando las matrices ECM y colágeno para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de la línea y el posterior cultivo en dispositivos que facilitan el crecimiento celular en un macro y microambiente adecuado tanto en 2D como en 3D (chips de microfluídica y μ -slides). Ver Anexo 4, sección 4.6, Tabla A17.

Previamente, otros grupos (Agholme et al, 2010⁽⁴²⁾), (Dwane et al, 2013⁽⁴³⁾) han informado que el cultivo tridimensional de células SH-SY5Y en gel de matriz extracelular (ECM) tiene efectos de diferenciación neurológica con características morfológicas y bioquímicas de neuronas maduras. Sin embargo, en el presente trabajo no se ha conseguido que las células proliferasen adecuadamente en esta matriz. Se ha reducido la concentración de la matriz hasta 10 y 20 veces más de la recomendada por si el efecto fuese debido a una mayor concentración del stock que la utilizada por los citados autores, sin resultados positivos. La matriz debería ser la misma utilizada por ellos, aunque la casa comercial que la suministra

ha cambiado, por lo que no se sabe si la composición sigue siendo la misma o si ha habido algún problema con el lote que se ha usado.

La matriz ECM está formada principalmente por laminina, colágeno y fibronectina, mientras que la otra matriz utilizada incluye únicamente uno de estos componentes, el colágeno. La laminina y fibronectina son glicoproteínas adhesivas que se unen al colágeno, heparina, otras proteínas de fibronectina e integrinas de la superficie celular. Estas interacciones forman un entramado cohesionado que permite la adherencia de células a la matriz extracelular (44). Precisamente esta cohesión puede ser la responsable de la densidad inadecuada de la matriz que impide el correcto crecimiento de la línea modelo. Esta hipótesis se refuerza cuando se observa (Fig 10, D) que la viabilidad de la línea mejora cuando las células crecen formando grumos. Los contactos célula-célula en condiciones no óptimas pueden facilitar la supervivencia de estas células agrupadas unido a la presencia local de factores de crecimiento de las propias células antes de que difundan.

Las estrategias de cultivos tridimensionales (*Labour et al, 2012*⁽⁴⁵⁾) han determinado que la matriz de colágeno aporta las condiciones adecuadas para el crecimiento, viabilidad y contactos célula-célula. Es interesante mencionar que la concentración previamente establecida de matriz a utilizar (4,3 mg/ml) impide el adecuado crecimiento de la línea. El experimento realizado en los chips de microfluídica concluye que las células cultivadas a esa densidad alcanzan un fenotipo completamente distinto al que adquieren cuando crecen en monocapa y forman numerosas protrusiones en todas las direcciones del campo, no solo en el plano del soporte de cultivo; por lo que, en contraposición con los resultados obtenidos en la matriz ECM, aunque esta matriz sea densa, las células responden a ella con la formación de estas protrusiones. La concentración final a emplear (1,5 mg/ml) aporta un contexto propicio para el crecimiento e interacción. La diferencia entre las densidades de las dos matrices utilizadas es la concentración final de matriz. El colágeno es la principal proteína estructural que crea un armazón que actúa como sostén para los tejidos y resiste las fuerzas de tensión mecánica. Se organiza formando fibras, principalmente, que son más elásticas en contraposición con el entramado cohesionado formado por la acción conjunta de la laminina y fibronectina. Es por esta razón que la línea modelo es capaz de crecer y desplazarse más libremente en este caso (46). Hecho que se recalca cuando se disminuye la densidad de la matriz utilizando un menor porcentaje de la misma en el medio de cultivo. Es más, esta matriz proporciona un ambiente más favorable para la diferenciación de la línea modelo ya que se observa que esta es más significativa en las células cultivadas en 3D en los μ -slides de Ibidi que en las células cultivadas en monocapa lo que respalda la importancia del cultivo en 3D (Fig 13). Esta hipótesis se ha observado en los experimentos realizados a lo largo del presente trabajo, a falta de un análisis exhaustivo que se podría determinar estadísticamente comparando, por ejemplo, el número de protrusiones formadas en células cultivadas en 2D y 3D.

Se han realizado ensayos para determinar el efecto de la adición de fibras de α -sinucleína sobre la viabilidad, crecimiento y contactos célula-célula en la línea modelo cultivada en 3D en matriz colágeno mediante μ -slides que evidencian la interacción entre la proteína y las fibras de colágeno. La α -sinucleína es una proteína ácida cargada negativamente ya que tiene un $pI=4,67$ que interacciona con otras proteínas a través del dominio C-terminal (47). El colágeno contiene, mayoritariamente, el aminoácido no polar glicina (aminoácido polar sin carga), prolina e hidroxiprolina y el aminoácido cargado positivamente arginina (48). La carga neta, por tanto, de esta molécula es positiva. Las fuerzas electrostáticas entre cargas de signos opuestos son de atracción, lo que explica la interacción que se observa entre la proteína y el colágeno (Fig 14, B). El colágeno, a pesar de tener carga neta positiva, está

formado por varios aminoácidos sin carga; por ello, cabe esperar que además de producirse interacciones electrostáticas entre ambas moléculas pueda haber también interacciones de Van der Waals.

Igualmente, otros experimentos prueban que el proceso de endocitosis es mucho más eficaz en el soma que en las neuritas. El soma o cuerpo celular está definido como la parte central y principal de todas las neuronas, en la cual se encuentra el núcleo y la mayor parte del citoplasma con sus orgánulos. Las neuritas son proyecciones del soma neuronal que se conectan con las de otras neuronas mediante la sinapsis neuronal con el fin de transmitir señales entre neuronas (49). El proceso de endocitosis es un mecanismo clave por el cual las células introducen distintas moléculas englobándolas en una invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citosol (50). Las proteínas de membrana que participan en la endocitosis se concentran sobre todo en el soma para permitir que las que participan en la transmisión del impulso nervioso se concentren en las neuritas. Por ello, al albergar el soma una mayor cantidad de proteínas implicadas en la endocitosis, el proceso de endocitosis será más eficaz en este compartimento.

La muerte celular de las SH-SY5Y es debida a la fototoxicidad, no a la adición exógena de α -sinucleína (Fig 15, C). La apoptosis se observa debido al “membrane blebbing” que ocurre en la membrana plasmática en donde la célula, tras compactarse el núcleo debido a la condensación de la cromatina, comienza a fragmentarse en los llamados cuerpos apoptóticos cada uno con su membrana. En este caso, la membrana plasmática mantiene su integridad y permeabilidad, impidiendo la liberación del contenido celular, a diferencia de la otra muerte celular que se observa que ocurre al cabo de poco tiempo, necrosis. En la necrosis se produce la entrada de agua en la célula haciendo que esta se hinche y se vierta el contenido celular al medio extracelular produciendo inflamación en el tejido circundante. Para afirmar esta hipótesis se podrían hacer ensayos adicionales donde se estudia la traslocación de la fosfatidilserina de la monocapa interna de la membrana plasmática a la externa (característica de la apoptosis) con anexina marcada fluorescentemente combinada con yoduro de propidio que marca únicamente las células cuya membrana está dañada (característico de la necrosis). Así mismo, tras la irradiación continua con fluorescencia durante 20 min, parece que las fibras de α -sinucleína se terminan degradando, ya que al observar las células en GFP (Fig 15, C vista en DIC) no se observa ninguna fluorescencia. Sin embargo, la falta de fluorescencia no debería ser solamente por la degradación de la α -sinucleína, ya que el fluorocromo debería seguir emitiendo. Por tanto, puede ser debido a la acción conjunta de la degradación de la proteína y la difusión del fluorocromo por la pérdida de la integridad celular haciendo que este salga de la célula y se diluya por el medio.

5. CONCLUSIONES

- El cultivo tridimensional de la línea modelo a partir del cultivo en matriz ECM no aporta las condiciones de crecimiento y supervivencia necesarias, mientras que el cultivo en 3D de la línea modelo en uno de los componentes de la matriz ECM, el colágeno (1,5 mg/ml), es adecuado para el crecimiento, viabilidad, contactos célula-célula y diferenciación.
- Los dispositivos que mejor permiten el estudio y caracterización del comportamiento de la línea modelo cultivada en 3D son los μ -slides de Ibidi. Además, propician una buena diferenciación de la línea, mejor incluso que cuando lo hacen en monocapa, y permiten la observación de las células a alta resolución con el objetivo de inmersión.

- La α -sinucleína interacciona “posiblemente de forma electrostática” con las fibras de colágeno, quedándose atrapada en ella y el proceso de endocitosis de la α -sinucleína y, por tanto, la endocitosis en general es mucho más eficaz en el soma celular que en las neuritas.
- La retracción de neuritas y la muerte celular se deben a la fototoxicidad, no a la adición exógena de α -sinucleína. En definitiva, la muerte celular a tiempos cortos (hasta 72 horas tras exposiciones a fluorescencia continua durante minutos) de la línea modelo se produce por la fototoxicidad, no por la adición de α -sinucleína. Esto no descarta, sin embargo, que la α -sinucleína pueda afectar negativamente sobre la viabilidad de la línea a tiempos mayores.
- The three-dimensional culture of the model line from the culture in the ECM matrix does not provide the necessary growth and survival conditions, while the 3D culture of the model line in one of the components of the ECM matrix, collagen (1.5 mg/ml), is suitable for growth, viability, cell-cell contacts and differentiation.
- The devices that allow the best study and characterization of the behavior of the model line grown in 3D are the Ibidi μ -slides. In addition, they favor a good differentiation of the line, even better than when using monolayer, and allow the observation of cells at high resolution with the immersion objective.
- α -synuclein interacts "possibly electrostatically" with collagen fibers, becoming trapped in it and the process of endocytosis of α -synuclein and, therefore, endocytosis itself is much more efficient in the cell soma than in the neurites.
- Neurite retraction and cell death are due to phototoxicity, not exogenous addition of α -synuclein. In short, cell death at short times (up to 72 hours after exposures to continuous fluorescence for minutes) of the model line is caused by phototoxicity, not by the addition of α -synuclein. This does not rule out, however, that α -synuclein may negatively affect the viability of the line at longer times.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Goetz CG. The history of Parkinson’s disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2011 Sep [cited 2021 Mar 5];1(1). Available from: /pmc/articles/PMC3234454/
2. Kalia L V., Lang AE. Parkinson’s disease [Internet]. Vol. 386, The Lancet. Lancet Publishing Group; 2015 [cited 2021 Mar 5]. p. 896–912. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673614613933/fulltext>
3. Parkinson’s disease [Internet]. [cited 2021 Mar 5]. Available from: <https://www.lundbeck.com/global/brain-disorders/disease-areas/parkinsons-disease>
4. Teresa M, Díaz G, Cruz M, Montero M, Victoria M, Jiménez H, et al. C Apítulo 49. 1817;507–17.
5. Benito-León J. Epidemiology of parkinson’s disease in Spain and its contextualisation in the world [Internet]. Vol. 66, Revista de Neurologia. Revista de Neurologia; 2018 [cited 2021 Mar 5]. p. 125–34. Available from: <https://www.neurologia.com/articulo/2017440>
6. DISEASE Werner Poewe P, Seppi K, Tanner C, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Nature Reviews Disease Primers.
7. Estudio de la conectividad de los circuitos neuronales del bulbo olfatorio de los primates. Comparación de individuos control con casos de Parkinson [Internet]. [cited 2021 Mar 5]. Available from: <https://roderic.uv.es/handle/10550/50265>
8. Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E, Rüb C, Liu Y, Magrané J, Becker D, et al. α -synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. J Neurosci. 2014;34(1):249–59.
9. Milber JM, Noorigian J V., Morley JF, Petrovitch H, White L, Ross GW, et al. Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in parkinson disease. Neurology [Internet]. 2012 Dec 11 [cited 2021 Mar 5];79(24):2307–14. Available from: /pmc/articles/PMC3578379/
10. Mahul-Mellier AL, Bartscher J, Maharjan N, Weerens L, Croisier M, Kuttler F, et al. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2020 Mar 3 [cited 2021 Mar 5];117(9):4971–82. Available from:

