

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 $100 \text{ células totales} / 5 \text{ µl} = 20 \text{ células/µl}$.
- 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: $20 \text{ células/µl} \cdot 50 \text{ µl} = 1.000 \text{ células}$
- 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: $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 40.000 \text{ cél/ml} \cdot V_1 = 1.000 \text{ cél totales}$, 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 $20 \text{ µl} + 6 \text{ µl}$ 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 $20 \text{ µl} + 4 \text{ µl}$ 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.

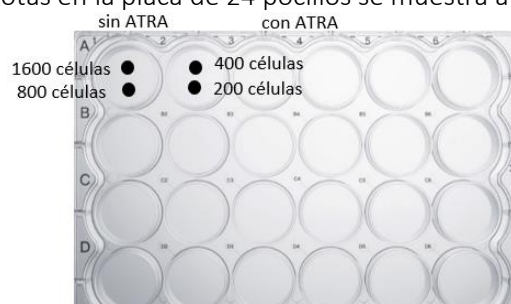


Figura A1. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 24 pocillos. En la parte superior se indican los pocillos que se han sometido a un proceso de diferenciación y, por tanto, contienen ATRA, y los que no. Cada punto hace referencia a la gota (2 gotas por pocillo)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

$$3,25 \cdot 10^5 \text{ células/ml} \cdot 8\text{ml} = 2,6 \cdot 10^6 \text{ células totales en el flask de } 25\text{cm}^2$$

$$\rightarrow 2,6 \cdot 10^6 \text{ células} / 25\text{cm}^2 = 104.000 \text{ células/cm}^2$$

- 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.

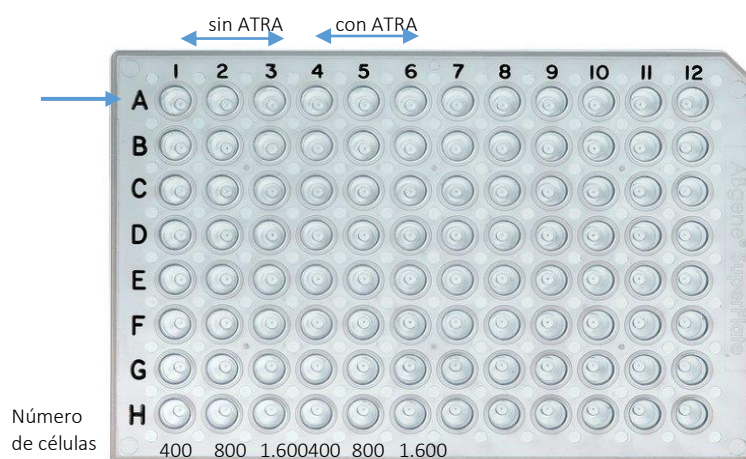


Figura A2. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 96 pocillos. La flecha azul a la izquierda indica la fila en la que se han añadido las células con los distintos tratamientos. En la parte superior se esquematiza los pocillos que han sido tratados con ATRA 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:

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

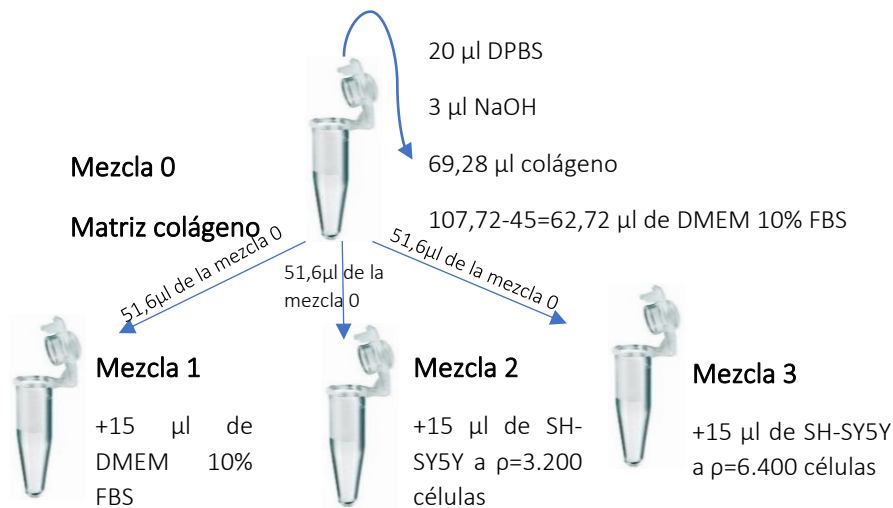


Figura A3. Ilustración esquemática del protocolo de formación de las gotas con matriz colágeno. La mezcla 0 contiene los componentes necesarios para neutralizar el pH y el volumen de DMEM 10% FBS menos la diferencia utilizada para las 3 mezclas consecuentes. Esta mezcla se reparte en 3 microtubos que 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.