<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11842389.v2>

11. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. [Internet]. Vol. 47, Molecular neurobiology. Mol Neurobiol; 2013 [cited 2021 Mar 5]. p. 495–508. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22622968/>
12. Tena A, Kurtz J, Leonard DA, Dobrinsky JR, Terlouw SL, Mtango N, et al. Transgenic expression of human CD47 markedly increases engraftment in a murine model of pig-to-human hematopoietic cell transplantation. Am J Transplant [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2021 Apr 1];14(12):2713–22. Available from: </pmc/articles/PMC4236244/>
13. Villar-Piqué A, Lopes da Fonseca T, Outeiro TF. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. J Neurochem [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Mar 5];139:240–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jnc.13249>
14. TCDB » SEARCH [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: <http://www.tcdb.org/search/result.php?tc=1.C.77.1.1>
15. SNCA gene: MedlinePlus Genetics [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/snca/#conditions>
16. Pfam: Family: Synuclein (PF01387) [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: <http://pfam.xfam.org/family/PF01387>
17. Butler B, Sambo D, Khoshbouei H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission [Internet]. Vols. 83–84, Journal of Chemical Neuroanatomy. Elsevier B.V.; 2017 [cited 2021 Mar 5]. p. 41–9. Available from: </pmc/articles/PMC5167661/>
18. SNCA protein expression summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000145335-SNCA>
19. FABA Informa [Internet]. [cited 2021 Mar 5]. Available from: <http://www.faba.org.ar/fabainforma/535/Actualidad01.htm>
20. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of α -synuclein [Internet]. Vol. 79, Neuron. NIH Public Access; 2013 [cited 2021 Mar 5]. p. 1044–66. Available from: </pmc/articles/PMC3866954/>
21. Adamczyk A, Strosznajder JB. Alpha-synuclein potentiates Ca²⁺ influx through voltage-dependent Ca²⁺ channels. Neuroreport [Internet]. 2006 Dec 18 [cited 2021 Mar 5];17(18):1883–6. Available from: <https://journals.lww.com/00001756-200612180-00010>
22. Pan T, Zhu J, Hwu WJ, Jankovic J. The Role of Alpha-Synuclein in Melanin Synthesis in Melanoma and Dopaminergic Neuronal Cells. PLoS One. 2012;7(9):3–10.
23. Stefanis L. α -Synuclein in Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2012 [cited 2021 Mar 5];2(2). Available from: </pmc/articles/PMC3281589/>
24. Alim MA, Hossain MS, Arima K, Takeda K, Izumiyama Y, Nakamura M, et al. Tubulin seeds α -synuclein fibril formation. J Biol Chem [Internet]. 2002 Jan 18 [cited 2021 Mar 5];277(3):2112–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11698390/>
25. Buell AK, Galvagnion C, Gaspar R, Sparr E, Vendruscolo M, Knowles TPJ, et al. Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2014 May 27 [cited 2021 Mar 5];111(21):7671–6. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1315346111
26. SNCA Gene - GeneCards | SYUA Protein | SYUA Antibody [Internet]. [cited 2021 Feb 23]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SNCA>
27. Pavlou MAS, Pinho R, Paiva I, Outeiro TF. The yin and yang of α -synuclein-associated epigenetics in Parkinson's disease. Brain [Internet]. 2016 Aug 31 [cited 2021 Mar 4];140(4):aww227. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/aww227>
28. Kanda S, Bishop JF, Eglitis MA, Yang Y, Mouradian MM. Enhanced vulnerability to oxidative stress by α -synuclein mutations and C-terminal truncation. Neuroscience. 2000;97(2):279–84.
29. Ostrerova-Golts N, Petrucelli L, Hardy J, Lee JM, Farer M, Wolozin B. The A53T α -synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. J Neurosci. 2000;20(16):6048–54.
30. Hansen C, Angot E, Bergström AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G, et al. α -Synuclein propagates from mouse brain to

- grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2021 Mar 5];121(2):715–25. Available from: <http://www.jci.org>
31. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197–211.
 32. Breen DP, Halliday GM, Lang AE. Gut–brain axis and the spread of α -synuclein pathology: Vagal highway or dead end? *Mov Disord*. 2019;34(3):307–16.
 33. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review [Internet]. Vol. 12, *Molecular Neurodegeneration*. BioMed Central Ltd.; 2017 [cited 2021 Feb 20]. p. 1–11. Available from: <http://molecularneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13024-017-0149-0>
 34. Bell N, Hann V, Redfern CPF, Cheek TR. Store-operated Ca²⁺ entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. Vol. 1833, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2013. p. 643–51.
 35. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. Vol. 1078, *Methods in Molecular Biology*. 2013. p. 9–21.
 36. Alhaque S, Themis M, Rashidi H. Three-dimensional cell culture: From evolution to revolution. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2018;373(1750).
 37. Overview - What is microfluidics? What is microfluidic chip? | uFluidix [Internet]. [cited 2021 Mar 22]. Available from: <https://www.ufluidix.com/resources/definitions/>
 38. μ -Slide VI 0.4 | Deslizamiento de canal para ensayos de flujo paralelo | ibidi [Internet]. [cited 2021 Apr 17]. Available from: <https://ibidi.com/channel-slides/57--slide-vi-04.html>
 39. What is the Extracellular Matrix? | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2021 Mar 19]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture/extracellular-matrix.html>
 40. Kim SB. Fabrication of bioluminescent capsules and live-cell imaging. *Methods Mol Biol*. 2014;1098:117–25.
 41. Leica DMI6000 B with Adaptive Focus Control | Productos | Leica Microsystems [Internet]. [cited 2021 Mar 6]. Available from: <https://www.leica-microsystems.com/es/productos/microscopios-opticos/detalles/leica-dmi6000-with-adaptive-focus-control/>
 42. Agholme L, Lindström T, Kgedal K, Marcusson J, Hallbeck M. An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimer's Dis*. 2010 Jan 1;20(4):1069–82.
 43. Dwane S, Durack E, Kiely PA. Optimising parameters for the differentiation of SH-SY5Y cells to study cell adhesion and cell migration. *BMC Res Notes* [Internet]. 2013 [cited 2021 May 23];6(1):366. Available from: </pmc/articles/PMC3847106/>
 44. Berg G, Barchuk M, Miksztowicz V. Behavior of Metalloproteinases in Adipose Tissue, Liver and Arterial Wall: An Update of Extracellular Matrix Remodeling. *Cells*. 2019 Feb 14;8(2):158.
 45. Labour M-N, Banc A, Tourrette A, Cunin F, Verdier J-M, Devoisselle J-M, et al. Thick collagen-based 3D matrices including growth factors to induce neurite outgrowth. [cited 2021 May 23]; Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00747635>
 46. La célula. 2. Matriz extracelular. Proteínas estructurales. *Atlas de Histología Vegetal y Animal* [Internet]. [cited 2021 May 22]. Available from: https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/2-componentes_proteinas.php
 47. ExPASy [Internet]. [cited 2021 May 23]. Available from: https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool1?P37840@1-140@average
 48. Síntesis del colágeno [Internet]. [cited 2021 May 23]. Available from: [https://www.news-medical.net/health/Collagen-Synthesis-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Collagen-Synthesis-(Spanish).aspx)
 49. Axón | Qué es, dónde se encuentra, cuál es función e importancia para las neuronas [Internet]. [cited 2021 May 23]. Available from: <https://www.fisioterapia-online.com/glosario/axon-o-neurita>
 50. Cheng JPX, Nichols BJ. Caveolae: One Function or Many? Vol. 26, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2016. p. 177–89.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1. Crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota Cálculos, representaciones y esquemas realizados en el experimento

Anexo 1.1 (cálculos del crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota a 100, 200, 400 y 800 células y 25, 50 y 100% ECM). Para el crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y a 100,200,400 y 800 células y 25,50 y 100% de matriz ECM, respectivamente, se pretende obtener una concentración final de 40.000 células totales. Por ende, se diluyen 64 μl de una suspensión de células SH-SY5Y a una densidad de $1,18 \cdot 10^6$ células/ml en 936 μl de medio DMEM 10% FBS.

Para obtener 100 células en la gota se sigue el procedimiento explicado a continuación:

- En este caso, la gota está formada por 5 μl de matriz ECM y 5 μl de las células. Así, en cada gota la concentración de células a obtener (100 células totales en 5 μl de las células) será $100 \text{ células totales} / 5 \mu\text{l} = 20 \text{ células}/\mu\text{l}$.
- Cada uno de los tubos con la concentración determinada a alcanzar (mostrado en materiales y métodos, *tabla 1*) se centrifuga y resuspende en 50 μl de DMEM 10% FBS. Así, las células totales que habrá, una vez resuspendidas, en la gota serán: $20 \text{ células}/\mu\text{l} \cdot 50 \mu\text{l} = 1.000 \text{ células}$
- Para obtener esta cantidad de células final en la gota se parte del microtubo que contiene 40.000 células/ml. Por ello, siguiendo la relación: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 40.000 \text{ cél}/\text{ml} \cdot V_1 = 1.000 \text{ cél totales}$, se toman 25 μl de este microtubo.

Lo mismo para las demás concentraciones de células.

Para el cálculo de las distintas concentraciones de matriz se requiere diluirla con DMEM 10% FBS en función del % deseado.

- Para conseguir el 50% ECM se mezcla la misma cantidad de ECM que de DMEM 10% FBS. Como tenemos 4 tubos (100, 200, 400 y 800 células) a los que se añadirán 5 μl de matriz al 50% a cada tubo, se necesita un volumen total de $20 \mu\text{l} + 6 \mu\text{l}$ para compensar error de pipeteo. Así, se mezclan 13 μl de ECM+13 μl de DMEM 10% FB.
- Para conseguir 25% ECM, se mezclan 6 μl de ECM+18 μl de DMEM 10% FBS ya que, como tenemos 4 tubos a los que se añadirán 5 μl de matriz al 25% a cada tubo, esto hace un total de $20 \mu\text{l} + 4 \mu\text{l}$ para compensar el error. Así, se mezclan 6 μl de ECM+18 μl de DMEM 10% FBS.

Anexo 1.2 (cálculos, tablas resumen e imágenes esquemáticas del crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota a 200, 400, 800 y 1.600 células y 80% ECM). Para el crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y a 200,400, 800 y 1.600 células y 80% de matriz ECM, se procura conseguir una concentración de 80.000células/ml. Para ello, se diluye la suspensión con $1,25 \cdot 10^6$ células/ml, mezclando 64 μl de las células con 936 μl de DMEM 10% FBS. En la tabla siguiente se muestran los volúmenes a tomar para alcanzar las distintas cantidades celulares. Los cálculos realizados para obtener los volúmenes mencionados se explican en el Anexo 1.1.

Tabla A1. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar las densidades determinadas cultivadas con 80% ECM. La gota contiene 2µl SH-SY5Y + 8 µl ECM.

Número de células totales a obtener	[] de cada gota (2 µl)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
200 células	100células/µl	5.000 células	75 µl
400 células	200células/µl	10.000 células	125 µl
800 células	400células/µl	20.000 células	250 µl
1.600 células	800células/µl	40.000 células	500 µl

Tabla A2. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar las densidades determinadas cultivadas con 60% ECM. La gota contiene 4µl SH-SY5Y + 8 µl ECM.

Número de células totales a obtener	[] de cada gota (4 µl)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
200 células	50células/µl	2.500 células	32 µl
400 células	100células/µl	5.000 células	62,5 µl
800 células	200células/µl	10.000 células	125 µl
1.600 células	400células/µl	20.000 células	250 µl

La disposición de las gotas en la placa de 24 pocillos se muestra a continuación.

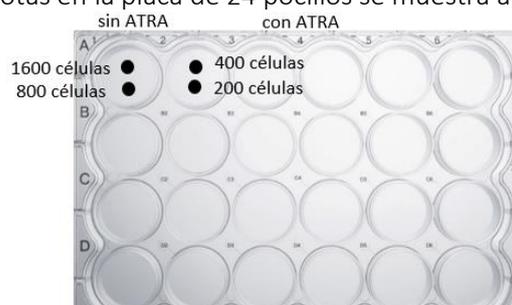


Figura A1. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 24 pocillos. En la parte superior se indican los pocillos que se han sometido a un proceso de diferenciación y, por tanto, contienen ATRA, y los que no. Cada punto hace referencia a la gota (2 gotas por pocillo) donde se indica el número de células totales que contiene.

Para determinar la cantidad de células del flask, utilizado en el experimento, a añadir a los pocillos se sigue el procedimiento indicado a continuación.

- Se calculan las células/cm² que contiene el flask:
 - El flask utilizado en el experimento tiene una superficie de 25 cm²
 - El microtubo que contiene las células del flask tiene un volumen de 8 ml
$$3,25 \cdot 10^5 \text{ células/ml} \cdot 8\text{ml} = 2,6 \cdot 10^6 \text{ células totales en el flask de } 25\text{cm}^2$$

$$\rightarrow 2,6 \cdot 10^6 \text{ células}/25\text{cm}^2 = 104.000\text{células}/\text{cm}^2$$
- Sabiendo que los pocillos de la placa de 24 pocillos tienen una superficie de 2 cm² y un volumen de 500 µl:

$$\frac{104.000\text{células}}{\text{cm}^2} \cdot \frac{2\text{cm}^2}{500\mu\text{l}} = \frac{416.000\text{células}}{\text{ml}} \text{ en cada pocillo}$$

La densidad de las células iniciales es 3,25·10⁵ células/ml. Por lo tanto, al ser menor que la densidad a alcanzar se toman directamente 500 µl del microtubo que contiene las células del flask ya que no se conoce con exactitud la confluencia de estas células.

Anexo 1.3 (cálculos, tablas resumen e imágenes esquemáticas del crecimiento y diferenciación de SH-SY5Y mediante cultivo 3D en gota a 400, 800 y 1.600 células y 50% ECM). Ahora, para el crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y a 400, 800 y 1.600 células y 50% ECM en una placa de 96 pocillos se diluye la suspensión con $8 \cdot 10^5$ células/ml mezclando 100 μ l de las células con 900 μ l de DMEM 10% FBS para obtener una densidad de 80.000 células/ml. En la tabla siguiente se muestran los volúmenes a tomar para alcanzar las distintas densidades celulares. Los cálculos realizados para obtener los volúmenes mencionados se explican en el Anexo 1.1.

Tabla A3. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar las densidades determinadas.

Número de células totales a obtener	[] de cada gota (8 μ l)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
400 células	50células/ μ l	2.500 células	31 μ l
800 células	100células/ μ l	5.000 células	63 μ l
1.600 células	200células/ μ l	10.000 células	125 μ l

La disposición de las gotas en la placa de 96 pocillos se muestra a continuación.

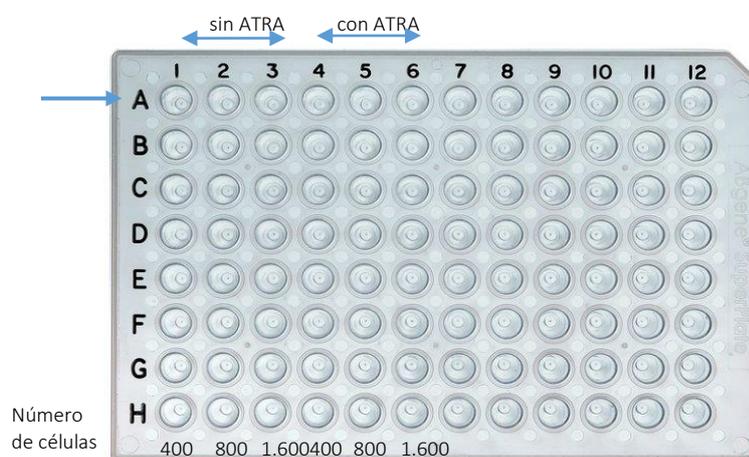


Figura A2. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 96 pocillos. La flecha azul a la izquierda indica la fila en la que se han añadido las células con los distintos tratamientos. En la parte superior se esquematiza los pocillos que han sido tratados con ATRA y los que no, y en la parte inferior se muestra el número de células que contiene cada pocillo.

Anexo 1.4 (cálculos, tablas resumen e imágenes esquemáticas del cultivo en 3D de SH-SY5Y mediante gota a 3.200 y 6.400 células y 30% ECM y colágeno, respectivamente). Para la elaboración de este experimento se diluye la suspensión de SH-SY5Y, a una densidad de 375.000 células/ml, mezclando 213 μ l de células con 787 μ l de DMEM 10% FBS obteniendo así una densidad de 80.000 células/ml. En la tabla siguiente se muestran los volúmenes a tomar para alcanzar las distintas densidades celulares en las gotas que contienen matriz ECM. Los cálculos realizados para obtener los volúmenes mencionados se explican en el Anexo 1.1.

Tabla A4. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar las densidades determinadas.

Número de células totales a obtener	[] de cada gota (16 μ l)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
3.200 células	200células/ μ l	10.000 células	125 μ l
6.400 células	400células/ μ l	20.000 células	250 μ l

Como se ha mencionado en el apartado 3.3.3 el protocolo en el caso de la matriz de colágeno es diferente. Para que el pH de la matriz sea neutro y que esta esté a una densidad de 1,5 mg/ml se añaden los componentes mencionados en la tabla siguiente.

Tabla A5. Esquema de los distintos componentes que conforman la matriz de colágeno y el volumen de los mismos a añadir para neutralizar el pH.

Componentes de la matriz	μl a añadir
DPBS	20 μl
NaOH (hidróxido de sodio) *	3 μl
Colágeno (4.5mg/ml)	69,28 μl
DMEM 10% FBS	107,72 μl

*La razón por la que se adiciona NaOH para neutralizar el medio es porque el colágeno viene diluido en ácido acético.

Para reducir el uso de colágeno al máximo se divide la mezcla anterior en 3 submezclas:

- Mezcla 1:** contiene únicamente DMEM 10% FBS para el recubrimiento de los pocillos
- Mezcla 2:** DMEM 10% FBS y SH-SY5Y a una densidad de 3.200 células
- Mezcla 3:** DMEM 10% FBS y SH-SY5Y a una densidad de 6.400 células

Para asegurar la neutralidad de la matriz se debe mantener los volúmenes de los componentes mencionados en la tabla A5. Por ello, de los 107,72 μl de DMEM 10% FBS se retira una parte (15 μl) correspondiente a cada submezcla para, tras añadir los medios de cada mezcla, obtener 3 microtubos que contengan la matriz colágeno sin modificar y la matriz colágeno con las SH-SY5Y a las dos densidades mencionadas. Así, los nuevos volúmenes a coger se muestran a continuación.

- Los volúmenes a tomar para la formación de gotas cultivadas en matriz ECM son 125 y 250 μl (tabla A4), respectivamente. Estas gotas están formadas por 16 μl de SH-SY5Y y 8 μl de matriz ECM. Es decir, los volúmenes corresponden a 24 μl.
- En el caso de la matriz de colágeno, las células se diluyen en un volumen total de ~ 67 μl (explicado en la figura siguiente). Es decir, las SH-SY5Y están diluidas (67:24) ~ 3 veces más que en el caso anterior. Por ello, para obtener las mismas densidades en ambos casos (3.200 y 6.400 células), basta con tomar 3 veces más el volumen calculado para obtener estas densidades en las gotas cubiertas con matriz ECM. Lo que se muestra en la tabla siguiente.

Tabla A6. Tabla resumen de los distintos volúmenes a tomar de la suspensión celular que contiene 80.000 células/ml para obtener las respectivas densidades celulares.

Número de células totales a obtener	[] de cada gota (16 μl)*	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
9.600 células	600 células/μl	30.000 células	375 μl
19.200 células	1.200 células/μl	60.000 células	750 μl

*Se asume que la diferencia de volumen a tomar de las células para formar las gotas (16 μl con matriz ECM y 15 μl con matriz colágeno) es despreciable.

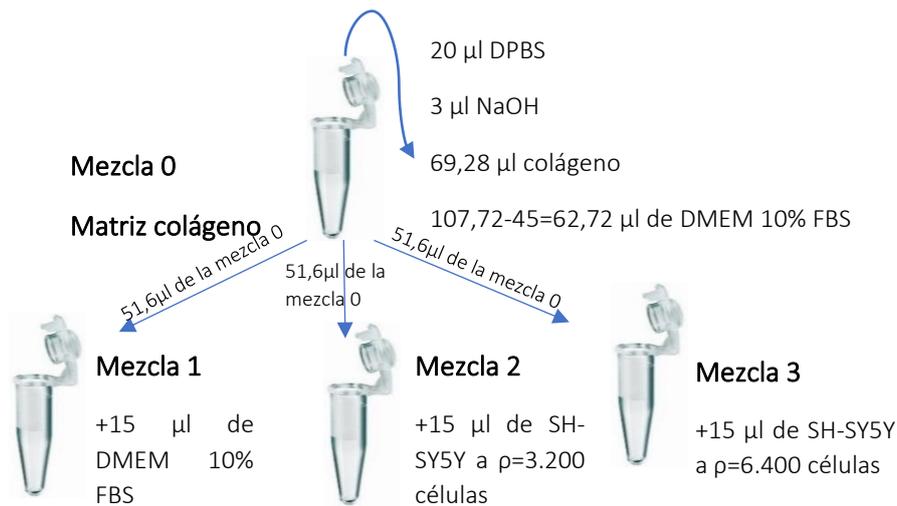


Figura A3. Ilustración esquemática del protocolo de formación de las gotas con matriz colágeno. La mezcla 0 contiene los componentes necesarios para neutralizar el pH y el volumen de DMEM 10% FBS menos la diferencia utilizada para las 3 mezclas consecuentes. Esta mezcla se reparte en 3 microtubos que añadirán, en cada caso, 15 μ l de DMEM 10% FBS solo o con células según interese. Se asume que el pH sigue siendo neutro ya que el medio DMEM tiene pH cercano al neutro y las células, aunque se desconozca su pH, están muy diluidas, haciendo su contribución a la variación de pH mínima.

La disposición de las gotas en la placa de 96 pocillos se muestra a continuación.

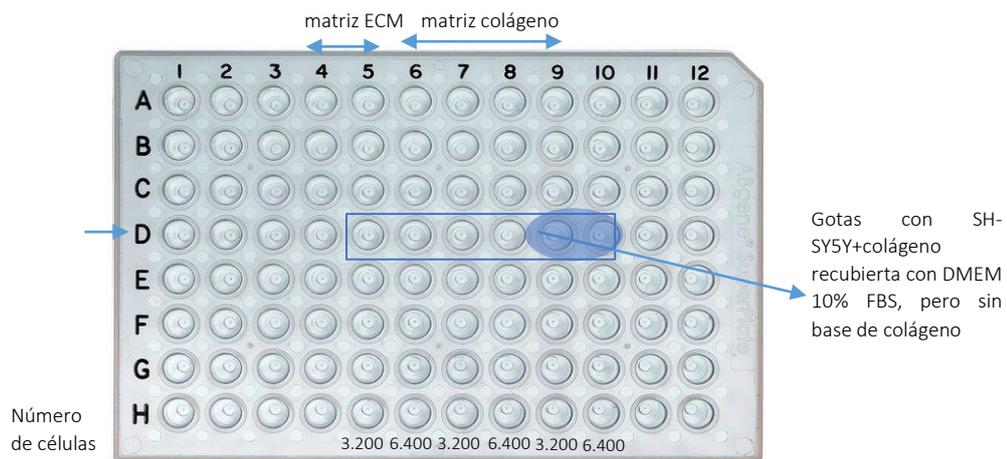


Figura A4. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 96 pocillos. La flecha azul a la izquierda indica la fila en la que se han añadido las células con los distintos tratamientos. En la parte superior se esquematizan los pocillos que han sido cultivados con matriz ECM y con matriz colágeno, y en la parte inferior se muestra el número de células que contiene cada pocillo. Los dos últimos pocillos marcados contienen únicamente la gota dispuesta sobre el pocillo, sin una capa de matriz de colágeno, y recubiertas con medio DMEM 10% FBS. Se colocan los pocillos en el centro de la placa y se añade DPBS alrededor de los pocillos tratados para minimizar la evaporación.

Anexo 1.5 (cálculos y representaciones esquemáticas del crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y a 6.400 células totales y 5 y 10% ECM y matriz colágeno, respectivamente). Se requiere alcanzar una densidad 80.000 células/ml para, tras centrifugar y resuspender los nuevos volúmenes, alcanzar la población celular de interés (6.400 células) en las gotas. Para ello, se diluye la suspensión de SH-SY5Y, a una densidad 225.000 células/ml, mezclando 356 μ l de las células con 644 μ l de DMEM 10% FBS.

Es necesario ajustar el pH de la matriz colágeno y que esté a una densidad de 1,5 mg/ml. A tal efecto, se añaden los componentes mencionados en la Tabla A5, Anexo 1.4, con los ajustes explicados para reducir al máximo el gasto de matriz, pero teniendo en cuenta que, en este caso, únicamente es necesario preparar 2 mezclas (una mezcla que contiene 15 μ l de DMEM 10% FBS y otra mezcla que

contiene 15 μ l de SH-SY5Y a 6.400 células totales). Así, se reducirá el contenido de medio DMEM 10% FBS a añadir para formar la matriz en $107,72-30=77,72$ μ l. Esta mezcla se divide en 2 para realizar las 2 submezclas explicadas anteriormente.

Ahora, las células SH-SY5Y se diluyen en un volumen total de 100 μ l (explicado en la figura siguiente). Es decir, las SH-SY5Y se diluyen en 24 μ l, para la formación de las gotas, y estas se diluyen, previamente, en los 100 μ l de cada submezcla. Por lo tanto, las SH-SY5Y están diluidas (100:25) 4 veces más. Por ello, para obtener la cantidad final de 6.400 células, se toman 4 veces más, respectivamente, el volumen calculado para obtener esta cantidad de células en la gota; lo que se muestra en la tabla siguiente.

Tabla A7. Tabla resumen de los distintos volúmenes a tomar del microtubo que contiene 80.000 células/ml para obtener 6.400 células totales en la gota.