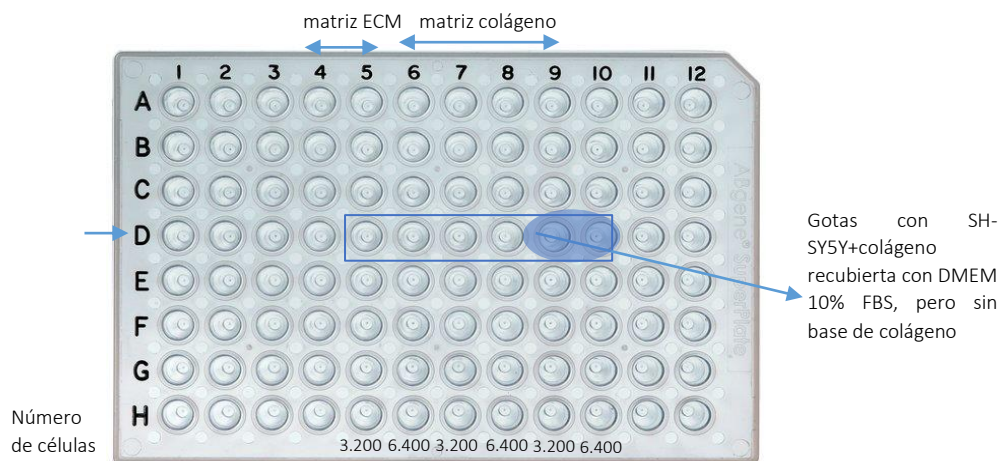


Figura A4. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 96 pocillos. La flecha azul a la izquierda indica la fila en la que se han añadido las células con los distintos tratamientos. En la parte superior se esquematizan los pocillos que han sido cultivados con matriz 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	[\square] 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

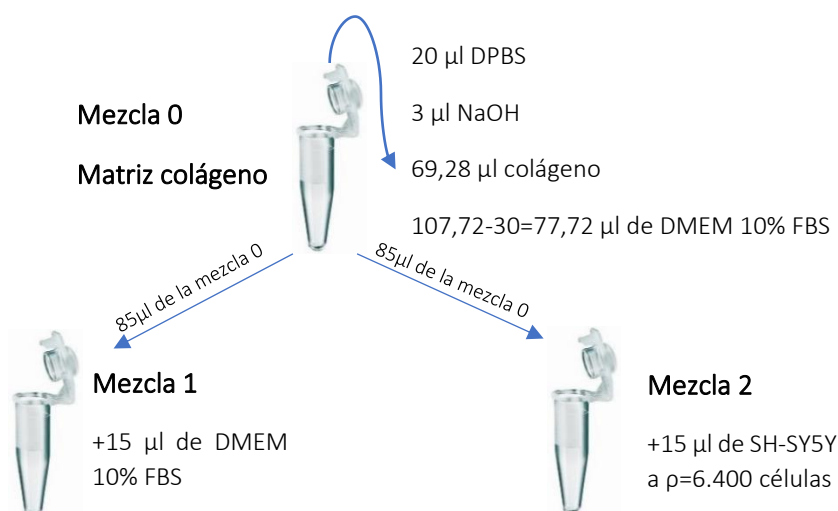


Figura A5. Ilustración esquemática del protocolo de formación de las gotas con matriz colágeno.

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	[] 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 µl	356 células/µl	17800 células	222,5 µl
1/20	19 µl	337 células/µl	16800 células	210 µl

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

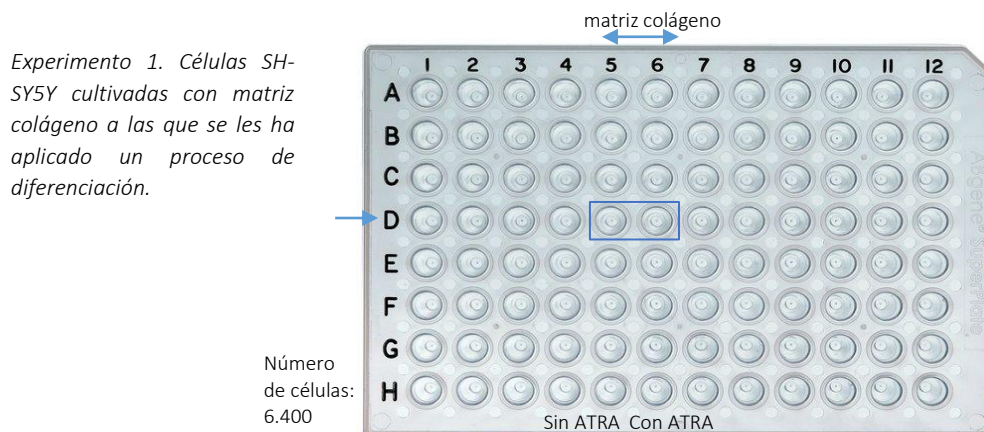


Figura A6. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 96 pocillos. La flecha azul a la izquierda indica la fila en la que se han añadido las células. En la parte inferior se indican los pocillos que se han usado con medio de diferenciación y sin medio para diferenciar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

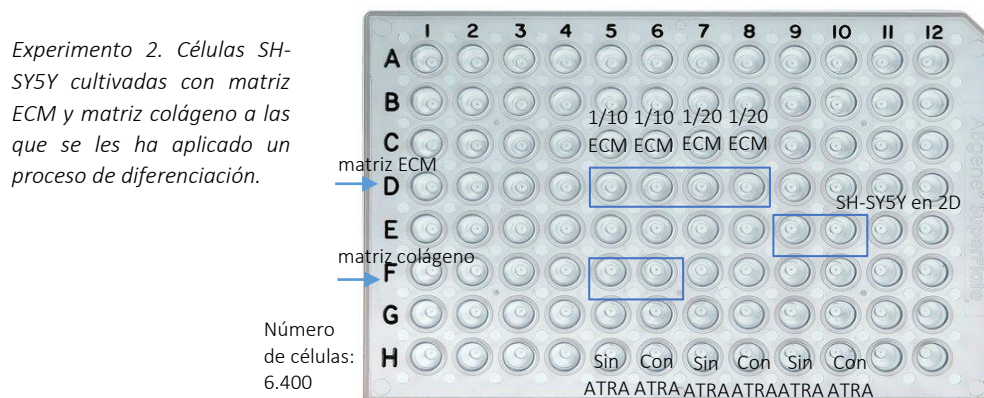


Figura A7. Representación esquemática de los distintos tratamientos realizados en la placa de 96 pocillos. La flecha azul a la izquierda indica la matriz utilizada en cada caso. En la parte inferior se esquematizan los pocillos que han sido cultivados con medio de diferenciación y sin medio para diferenciar 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

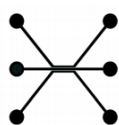


Figura A8. Izda. Imagen real del chip de microfluídica. Dcha. Esquema de un chip de microfluídica. Los puntos negros hacen referencia a los pocillos donde se cargan las muestras. Las líneas son los canales que convergen en la parte central implicada en la transferencia de nutrientes y gases disueltos. 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.

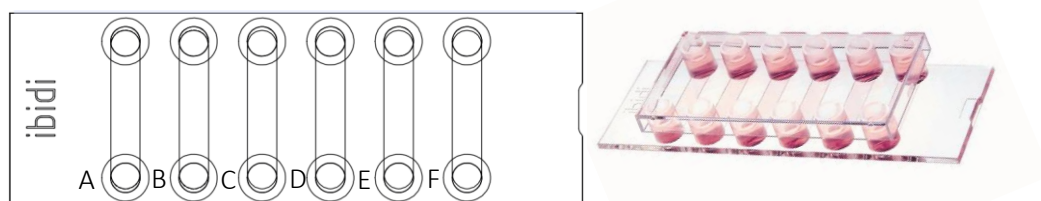


Figura A9. Izda. Configuración de los 6 tratamientos realizados en el μ -slide. A. SH-SY5Y a 12.800 células totales cultivadas con ECM 1/10. B. SH-SY5Y a 12.800 células totales cultivadas con ECM 1/20. C. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml. D. SH-SY5Y a 12.800 células totales 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:

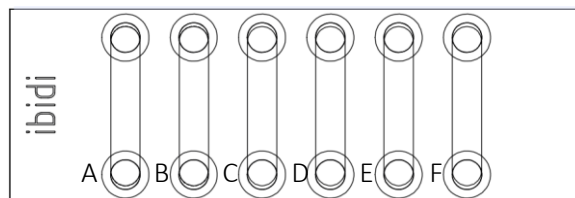


Figura A10. Configuración de los 6 tratamientos realizados en el µ-slide. A. SH-SY5Y a 3.200 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml en medio completo. B. SH-SY5Y a 3.200 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml con medio de diferenciación. C. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas 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:

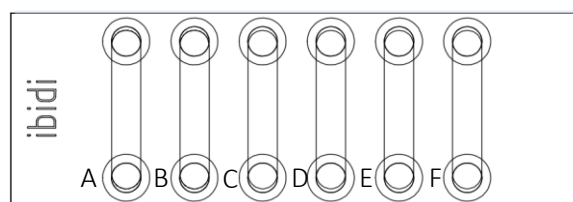


Figura A11. Configuración de los tratamientos realizados en el μ -slide. A-C. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas con colágeno 1,5 mg/ml en medio completo por triplicado. D-F. SH-SY5Y a 6.400 células totales cultivadas en monocapa en medio completo por triplicado. Se realizan estos ensayos por 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 \cdot 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.