Línea celular	Número de células totales a obtener	[ρ] de cada gota (16 μ l) *	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
SH-SY5Y	25600 células	1.600 células/ μ l	80000 células	1000 μ l

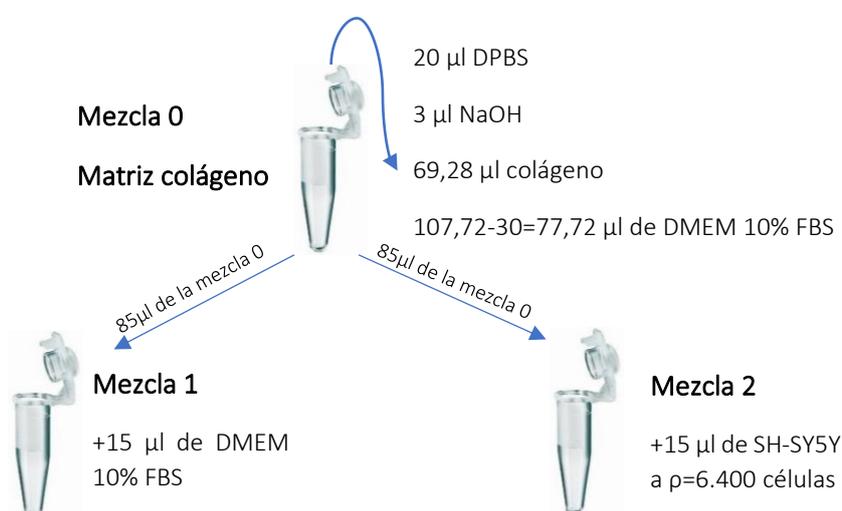


Figura A5. Ilustración esquemática del protocolo de formación de las gotas con matriz colágeno.

En paralelo, se realiza el experimento en el cual se diluye 1/10 y 1/20 la matriz ECM. Como se quieren obtener 6.400 células totales en la gota se realizan los cálculos y diluciones necesarias, mencionadas en el Anexo 1.1. Se diluye la suspensión de SH-SY5Y, a una densidad de $1,9 \cdot 10^6$ células/ml, para obtener 80.000 células/ml. En este caso la variable no es el número de células en cada gota, sino el % de matriz ECM utilizada. La conformación de cada gota para alcanzar las 2 concentraciones de matriz ECM requeridas se muestra seguidamente. Además, en la tabla A9, se menciona el volumen necesario a tomar, para obtener 6.400 células totales en la gota.

Tabla A8. Resumen de la relación de volúmenes a tomar de células SH-SY5Y y matriz ECM, para alcanzar las distintas concentraciones de matriz.

Volumen final de la gota	Dilución de la matriz ECM	Volumen de SH-SY5Y (a una densidad de 6.400 células totales) a tomar	Volumen de matriz ECM
20 μ l	1/10	18 μ l	2 μ l
	1/20	19 μ l	1 μ l

Tabla A9. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar 6.400 células totales.

Dilución de la matriz ECM	Volumen SH-SY5Y-SNCA en cada gota	[μ] de cada gota si se quiere obtener 6.400 células totales	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
1/10	18 μ l	356 células/ μ l	17800 células	222,5 μ l
1/20	19 μ l	337 células/ μ l	16800 células	210 μ l

La disposición de las gotas de los dos experimentos en la placa de 96 pocillos se muestra a continuación.

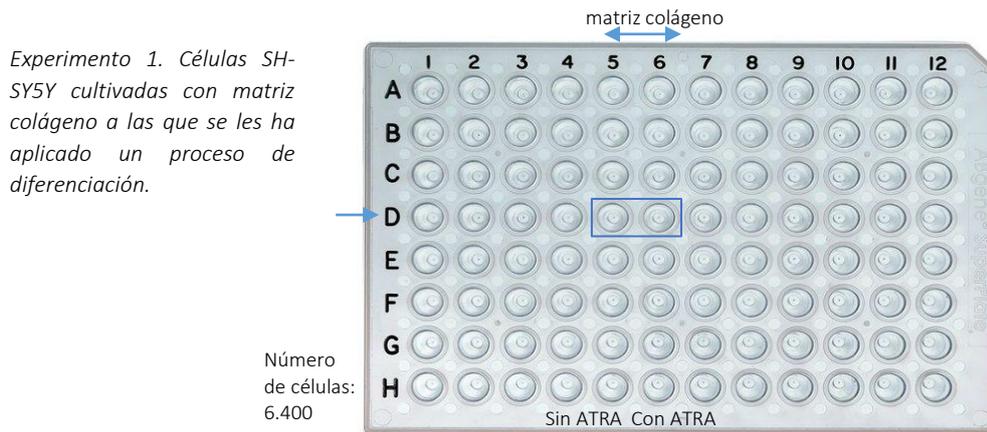


Figura A6. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 96 pocillos. La flecha azul a la izquierda indica la fila en la que se han añadido las células. En la parte inferior se indican los pocillos que se han usado con medio de diferenciación y sin medio para diferenciar las células.

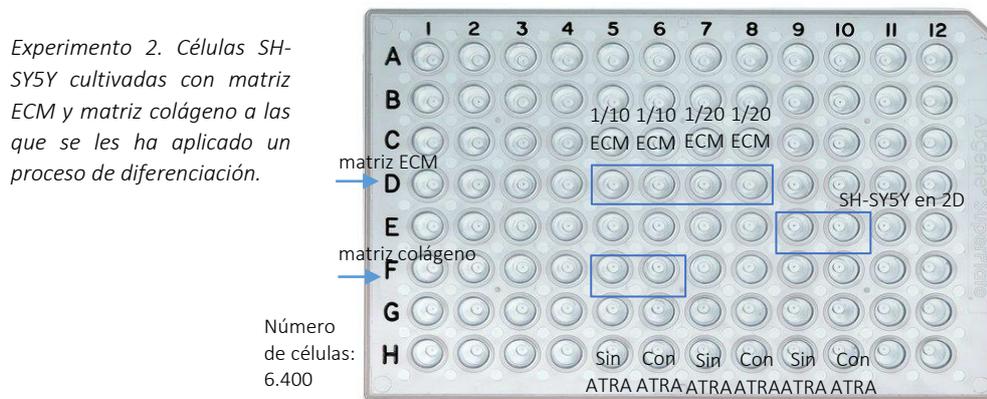


Figura A7. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 96 pocillos. La flecha azul a la izquierda indica la matriz utilizada en cada caso. En la parte inferior se esquematizan los pocillos que han sido cultivados con medio de diferenciación y sin medio para diferenciar las células. En la parte superior se muestra la dilución de la matriz ECM. Los dos últimos pocillos, 9 y 10, de la fila D, corresponden a las células SH-SY5Y crecidas en monocapa. Los datos indicados en los pocillos inferiores se refieren a los pocillos encuadrados dentro de su misma columna.

7.2. Anexo 2. Chips de microfluídica

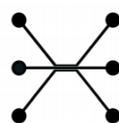


Figura A8. Izda. Imagen real del chip de microfluídica. Dcha. Esquema de un chip de microfluídica. Los puntos negros hacen referencia a los pocillos donde se cargan las muestras. Las líneas son los canales que convergen en la parte central implicada en la transferencia de nutrientes y gases disueltos. Chips de microfluídica. Overview - What is microfluidics? What is microfluidic chip? | uFluidix [Internet]. [cited 2021 Mar 22]. Available from: <https://www.ufluidix.com/resources/definitions/>

Anexo 2.1 (volumen a tomar de cada flask para alcanzar una concentración final de $1 \cdot 10^6$ células/ml) Es necesario que la concentración final celular en los chips sea $1 \cdot 10^6$ células/ml. Así, para alcanzar esta densidad se siguen los pasos mencionados a continuación:

Se determina el número de células iniciales que hay en cada uno de los flask a usar para calcular el volumen de cada uno a tomar para alcanzar la concentración final requerida.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

- Para las células HeLa:

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{(168 \cdot 10^4 \cdot 20)}{4} = 8,4 \cdot 10^6 \text{ células/ml}$$

$$\frac{1 \cdot 10^6 \text{ células}}{\text{ml}} \cdot 1 \text{ ml} = \frac{8,4 \cdot 10^6 \text{ células}}{\text{ml}} \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 119 \mu\text{l}$$

- Para las células SH-SY5Y:

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{(105 \cdot 10^4 \cdot 20)}{4} = 5,25 \cdot 10^6 \text{ células/ml}$$

$$1 \cdot \frac{10^6 \text{ células}}{\text{ml}} \cdot 1 \text{ ml} = 5,25 \cdot 10^6 \text{ células/ml} \cdot V_2$$

$$V_2 = 190 \mu\text{l}$$

- Para el conteo de ambos tipos celulares se ha realizado una dilución 1:20
- Se han contado los 4 cuadrantes en una cámara de Neubauer

Anexo 2.2 (g de ATRA $30 \mu\text{M}$ a añadir en el microchip). La concentración máxima que se puede alcanzar de este reactivo en los microchips es 40 mg/ml . Si la cantidad de ATRA disponible son 50 mg ($\text{PM}=300,44 \text{ g/mol}$) a una concentración $30 \mu\text{M}$:

$$30 \mu\text{M} = 30 \cdot 10^{-6} \text{ moles/l} \cdot 300,44 \text{ g/mol} = \frac{9,01 \text{ mg}}{\text{l}} = 9,01 \cdot \frac{10^{-3} \text{ mg}}{\text{ml}}$$

$$C_1 \cdot m_1 = C_2 \cdot m_2$$

$$\frac{40 \text{ mg}}{\text{ml}} \cdot 50 \text{ mg} = 9,01 \cdot \frac{10^{-3} \text{ mg}}{\text{ml}} \cdot m_2 \rightarrow m_2 = 221,98 \text{ g de ATRA}$$

7.3. Anexo 3. μ -slides

Los canales de estos dispositivos son muy útiles para el estudio del comportamiento de la línea celular SH-SY5Y en experimentos de flujo: utilizan volúmenes pequeños y son compatibles con el uso del objetivo de inmersión. Se cultivan las SH-SY5Y con 6 tratamientos distintos.

- Los canales 1 y 2 contienen las SH-SY5Y cultivadas con matriz ECM diluida 1/10 y 1/20, respectivamente, a una cantidad celular de 12.800 células totales.
- Los canales 3 y 4, corresponden a las células SH-SY5Y con colágeno a cantidades de 6.400 y 12.800 células totales.
- Los canales 5 y 6 abarcan las SH-SY5Y cultivadas en monocapa a cantidades de 6.400 y 12.800 células totales.

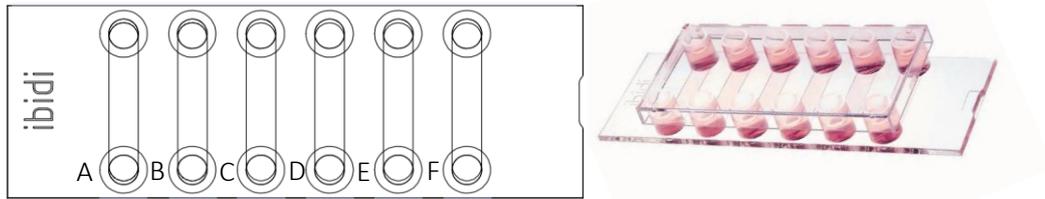


Figura A9. Izda. Configuración de los 6 tratamientos realizados en el μ -slide. A. SH-SY5Y a 12.800 células totales cultivadas con ECM 1/10. B. SH-SY5Y a 12.800 células totales cultivadas con ECM 1/20. C. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml. D. SH-SY5Y a 12.800 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml. E. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas en monocapa. F. SH-SY5Y a 12.800 células totales cultivadas en monocapa. Dcha. Imagen real del dispositivo μ -slide. Kim SB. Fabrication of bioluminescent capsules and live-cell imaging. *Methods Mol Biol.* 2014;1098:117–25.

Los canales tienen un volumen de 30 μ l. Por lo tanto, si se requiere alcanzar una densidad de 80.000 células/ml para, tras centrifugar y resuspender los nuevos volúmenes, alcanzar la población celular de interés en estos canales, se diluye, primero, la suspensión de SH-SY5Y, a una densidad de 312.500 células/ml, mezclando 260 μ l de las células con 740 μ l de DMEM 10% FBS.

Ahora, basta con tomar los volúmenes adecuados para alcanzar las densidades de interés según el tratamiento que se lleve a cabo.

- SH-SY5Y con ECM diluida 1/10 y 1/20. Como se ha mencionado, los canales tienen un volumen de 30 μ l. Por tanto, el volumen final de la mezcla será 30 μ l. Así, para obtener una matriz ECM diluida 1/10, se mezclan 3 μ l de ECM junto con 27 μ l del microtubo que contiene las SH-SY5Y a 80.000 células/ml, y para obtener la ECM diluida 1/20, se mezclan 1,5 μ l de ECM junto con 28,5 μ l del microtubo con las SH-SY5Y. Los volúmenes a tomar para conseguir 12.800 células totales en ambos casos se muestran a continuación.