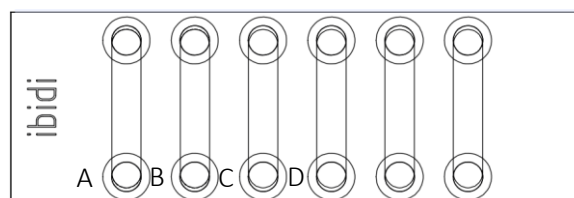


Figura A12. Configuración del experimento control en el μ -slide. A. SH-SY5Y a 30.000 células totales cultivadas en monocapa en medio completo a las que se les ha adicionado α -sinucleína marcada. B. SH-SY5Y a 30.000 células totales cultivadas en monocapa en medio completo tratadas con α -sinucleína 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.

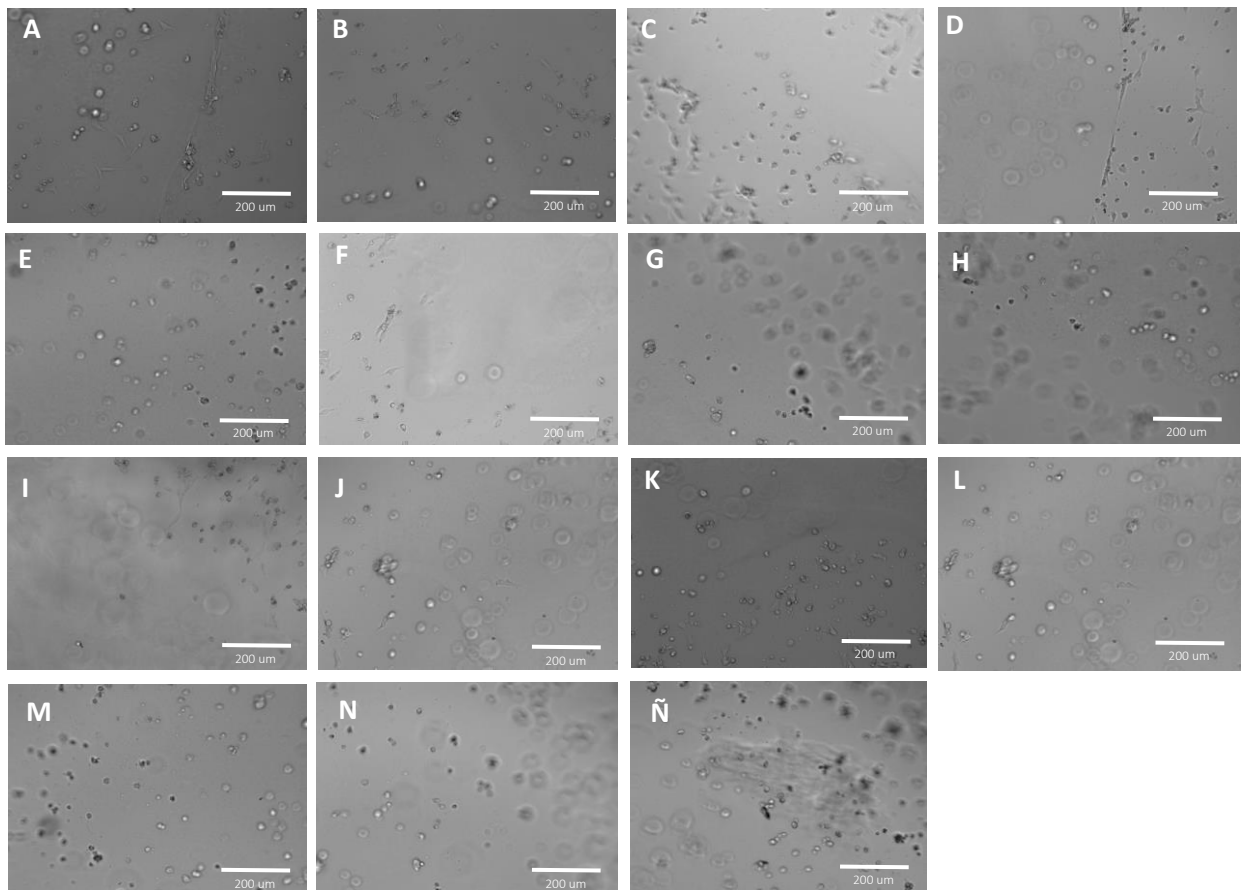


Figura A13. Células SH-SY5Y crecidas y diferenciadas mediante cultivo 3D en gota vistas en campo claro a 100 aumentos. A. Gota que contiene 200 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas en medio de diferenciación. B. Gota que contiene 200 células SH-SY5Y al 100% de matriz ECM cultivadas sin medio 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 grumos. 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.

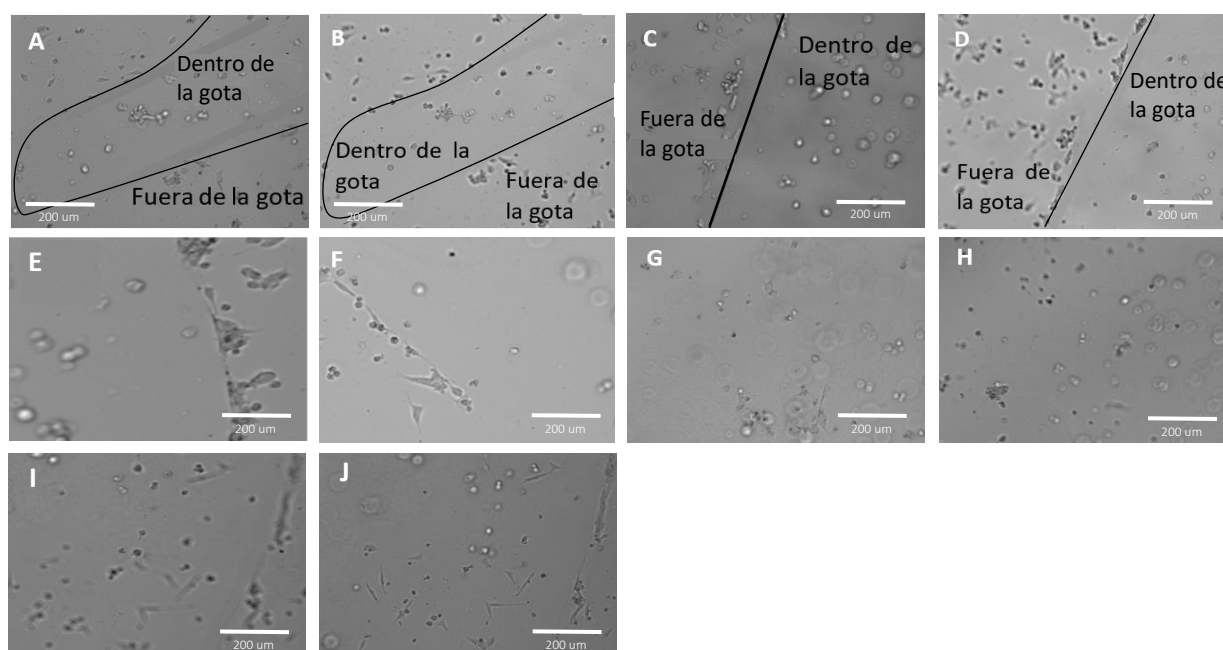


Figura A14. Células SH-SY5Y crecidas en monocapa y mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 aumentos en campo claro. Todas las imágenes están cultivadas en matriz al 80%. A y B. Gota que contiene 200 células cultivadas con medio de diferenciación. C, D y E. Gota que contiene 800 células cultivadas en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

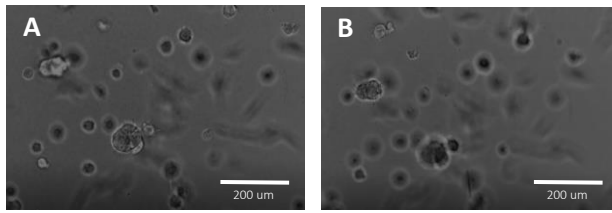


Figura A15. Células SH-SY5Y crecidas mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 aumentos en campo claro a dos enfoques distintos. Estas imágenes están cultivadas en matriz al 60% y contienen 1.600 células cultivadas en medio de diferenciación. Barra escalado: 200 μ m.

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.

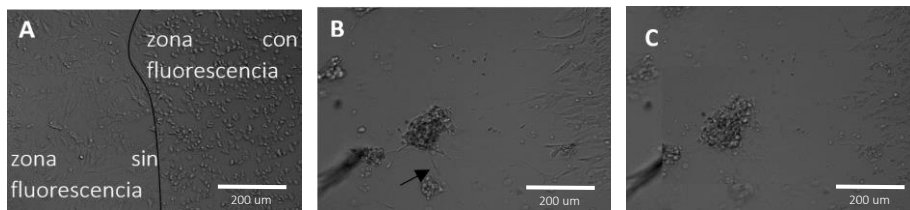


Figura A16. Imagen A. Gota que contiene 200 células al 60% de matriz ECM cultivadas con DMEM 10 % FBS crecidas en monocapa (2D) y mediante cultivo 3D en gota vistas a 100 aumentos en campo claro. Se distingue (marcado con una línea negra) el límite de la fluorescencia ya que, a partir de este límite, 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 μ m.

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.