Tabla A10. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar 12.800 células totales en las células SH-SY5Y cultivadas con ECM.

Dilución de la matriz ECM	Volumen SH-SY5Y-SNCA en cada gota	[] de cada gota si se quiere obtener 12800 células totales	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
1/10	27 μ l	475 células/ μ l	23750 células	300 μ l
1/20	28,5 μ l	450 células/ μ l	22500 células	281 μ l

- SH-SY5Y con colágeno 1,5 mg/ml. Se añaden los componentes mencionados en la Tabla A5 Anexo 1.4, con los ajustes explicados para reducir al máximo el gasto de matriz. En este caso, se preparan dos mezclas, una mezcla que contiene 15 μ l de SH-SY5Y a 6.400 células totales y otra mezcla que contiene 15 μ l de SH-SY5Y a 12.800 células totales. Así, se reducirá el contenido de medio DMEM 10% FBS a añadir para formar la matriz en 107,72-30=77,72 μ l. Esta mezcla se divide en 2 para realizar las 2 submezclas explicadas anteriormente. Por lo tanto, las células se dividen en un volumen total de 100 μ l. De estos 100 μ l se toman 30 μ l para rellenar los canales. Es decir, las SH-SY5Y se diluyen (100:30) aproximadamente 3 veces más. Por ello, para obtener las densidades finales de interés, se toma 3 veces más el volumen calculado; lo que se muestra en la tabla siguiente.

Tabla A11. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar 6.400 y 12.800 células totales en las células SH-SY5Y cultivadas con colágeno.

Número totales de células a obtener	[] de cada gota (15 µl)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
6.400·3=19.200 células	426 células/µl	21.300 células	798 µl
12.800·3=38.400 células	853 células/µl	42.667 células	1.600 µl

- SH-SY5Y cultivadas en monocapa. En este caso, las células irán directamente en los canales sin necesidad de ningún tratamiento previo. Los volúmenes a tomar para conseguir las densidades de interés se muestran en la tabla A12.

Tabla A12. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar 6.400 y 12.800 células totales en las células SH-SY5Y cultivadas en monocapa.

Número totales de células a obtener	[] de cada gota (30 µl)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
6.400 células	213 células/µl	10.650 células	133 µl
12.800 células	426 células/µl	21.300 células	266 µl

Una vez se han rellenado los canales, se voltea el µ-slide cada 2-3 min durante 15 min para que polimericen las matrices. *Las células que están cultivadas en monocapa se añaden tras terminar este proceso ya que no contienen matriz.* Terminado este tiempo se añade, a los 12 reservorios, DMEM 10% FBS junto con células SH-SY5Y a las densidades correspondientes: en el caso de las SH-SY5Y que contienen ECM se añade a los pocillos DMEM 10% FBS con SH-SY5Y a una densidad de 12.800 células totales; mientras que las SH-SY5Y cultivadas en monocapa y con colágeno contienen en los reservorios, DMEM 10% FBS y SH-SY5Y a densidades de 6.400 y 12.800 células según convenga. Para obtener estas soluciones basta con tomar 80 y 160 µl de los microtubos que contengan las SH-SY5Y a densidades 80.000 y 160.000 células totales, respectivamente.

Paralelamente se realiza otro experimento en otra placa ibidi, pero tratada, en este caso, con medio de diferenciación. El procedimiento llevado a cabo es el mismo que se ha mencionado anteriormente, pero con una serie de modificaciones:

- No se cultivan las SH-SY5Y en matriz ECM ya que esta línea celular no es capaz de crecer adecuadamente en esta matriz
- Por el contrario, se cultivan en matriz colágeno y en monocapa con medio completo y medio que induce su diferenciación para determinar y estudiar el mecanismo de diferenciación de esta línea celular
- El número de células totales a obtener son 3.200 y 6.400 células en los canales, ya que la densidad celular de 12.800 células parece ser demasiado elevada por lo que, si se induce a las células a diferenciar, podría dar problemas. *Las células cultivadas en monocapa contienen únicamente 3.200 células en los canales.*

Los volúmenes a tomar para alcanzar las densidades de interés en función del tratamiento a aplicar se explican a continuación.

Tabla A13. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar 3.200 y 6.400 células totales en las células SH-SY5Y cultivadas con colágeno.

Número total de células a obtener	[] de cada gota (15 µl)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
3.200·3=9.600 células	213 células/µl	10.650 células	400 µl
6.400·3=19.200 células	426 células/µl	21.300 células	800 µl

Tabla A14. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar 3.200 células totales cultivadas en monocapa.

Número totales de células a obtener	[] de cada gota (30 µl)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
3.200 células	106,7 células/µl	5.333 células	67 µl

Una vez se han rellenado los canales, se voltea el µ-slide cada 2-3 min durante 15 min mientras polimerizan las matrices. Terminado este tiempo se añade, a los 12 reservorios, DMEM 10% FBS o DMEM 5% FBS + 30 µM ATRA junto con células SH-SY5Y a las densidades correspondientes según se quiera inducir o no la diferenciación. Para obtener las soluciones que contienen 3.200 y 6.400 células basta con tomar 80 µl de los microtubos que contengan las SH-SY5Y a 40.000 y 80.000 células totales, respectivamente.

Así, la configuración del µ-slide es la siguiente:

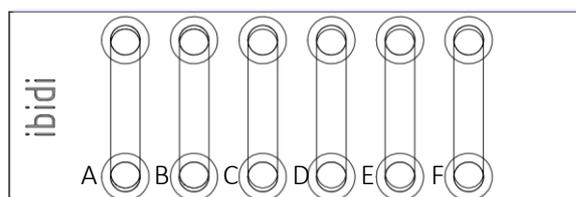


Figura A10. Configuración de los 6 tratamientos realizados en el µ-slide. A. SH-SY5Y a 3.200 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml en medio completo. B. SH-SY5Y a 3.200 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml con medio de diferenciación. C. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml en medio completo. D. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml con medio de diferenciación. E. SH-SY5Y a 3.200 células totales cultivadas en monocapa en medio completo. F. SH-SY5Y a 3.200 células totales cultivadas en monocapa en medio de diferenciación. Kim SB. Fabrication of bioluminescent capsules and live-cell imaging. *Methods Mol Biol.* 2014;1098:117–25.

Tras el análisis de los resultados obtenidos a partir de los experimentos previos, se confirma que este dispositivo, junto con la matriz colágeno, permite el crecimiento, diferenciación e interacciones adecuadas entre las SH-SY5Y. Por ello, se adicionan fibras de α- sinucleína exógena marcada con Alexa Fluor™ 488 a las células SH-SY5Y cultivadas en placa de Ibidi, para determinar el efecto en la viabilidad, crecimiento y diferenciación. La disposición del µ-slide sobre el que se realiza este experimento se muestra a continuación:

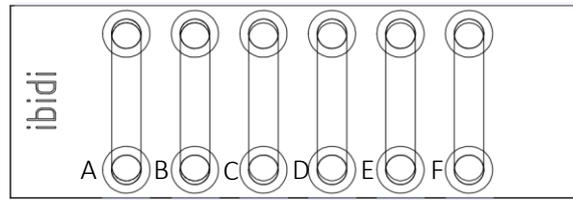


Figura A11. Configuración de los tratamientos realizados en el μ -slide. A-C. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml en medio completo por triplicado. D-F. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas en monocapa en medio completo por triplicado. Se realizan estos ensayos por triplicado para minimizar los errores cometidos durante el experimento. Kim SB. Fabrication of bioluminescent capsules and live-cell imaging. *Methods Mol Biol.* 2014;1098:117–25.

Los volúmenes a tomar para alcanzar las densidades de interés en función del tratamiento a aplicar se explican a continuación.

Tabla A15. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar 3.200 y 6.400 células totales en las células SH-SY5Y cultivadas con colágeno.

Número total de células a obtener	[] de cada gota (15 μ l)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
6.400·6=38.400 células	2.560 células/ μ l	128.000 células	1.600 μ l

Tabla A16. Resumen del número de células finales, concentración y células totales en cada gota y volumen a tomar para alcanzar 3.200 células totales en las células SH-SY5Y cultivadas en monocapa.

Número total de células a obtener	[] de cada gota (30 μ l)	Células totales en cada gota	Volumen a tomar (del frasco que contiene 80.000 células) para obtener las respectivas células
6.400 células	213 células/ μ l	10.667 células	133 μ l

Una vez preparado el experimento, se adiciona 1 μ l de las fibras de α -sinucleína exógena (25 μ M) en las células cultivadas en 3D con matriz colágeno. Para mejorar la resolución y contraste de las fibras en las células, una vez han sido endocitadas, se lavan los pocillos con medio completo DMEM FBS 10%.

Se observa que, entre otros resultados, la línea modelo sufre procesos de muerte celular y retracción de neuritas, indicativo de muerte celular. Para determinar la causa de esta muerte, se realiza un ensayo control con células cultivadas en monocapa.

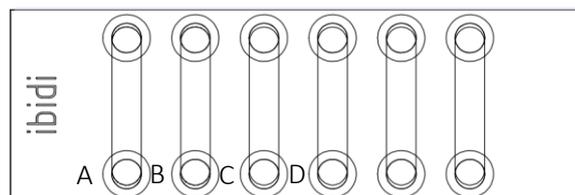


Figura A12. Configuración del experimento control en el μ -slide. A. SH-SY5Y a 30.000 células totales cultivadas en monocapa en medio completo a las que se les ha adicionado α -sinucleína marcada. B. SH-SY5Y a 30.000 células totales cultivadas en monocapa en medio completo tratadas con α -sinucleína y fluorescencia durante 20 min. C. SH-SY5Y a 30.000 células totales cultivadas en monocapa en medio completo vistas a campo claro. D. SH-SY5Y a 30.000 células totales cultivadas en monocapa en medio completo irradiadas con fluorescencia durante 20 min. Kim SB. Fabrication of bioluminescent capsules and live-cell imaging. *Methods Mol Biol.* 2014;1098:117–25.

Para realizar el ensayo control donde se determina si la causa de muerte celular es producida por la adición de fibras de α -sinucleína o por la fototoxicidad se utilizan $1 \cdot 10^5$ células/pocillo para que la confluencia sea la suficiente para poder ver este fenómeno. *Estos pocillos hacen referencia a los pocillos de la placa de 24, por lo tanto, tienen una superficie de 2cm^2 . El canal de la placa de Ibidi tiene una superficie de $0,6\text{cm}^2$.*

$$1 \cdot 10^5 \frac{\text{células}}{\text{pocillo}} = 5 \cdot 10^4 \frac{\text{células}}{\text{cm}^2} \cdot 0,6 \text{ cm}^2 = 3 \cdot 10^4 \text{ células/canal}$$

Así, para alcanzar esta densidad, partiendo de un microtubo que contiene $3,125 \cdot 10^5$ células/ml en 4 ml, y centrifugando y resuspendiendo en 1 ml para cuatriplicar su concentración, se toman:

$$4 \cdot 3,125 \cdot 10^5 \frac{\text{cél}}{\text{ml}} \cdot V (\text{ml}) = 3 \cdot 10^4 \text{cél} \rightarrow V = 238 \mu\text{l}$$

Se ha cuatriplicado la concentración celular para ajustar las cuentas y obtener un volumen final cercano a $300 \mu\text{l}$ (cada canal alberga $30 \mu\text{l}$ y se prepara suficiente volumen para rellenar 10 canales, aunque solo se usen 6).

7.4. Anexo 4. Crecimiento y diferenciación de la línea celular SH-SY5Y en 2D vs 3D

Anexo 4.1. (análisis del crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y con 100, 200, 400 y 800 células totales y 25, 50 y 100% ECM). Las figuras a continuación muestran el comportamiento, crecimiento y diferenciación de las células SH-SY5Y cultivadas en monocapa y en 3D mediante gota.