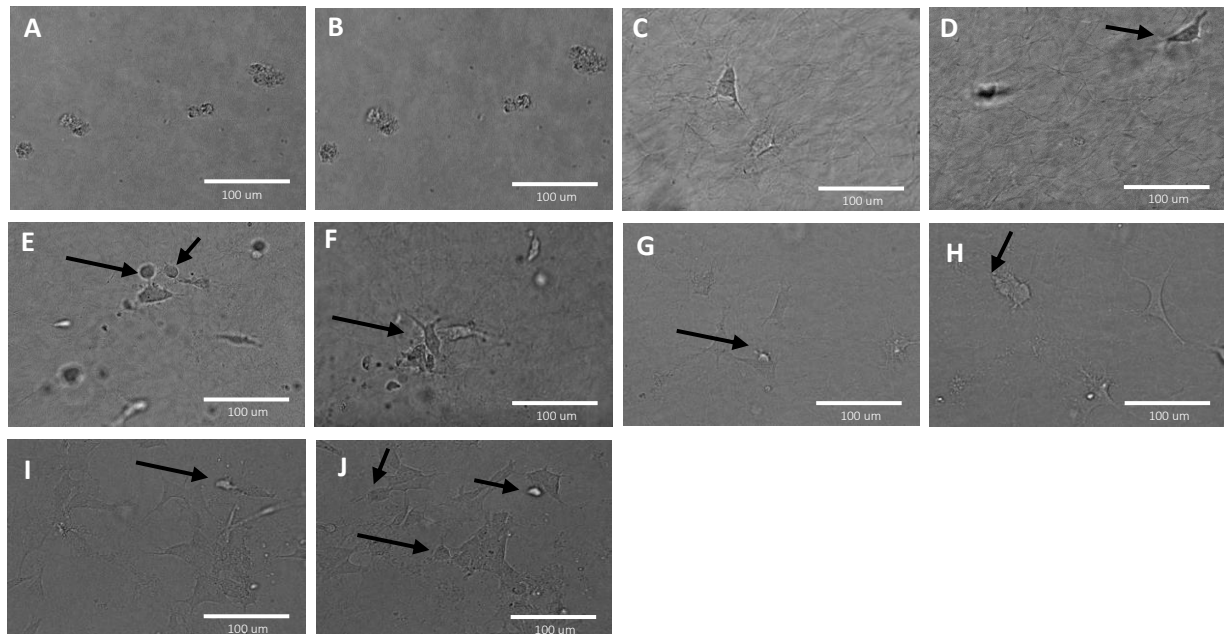


Figura A17. Células SH-SY5Y crecidas mediante cultivo 3D en gota vistas a 200 aumentos en campo claro. Imagen A y B. Células cultivadas con matriz ECM al 30% y 3.200 células. Sucesión de fotos del timelapse de 24 h. La densidad de la matriz es demasiado elevada e impide el desplazamiento de las células. 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.

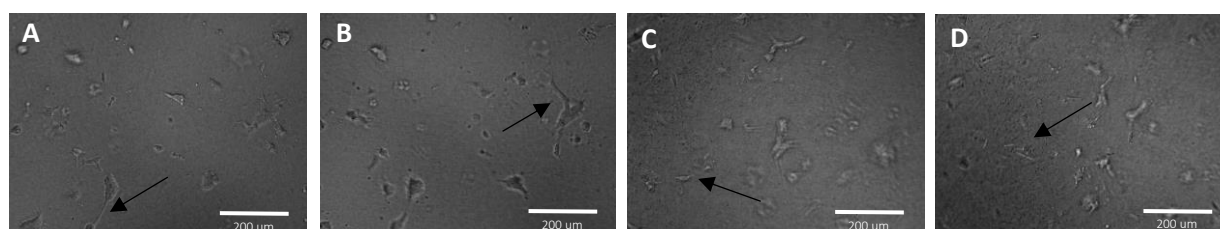


Figura A18. Estudio del comportamiento, crecimiento, viabilidad, diferenciación y contactos célula-célula de las células SH-SY5Y con 6.400 células totales cultivadas en 3D en matriz de colágeno. A y B. Timelapse de 24h, enfocado a 20 y 40 micras, respectivamente, con respecto a la base del pocillo, de 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.