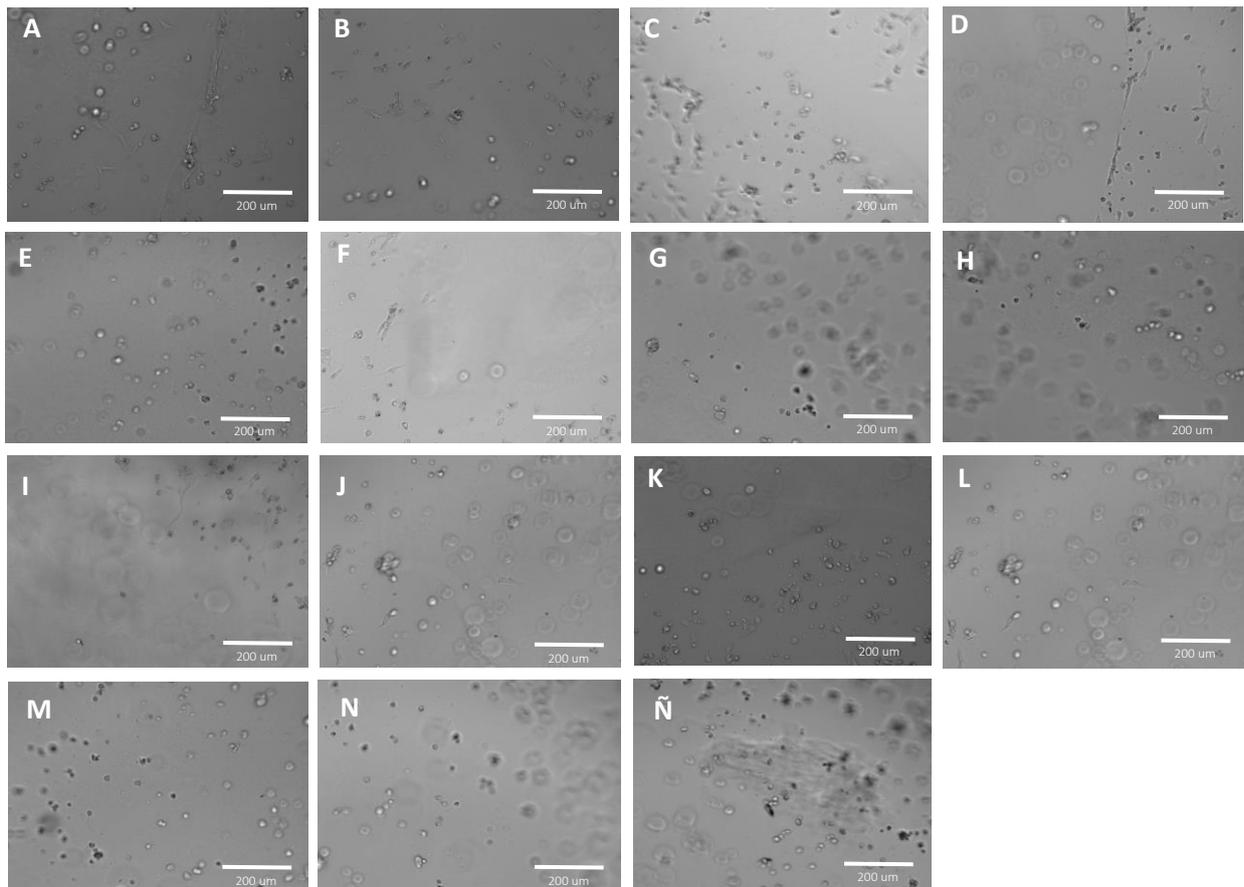


Figura A13. Células SH-SY5Y crecidas y diferenciadas mediante cultivo 3D en gota vistas en campo claro a 100 aumentos. A. Gota que contiene 200 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. B. Gota que contiene 200 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación. C. Gota que contiene 200 células SH-SY5Y al 25% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación. D. Gota que contiene 400 células SH-SY5Y al 50% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. E. Gota que contiene 400 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. F. Gota que contiene 400 células SH-SY5Y al 50% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación. G. Gota que contiene 400 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación. H. Gota que contiene 800 células SH-SY5Y al 10% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. I. Gota que contiene 800 células SH-SY5Y al 25% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. J. Gota que contiene 800 células SH-SY5Y al 50% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación. K. Gota que contiene 800 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación. L. Gota que contiene 1.600 células SH-SY5Y al 25% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. M. Gota que contiene 1.600 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. N. Gota que contiene 1.600 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación. Ñ. Gota que contiene 1.600 células SH-SY5Y al 25% de matriz ECM cultivadas sin medio de diferenciación. En todos los casos se observa que la morfología adquirida por las células es muy diferente a la que alcanzan cuando crecen en monocapa lo que recalca que, en todos los casos, la matriz utilizada es demasiado densa. No se distingue una gran diferencia entre el fenotipo adquirido cuando se cultivan a distintos % de matriz ECM, es decir, parece que las células no responden a esta matriz. En todos los casos las células tienden a formar grupos. Barra escalado: 200 μ m.

Anexo 4.2. (estudio del comportamiento de la línea SH-SY5Y con 200, 400, 800 y 1.600 células totales y 60, 80% ECM). Las figuras a continuación muestran el comportamiento, crecimiento y diferenciación de las células SH-SY5Y cultivadas en monocapa y en 3D mediante gota.

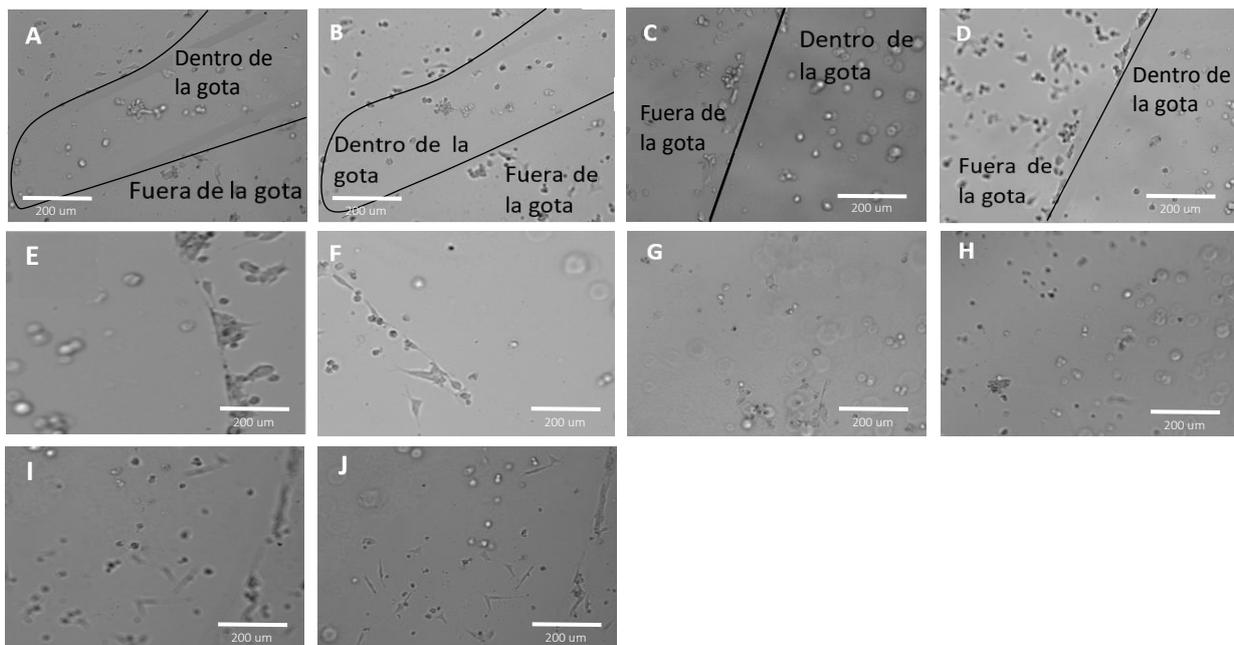


Figura A14. Células SH-SY5Y crecidas en monocapa y mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 aumentos en campo claro. Todas las imágenes están cultivadas en matriz al 80%. A y B. Gota que contiene 200 células cultivadas con medio de diferenciación. C, D y E. Gota que contiene 800 células cultivadas en medio DMEM 10% FBS. F, G y H. Gota que contiene 1.600 células cultivadas en medio de diferenciación. I y J. Gota que contiene 200 células cultivadas con medio de diferenciación.

Las imágenes A y B; y C y D, corresponden a la misma zona, respectivamente, pero con dos enfoques distintos en función de si se estudia el interior de la gota (imágenes B y D) o el exterior de la gota (imágenes A y C). Se puede apreciar muy bien el borde de la gota ya que cambia la morfología y el enfoque de las células. En algunos casos, imágenes E y F, sobre todo, se distinguen células que crecen en monocapa en planos Z superiores a las células que crecen en el interior de la gota. Esto puede ser indicativo de células que hayan quedado dispuestas sobre la gota, pero que crecen fuera de esta. A veces la gota no tiene forma simétrica y forma vellosidades, por ello, se encuentran células que crecen en monocapa rodeadas por células que crecen en 3D (imágenes A y B). Barra escalado: 200 μ m.

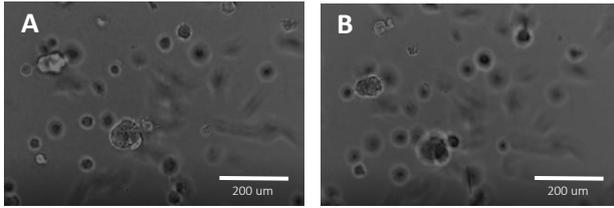


Figura A15. Células SH-SY5Y crecidas mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 aumentos en campo claro a dos enfoques distintos. Estas imágenes están cultivadas en matriz al 60% y contienen 1.600 células cultivadas en medio de diferenciación. Barra escalado: 200 µm.

Anexo 4.3. (estudio de la viabilidad y comportamiento de la línea celular SH-SY5Y tras la irradiación o no con fluorescencia). Las imágenes a continuación exponen la viabilidad de las células que han sido irradiadas y no, con fluorescencia. Se observa fototoxicidad.

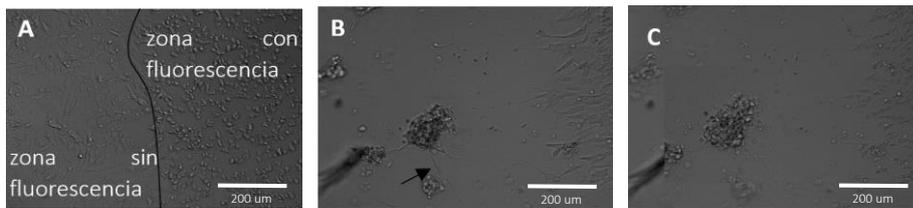


Figura A16. Imagen A. Gota que contiene 200 células al 60% de matriz ECM cultivadas con DMEM 10 % FBS crecidas en monocapa (2D) y mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 aumentos en campo claro. Se distingue (marcado con una línea negra) el límite de la fluorescencia ya que, a partir de este límite, las células son viables, con la morfología característica de las SH-SY5Y. La zona irradiada por fluorescencia provoca la muerte celular como, se puede apreciar por la morfología circular de las células. Imágenes B y C. Superposición de la sucesión de fotos del timelapse de la gota que contiene 200 células al 60% ECM cultivadas con medio de diferenciación irradiadas con fluorescencia. En la imagen B, se distinguen pequeñas ramificaciones (flechas) de las células con las que intentan formar conexiones entre la célula cultivada en 3D (izquierda) y las células cultivadas en 2D (derecha). Tras varias horas de fluorescencia con exposición intermitente a la fluorescencia cada 10 minutos se observa, en la imagen C, la muerte de prácticamente todas las células. Las células mueren a los pocos minutos de exposición continua a la fluorescencia. Barra escalado: 200 µm.

Anexo 4.4. (análisis y comparación del comportamiento de la línea celular cultivada en matriz ECM 30% y matriz colágeno). Las imágenes siguientes muestran las diferencias obtenidas en función del cultivo de SH-SY5Y en matriz ECM o en matriz colágeno.

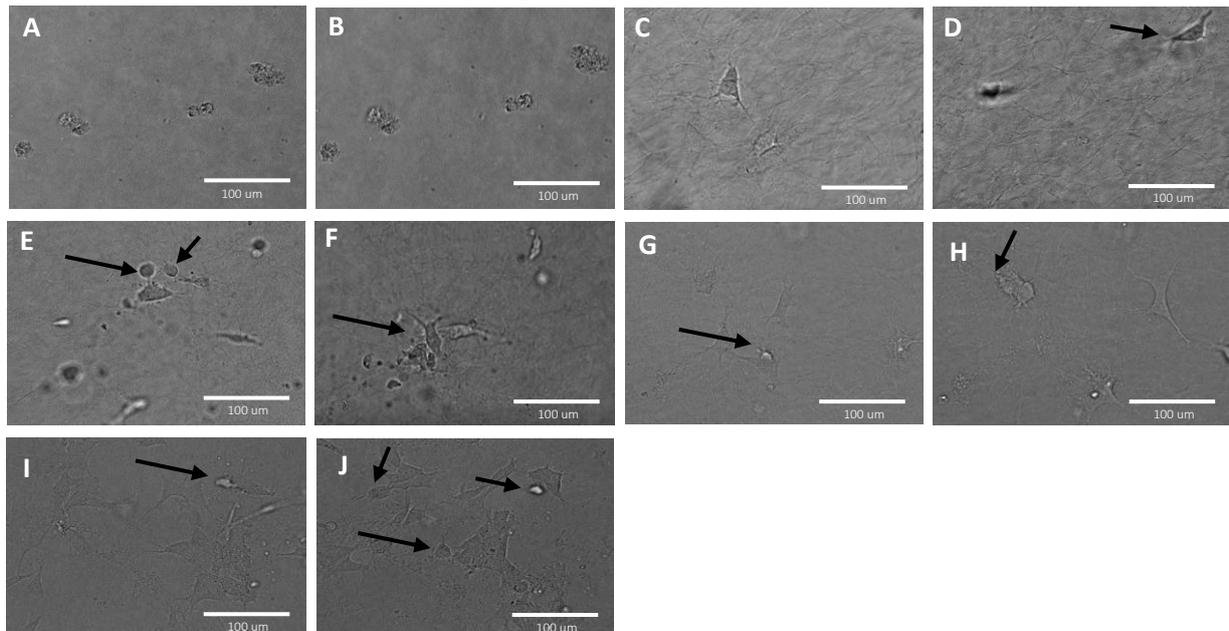


Figura A17. Células SH-SY5Y crecidas mediante cultivo 3D en gota vistas a 200 aumentos en campo claro. Imagen A y B. Células cultivadas con matriz ECM al 30% y 3.200 células. Sucesión de fotos del timelapse de 24 h. La densidad de la matriz es demasiado elevada e impide el desplazamiento de las células. Se observa una aparente muerte celular ya que la morfología es circular y las células no se mueven o dejan de hacerlo durante el timelapse. Las que están en agregados siguen vivas (se observa movimiento durante el timelapse). Imágenes C-J. Células cultivadas con matriz colágeno 1,5 mg/ml. Sucesión de fotos del timelapse de 24h. Esta matriz aporta las condiciones adecuadas de crecimiento de la línea celular. Se observa un claro desplazamiento de las células tanto longitudinalmente, como transversalmente (sobre los distintos planos Z, ya que, pasado un tiempo, las células se desenfocan). Igualmente se forman interacciones entre células. Imágenes C y D y E y F. Sucesión de fotos del timelapse de SH-SY5Y cultivadas en colágeno 1,5 mg/ml y a una cantidad de 3.200 células. Las imágenes G-J hacen referencia a los pocillos que únicamente contienen la gota con 3.200 y 6.400 células y matriz colágeno, respectivamente, recubiertos con DMEM 10% FBS; pero sin una base inicial de colágeno. No se observan grandes diferencias entre los pocillos tratados con un fondo de matriz que sin fondo. Sin embargo, las células parecen distribuirse mejor, en diferentes planos, cuando se añade una base de matriz. En estas últimas 4 fotos, las SH-SY5Y se reparten en el mismo plano, no crecen tan en 3D como lo hacen cuando se añade la base de matriz inicial. Las flechas resaltan las células SH-SY5Y que crecen en 3D. Barra escalado: 100 μ m.

Anexo 4.5. (estudio del crecimiento y diferenciación de la línea celular con 6.400 células totales cultivadas en matriz colágeno). Las imágenes siguientes muestran las diferencias obtenidas entre las SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno.

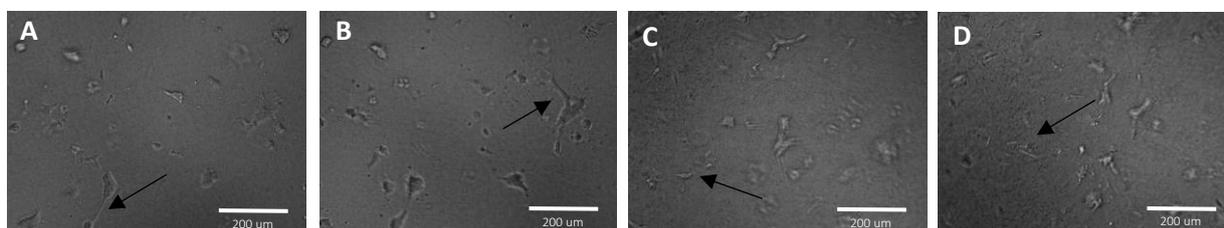


Figura A18. Estudio del comportamiento, crecimiento, viabilidad, diferenciación y contactos célula-célula de las células SH-SY5Y con 6.400 células totales cultivadas en 3D en matriz de colágeno. A y B. Timelapse de 24h, enfocado a 20 y 40 micras, respectivamente, con respecto a la base del pocillo, de SH-SY5Y sin ATRA vistas a 100 aumentos. Estudio a las 24h. C y D. Timelapse de 24h, enfocado en el límite inferior y 20 micras, respectivamente, con respecto a la base del pocillo, de SH-SY5Y con ATRA vistas a 100 aumentos. Estudio a las 24. Las flechas resaltan las células cultivadas en matriz colágeno y las interacciones que se forman entre ellas. Barra escalado: 200 μ m.

Anexo 4.6 (tabla comparativa de todos los ensayos realizados para el estudio del crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y en 3D). La tabla presenta un resumen de los experimentos realizados para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de la línea celular SH-SY5Y en cultivo 3D previo al cultivo en chip y μ -slides. Así como, los distintos resultados obtenidos en cada ensayo.

Tabla A17. Resumen de las distintas condiciones empleadas en cada experimento de la gota colgante para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de la línea celular SH-SY5Y.

Condiciones empleadas	Resultado
Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 100, 200, 400 y 800 células y 25, 50 y 100% ECM recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS	<ul style="list-style-type: none"> ○ Densidad ECM 100% demasiado elevada, 50% y 25% no muestran diferencias muy sobresalientes ○ Número de células óptimo: indefinido
Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 200, 400, 800 y 1.600 células y 80% ECM recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS+SH-SY5Y	<ul style="list-style-type: none"> ○ Células en 2D: morfología normal ○ Células 3D: morfología circular, no responden al tratamiento con ATRA ○ ¿Falta de factores de crecimiento y nutrientes en la matriz ECM?
Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 200, 400, 800 y 1.600 células y 60% ECM recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS+SH-SY5Y	<ul style="list-style-type: none"> ○ Densidad de matriz demasiado elevada lo que impide la supervivencia celular

Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 400, 800 y 1.600 células y 50% ECM recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS	○ Densidad de matriz sigue siendo demasiado elevada
Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 3.200 y 6.400 células y 30% ECM recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS	○ Densidad de matriz demasiado elevada, aparente muerte celular
Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 3.200 y 6.400 células y 10% ECM recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS	○ Densidad demasiado elevada, las células parecen no crecer adecuadamente en la matriz
Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 3.200 y 6.400 células y 5% ECM recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS	○ Densidad demasiado elevada o presenta algún problema adicional. Descarte de la matriz.
Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 3.200 y 6.400 células y matriz colágeno 1,5 mg/ml recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS	○ Cantidad de células óptima: 6.400 células totales ○ Densidad y matriz adecuada: matriz colágeno 1,5 mg/ml ○ CONDICIONES ADECUADAS PARA EL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR
Cultivo de SH-SY5Y en 3D a 6.400 células y matriz colágeno 1,5 mg/ml recubiertas con medio completo DMEM 10% FBS y medio DMEM 5% FBS+30μM ATRA	○ Condiciones adecuadas para el crecimiento, diferenciación y contactos célula-célula.

7.5. Anexo 5. Estudio del comportamiento de la línea celular SH-SY5Y en chips de microfluídica

Anexo 5.1 (estudio del comportamiento, crecimiento y morfología de las líneas celulares HeLa y SH-SY5Y).

Las imágenes vistas a continuación con el microscopio Leica muestran el comportamiento y crecimiento de la línea celular HeLa en un intervalo de 24 horas.

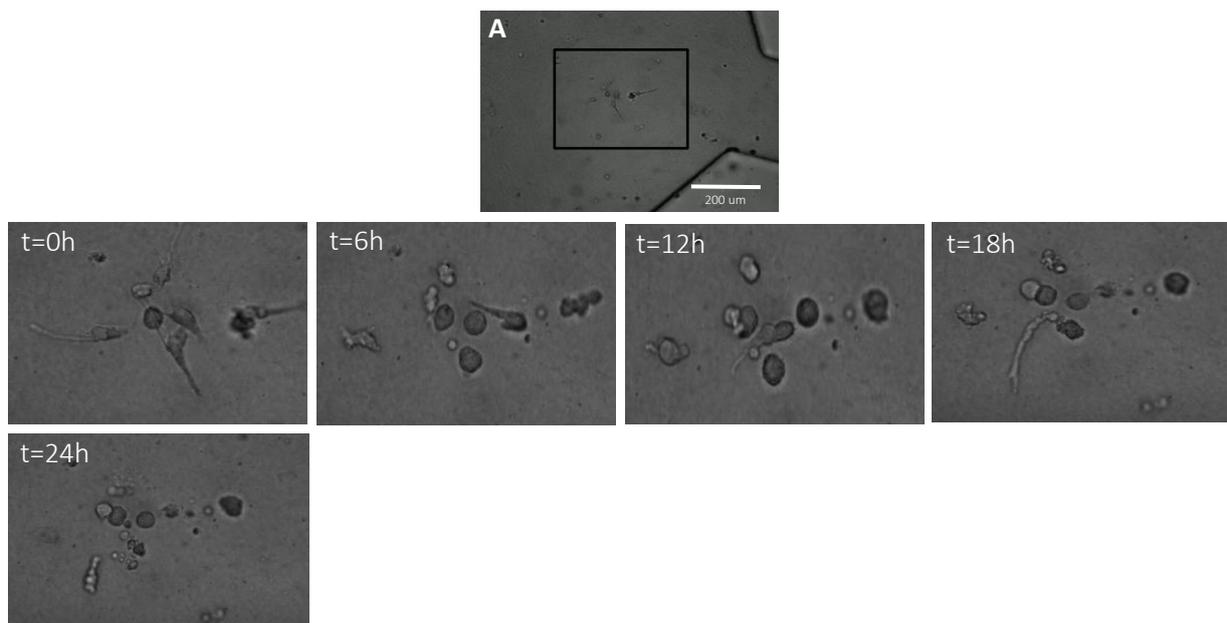


Figura A18. Sucesión de fotos del zoom de una zona representativa (recuadro marcado en la imagen A) del timelapse de 24h, enfocado a 80 micras respecto al plano inferior del chip, de las células HeLa vistas en campo claro a 100 aumentos. Se observa que esta línea celular tiende a crecer en grupos de 5-6 células y formar protrusiones. Estas se van retrayendo y estableciendo cada cierto tiempo hasta que las células terminan muriendo por falta de nutrientes o densidad de la matriz. La formación de estas protrusiones puede ser producto del intento de desplazamiento o adquisición de factores de crecimiento de las células. Barra escalado: 200 μ m.

La siguiente figura incluye la sucesión de fotos del timelapse realizado mediante el microscopio Leica donde se observa el crecimiento y morfología que adquieren las células SH-SY5Y en los chips de microfluídica.

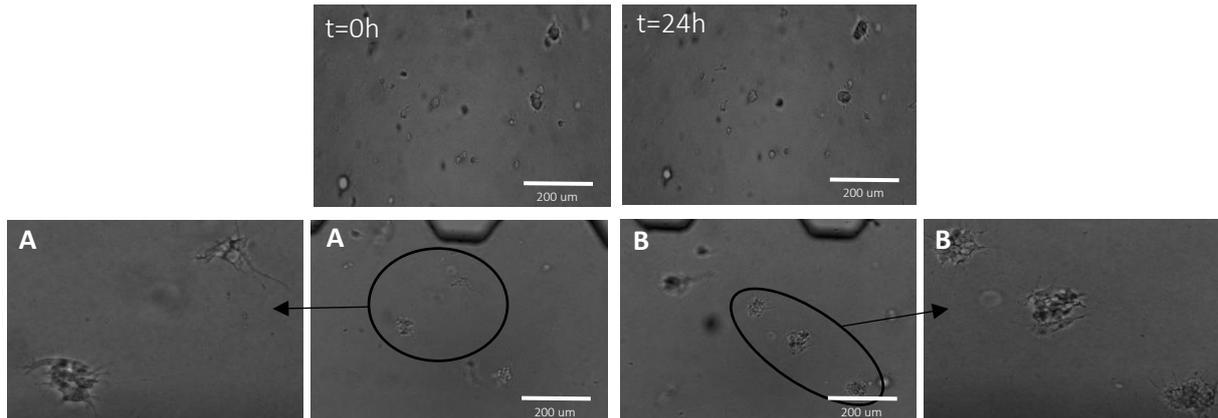


Figura A19. Imágenes superiores, sucesión de fotos representativas del timelapse de 24h, enfocado a 60 micras, de la línea SH-SY5Y vistas en campo claro a 100 aumentos sin medio de diferenciación. Imágenes inferiores (A y B), fotos representativas del timelapse de 24h, enfocadas a 80 micras, de las células SH-SY5Y vistas en campo claro a 100 aumentos tratadas con ATRA junto con zoom de zonas representativas de las zonas marcadas con círculos negros. Las distintas imágenes corresponden a distintos planos Z (stack de planos) donde se encuentran cada una de las células. En las imágenes A y B se distinguen pequeñas ramificaciones características de las células diferenciadas. Sin embargo, siguen sin ser capaces de desplazarse ni establecer conexiones entre ellas. Prácticamente la totalidad de las células crecen formando agregados. En algunos casos se forman protrusiones lo que puede ser indicativo de que intentan desplazarse por la matriz, aun así, se siguen manteniendo estáticas. Barra escalado: 200 μ m.