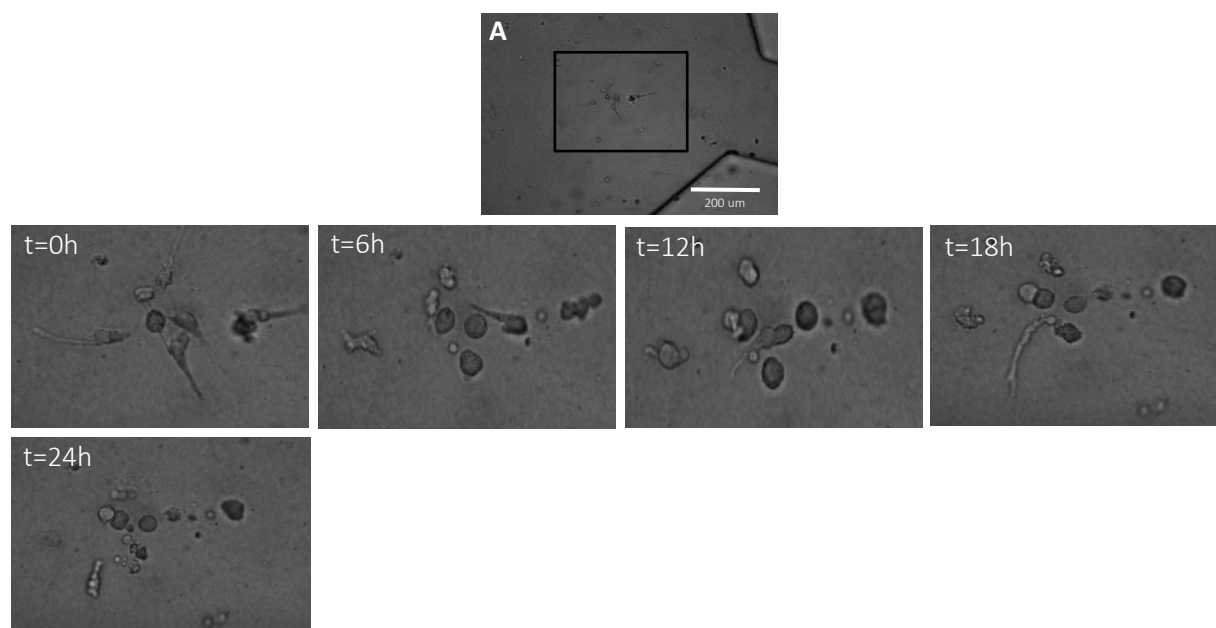


Figura A18. Sucesión de fotos del zoom de una zona representativa (recuadro marcado en la imagen A) del timelapse de 24h, enfocado a 80 micras respecto al plano inferior del chip, de las células HeLa vistas en campo claro a 100 aumentos. Se observa que esta línea celular tiende a crecer en grupos de 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 μm .

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.

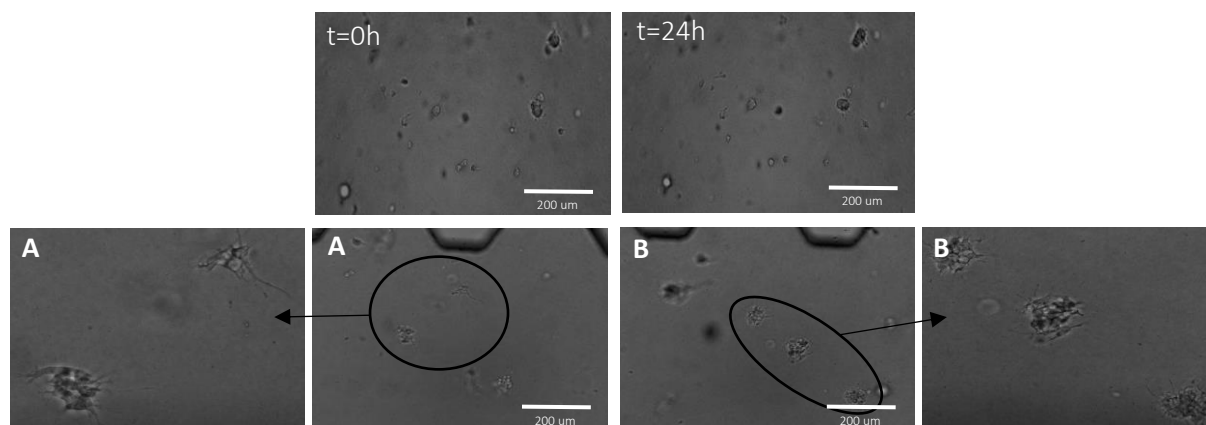


Figura A19. Imágenes superiores, sucesión de fotos representativas del timelapse de 24h, enfocado a 60 micras, de la línea SH-SY5Y vistas en campo claro a 100 aumentos sin medio de diferenciación. Imágenes inferiores (A y B), fotos representativas del timelapse de 24h, enfocadas a 80 micras, de las células 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 μm .

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.

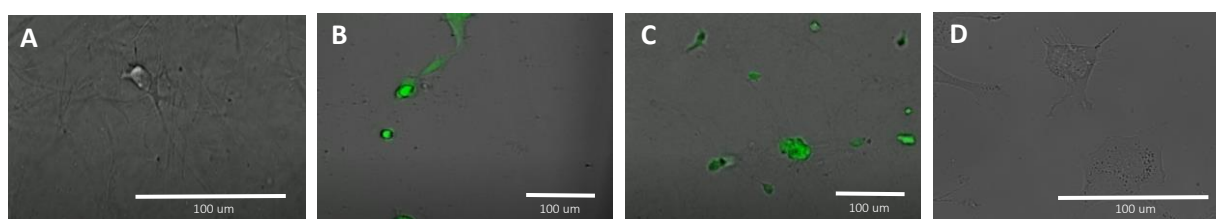


Figura A20. Análisis del comportamiento y crecimiento de la línea SH-SY5Y en matriz colágeno. El estudio se realiza a partir de stacks de planos Z (1 micra/plano Z). A. Stack planos Z (1 micra/plano Z) del canal 3 (6.400 SH-SY5Y con matriz colágeno) vistas a 400 aumentos en DIC. B y C. Stacks planos 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 μm .