7.6. Anexo 6. Estudio del comportamiento de la línea celular SH-SY5Y en μ -slides (Ibidi)

Anexo 6.1 (análisis del crecimiento de la línea celular SH-SY5Y cultivada en matrices ECM, diluida 1/10 y 1/20, y colágeno). Las siguientes figuras muestran el comportamiento, crecimiento y diferenciación de las células SH-SY5Y cultivadas en 3D en matrices ECM y colágeno.

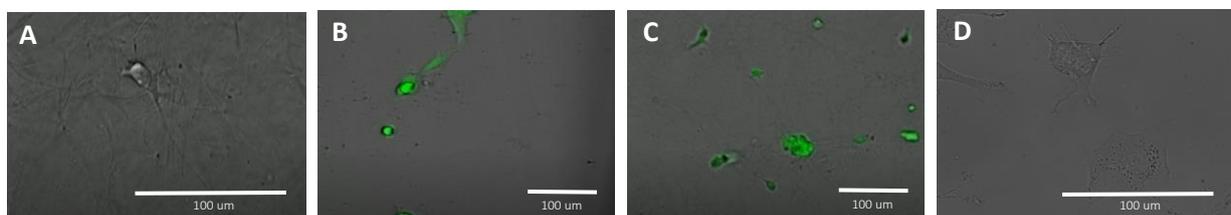


Figura A20. Análisis del comportamiento y crecimiento de la línea SH-SY5Y en matriz colágeno. El estudio se realiza a partir de stacks de planos Z (1 micra/plano Z). A. Stack planos Z (1 micra/plano Z) del canal 3 (6.400 SH-SY5Y con matriz colágeno) vistas a 400 aumentos en DIC. B y C. Stacks planos Z de regiones representativas del canal 3 vistas a 200 aumentos con el fluorocromo calceína. D. Stack planos Z del canal 4 (12.800 SH-SY5Y con matriz colágeno) vistas a 400 aumentos en campo claro. Barra escalado: 100 μ m.

Anexo 6.2 (análisis del crecimiento y diferenciación de la línea celular SH-SY5Y cultivada en matriz colágeno). Las imágenes de la figura A21 determinan el comportamiento de la línea celular, frente a la adición de ATRA al medio, cultivadas en matriz colágeno.

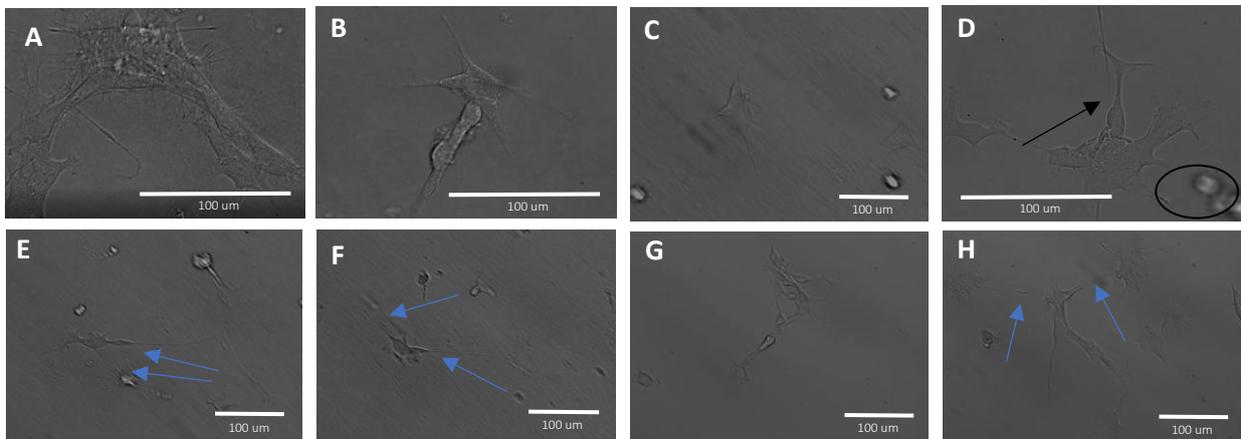


Figura A21. Estudio del crecimiento y diferenciación de las SH-SY5Y cultivadas en monocapa y 3D en matriz colágeno a partir de stacks planos Z (1 micra/plano Z). A. Stack planos Z del canal 1 (3.200 SH-SY5Y en colágeno sin ATRA) vistas a 400 aumentos en DIC. B. Stack planos Z del canal 2 (3.200 SH-SY5Y en colágeno con ATRA) vistas a 400 aumentos en DIC. C. Stack planos Z del canal 3 (6.400 SH-SY5Y en colágeno sin ATRA) vistas a 200 aumentos en IMC. D. Stack planos Z del canal 3 (6.400 SH-SY5Y en colágeno sin ATRA) vistas a 400 aumentos en DIC. Se distinguen lamelipodios (flecha negra) lo que recalca el crecimiento en monocapa a diferencia de las células situadas en el borde de la imagen (círculo) que crecen en 3D. E y F. Stack planos Z del canal 4 (6.400 SH-SY5Y en colágeno con ATRA) vistas a 200 aumentos en IMC. G. Stack planos Z del canal 5 (3.200 SH-SY5Y en monocapa sin ATRA) vistas a 200 aumentos en IMC. H. Stack planos Z del canal 6 (3.200 SH-SY5Y en monocapa con ATRA) vistas a 200 aumentos en IMC. En todos los casos se observa una alta interacción y conexión celular. Las flechas azules resaltan las neuritas formadas en respuesta a la adición de ATRA al medio. Barra escalado: 100 μ m.

7.7. Anexo 7. Análisis del efecto de la adición de fibras de α -sinucleína

Anexo 7.1 (efecto de la adición exógena de fibras de aSyn fusionada al fluorocromo Alexa Fluor™ 488).

Las siguientes figuras muestran el efecto de la adición de aSyn en la viabilidad, crecimiento y contactos célula-célula en la línea modelo.

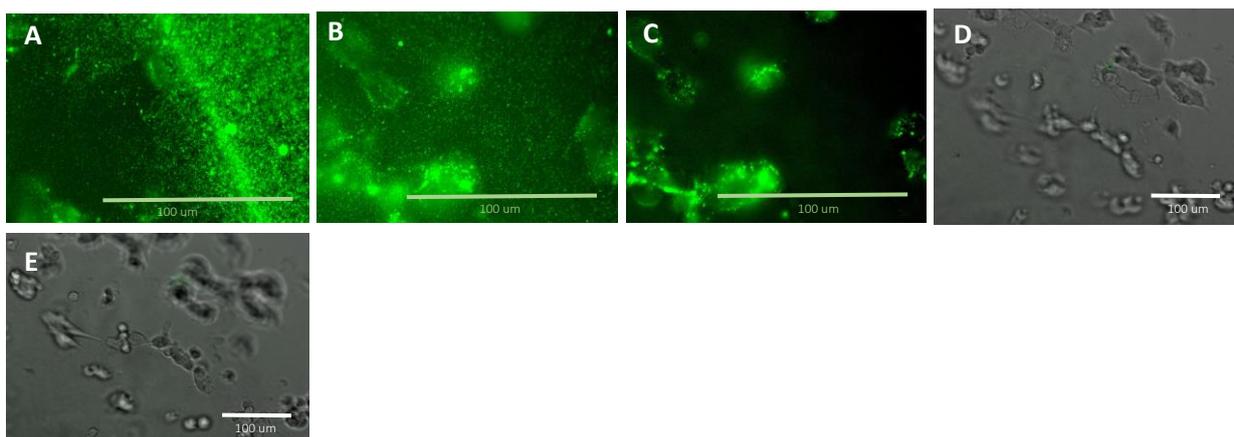


Figura A22. Efecto de la adición exógena de fibras de α -sinucleína fusionada al fluorocromo Alexa Fluor™ 488 en la viabilidad, crecimiento y contactos célula-célula en la línea modelo, SH-SY5Y. A-C. Fotos del canal que contiene 6.400 SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno vistas a 630 aumentos con el filtro para GFP con el cual se observan los lugares donde se dispone la α -sinucleína. A. Zona que no contiene SH-SY5Y para ver la fluorescencia emitida por la α -sinucleína que se ha quedado pegada en la matriz. B. Zona que contiene SH-SY5Y para comparar la diferencia de fluorescencia emitida por la α -sinucleína que se ha quedado pegada en la matriz y la α -sinucleína que ha sido endocitada en las células. C. Misma zona que la imagen B, pero enfocada 5 micras por encima. D y E. Stack planos Z (1 micra/plano Z) de SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno tras 30 min de la adición de α -sinucleína y 20 min de lavado del pocillo vistas a 200 aumentos en DIC y GFP superpuestas. En este caso apenas se observa fluorescencia emitida por las células ya que la intensidad irradiada por la α -sinucleína que se ha adherido a la matriz es mucho mayor. Barra escalado: 100 μ m.

7.8. Anexo 8. URLs y Códigos QR de los distintos vídeos que analizan el comportamiento de la línea celular SH-SY5Y

1. Cultivo en 3D mediante gota

- 1.1. Estudio del comportamiento de la línea SH-SY5Y cultivada en 25, 50 y 100% de matriz ECM.

https://drive.google.com/file/d/1O4QkcioAJn_0CKLxMhKVC6KrArHqPFSX/view?usp=sharing



- 1.2. Análisis del crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y cultivada en 60 y 80% de matriz ECM, junto con la adición del fluorocromo Hoechst que permite el estudio de la viabilidad.

<https://drive.google.com/file/d/1rlDocM5YNtpbjioCNYoeBLxEvHBF6DY/view?usp=sharing>



- 1.3. Contraste y comparación del comportamiento de la línea SH-SY5Y cultivada en 30 y 50% de matriz ECM y colágeno.

https://drive.google.com/file/d/1Ow1qy_5X34K5sLudAZE1Y0OVRGI9ipu1/view?usp=sharing



- 1.4. Estudio del comportamiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y cultivada en monocapa y 3D en 5 y 10% matrices ECM y colágeno

- 1.4.1. Contraste comportamiento y diferenciación SH-SY5Y cultivadas en matriz ECM (1/10 y 1/20) con y sin ATRA

<https://drive.google.com/file/d/162ZYLcyPthBXDV2xuH1zpnUuOOGWo8A/view?usp=sharing>



- 1.4.2. Cotejo crecimiento y diferenciación SH-SY5Y cultivadas en colágeno con y sin ATRA

<https://drive.google.com/file/d/1qRDmRF6bFyb-jhrsZAKClrGqLyH0qEA/view?usp=sharing>



- 1.4.3. Análisis crecimiento y diferenciación SH-SY5Y cultivadas en monocapa con y sin ATRA

<https://drive.google.com/file/d/1TbPxaFuAqI6MPHnGfMGZv4J8N60wixzl/view?usp=sharing>



2. Chips de microfluídica

2.1. Ensayo del crecimiento y comportamiento de las líneas celulares SH-SY5Y y HeLa en chips de microfluídica.

https://drive.google.com/file/d/1Ht_uADAx45k51a_nldknoze1Ujk8YPIO/view?usp=sharing



2.2. Comparación del crecimiento y diferenciación de la línea SH-SY5Y en chip.

<https://drive.google.com/file/d/1ZKrC-q71Dax604XiAwaSh90p9AQSVFOd/view?usp=sharing>



3. Micro-slides

3.1. Análisis comportamiento SH-SY5Y cultivadas en 5 y 10% de matriz ECM y colágeno

<https://drive.google.com/file/d/1fhFFGDIrzTXQacseBu1RyQewRzAReclF/view?usp=sharing>



3.2. Análisis comportamiento y diferenciación SH-SY5Y en cultivadas en matriz colágeno

<https://drive.google.com/file/d/15MnLUYmfCNqDNqu5eh0I7WB60kY7pl70/view?usp=sharing>



4. Tratamiento con aSyn exógena

4.1. Efecto aSyn en SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno

https://drive.google.com/file/d/1dBDZWU1bvZwKz6o4duyQIEjOz1_1IsZX/view?usp=sharing



4.2. Ensayo control para determinar la causa de muerte celular. Efecto aSyn en SH-SY5Y cultivadas en monocapa

<https://drive.google.com/file/d/1CUwET6PmnUXvbtESqvjObFqtSfs0u2fy/view?usp=sharing>