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.

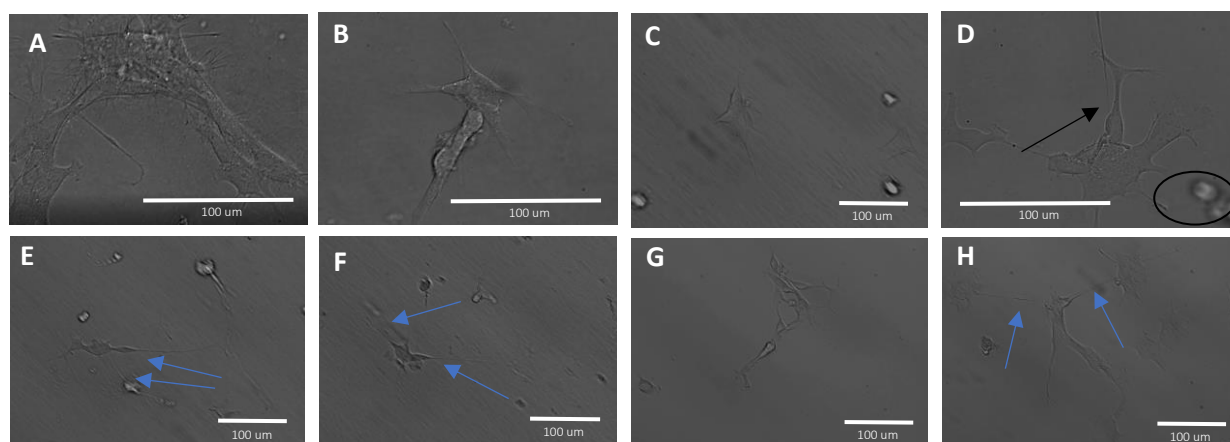


Figura A21. Estudio del crecimiento y diferenciación de las SH-SY5Y cultivadas en monocapa y 3D en matriz colágeno a partir de stacks planos Z (1 micra/plano Z). A. Stack planos Z del canal 1 (3.200 SH-SY5Y en colágeno sin ATRA) vistas a 400 aumentos en DIC. B. Stack planos Z del canal 2 (3.200 SH-SY5Y 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 de esta célula 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.

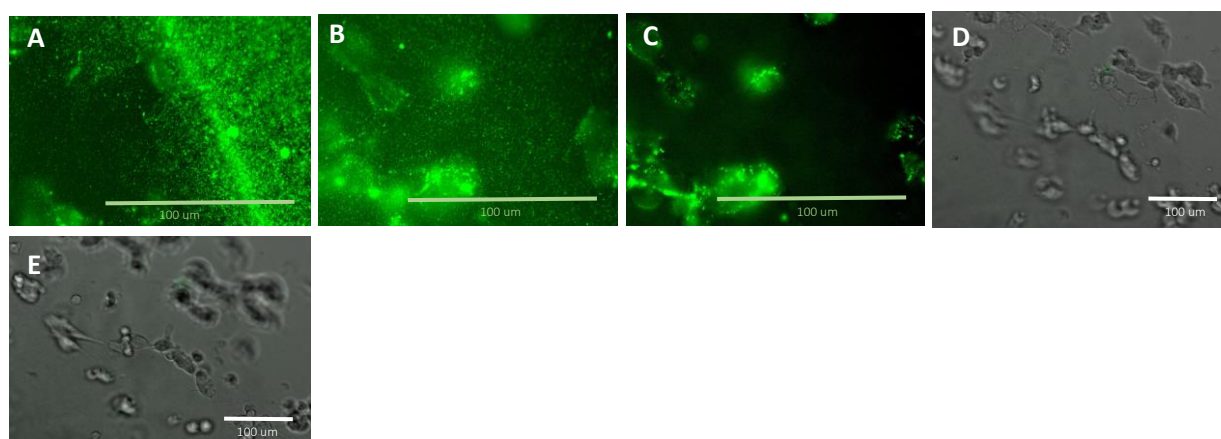


Figura A22. Efecto de la adición exógena de fibras de α -sinucleína fusionada al fluorocromo Alexa Fluor™ 488 en la viabilidad, crecimiento y contactos célula-célula en la línea modelo, SH-SY5Y. A-C. Fotos del canal que contiene 6.400 SH-SY5Y cultivadas en matriz colágeno vistas a 630 aumentos con el 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 pegado 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 superpuestos. 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/162ZYLcyPthBXDV2xuH1zpnuUhOOGWo8A/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/1fhFFGDIrTXQacseBu1RyQewRzAReclF/view?usp=sharing>



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

<https://drive.google.com/file/d/15MnLUYmfCNqDNQu5eh0I7WB60kY7pI70/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>

