

O USO DE MODELOS CELULARES 3D DE ESFEROIDES TUMORAIS COMO UMA PLATAFORMA ALTERNATIVA PRÉ-CLÍNICA ENTRE O CULTIVO DE CÉLULAS EM MONOCAMADAS E O USO DE MODELOS ANIMAIS NA PESQUISA E TRIAGEM DE NOVAS TERAPIAS ANTICÂNCER

Data de submissão: 06/04/2023

Data de aceite: 02/05/2023

Jéssica Eduarda dos Santos Batista

Laboratório de Bioquímica Celular,
Departamento de Bioquímica/ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/1851661530280527>

Valquíria Silva da Silva

Laboratório de Bioquímica Celular,
Departamento de Bioquímica/ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/3999606852340811>

Fábio Klamt

Laboratório de Bioquímica Celular,
Departamento de Bioquímica/ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
<http://lattes.cnpq.br/3256932358053453>

para triagem de novos compostos com potencial terapêutico, em alternativa ao uso de animais. Porém, quando cultivadas em monocamadas (em modelos bidimensionais -2D), são incapazes de reproduzir totalmente diversas propriedades e características fisiológicas da citoarquitetura teciduais, em especial de tumores sólidos. Por isso, tem-se utilizado métodos de cultivo que representam de forma mais fidedigna as células em ambiente fisiológico, como o cultivo celular tridimensional (3D). Esses cultivos são especialmente úteis para estudar como tumores sólidos respondem a novas drogas anticâncer. Existem diferentes protocolos de cultivo 3D que podem ser utilizados que são úteis para reproduzir a heterogeneidade celular de tumores sólidos e como as células cancerígenas se movimentam e invadem outros tecidos, o que é importante para novos tratamentos aplicados na clínica. Buscamos aqui revisar os principais métodos relacionados com o cultivo de tumores em 3D, salientando seus pontos positivos e suas limitações como plataformas pré-clínicas de pesquisa oncológica e na triagem de novas drogas anticâncer.

PALAVRAS-CHAVE: Esferoides tumorais, modelos de cultivo celular, cultivo

RESUMO: O cultivo celular em laboratório é um marco importante para a ciência porque nos permite estudar o funcionamento das células do nosso corpo, mimetizando em ambiente pré-clínico parâmetros associados à doenças, e servindo de modelo inicial

tridimensional.

THE USE OF 3D CELL MODELS OF TUMOR SPHEROIDS AS A PRECLINICAL ALTERNATIVE PLATFORM BETWEEN CULTURE OF MONOLAYERS CELLS AND THE USE OF ANIMAL MODELS IN THE RESEARCH AND SCREENING OF NEW ANTI-CANCER THERAPIES

ABSTRACT: Cell culture in the laboratory is an important milestone for science because it allows us to study the functioning of our body's cells, mimicking disease-associated parameters in a preclinical environment, and serving as an initial model for screening new compounds with therapeutic potential, in alternative to the use of animals. However, when cultivated in monolayers (in two-dimensional models - 2D), they are unable to fully reproduce several properties and physiological characteristics of tissue cytoarchitecture, especially of solid tumors. For this reason, cultivating methods have been used that more accurately represent cells in a physiological environment, such as three-dimensional (3D) cell cultures. These cultures are especially useful for studying how solid tumors respond to new anticancer drugs. There are different 3D culture protocols that can be used that are useful to reproduce the cellular heterogeneity of solid tumors and how cancer cells move and invade other tissues, which is important for new treatments applied in the clinic. We seek here to review the main methods related to the cultivation of tumors in 3D, emphasizing their strengths and limitations as preclinical platforms for oncological research and in the screening of new anticancer drugs. **KEYWORDS:** Tumor spheroids, cell culture models, three-dimensional culture.

1 | INTRODUÇÃO

O cultivo celular tem grande importância para o meio científico, pois permite a utilização de células humanas no estudo de processos moleculares, minimizando o uso de animais em pesquisas e em sintomia com a filosofia do 3R (do inglês, *Replacement, Reduction, and Refinement*). Apesar o cultivo celular em monocamada (2D) ser o modelo *in vitro* mais comumente usado devido ao seu fácil manuseio, sua reprodutibilidade, e baixo custo, ele é incapaz de reproduzir totalmente as propriedades dos tumores sólidos. Dado isso, há um grande interesse no desenvolvimento de opções de cultivos celulares que reproduzam de forma mais fidedigna as características encontradas em tumores *in vivo*, por exemplo, para o estudo do comportamento de células tumorais diante de drogas anticâncer (Prestwich, 2008). No início dos anos de 1900, Harrison desenvolveu uma maneira de manter células vivas de anfíbios em seu laboratório. Anos mais tarde, Alexis Carrel baseou-se no trabalho de Harrison para criar um líquido especial que mantinha as células do coração de galinha vivas por mais tempo. Ele percebeu que as células que ficavam mais em contato com esse líquido eram as que sobreviviam melhor e, por isso, começou a cultivá-las em uma superfície de fios de seda para que elas pudessem interagir melhor com o líquido. Isso foi uma das primeiras vezes que as células foram cultivadas em três dimensões (3D). Na década de 40, Johannes Holtfreter desenvolveu uma nova maneira de cultivar células em 3D. Ele usou ágar (um hidrocólóide fortemente gelatinoso

extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas que consiste em uma mistura heterogênea de dois polissacarídeos, agarose e agarpectina) como base para impedir que as células se aderissem nas placas de cultivo, e desenvolveu um aparelho que fazia a cultura rotacionar. A partir dos anos 50, esse jeito de cultivar células começou a ficar mais popular entre os cientistas e melhorias foram sendo feitas (Amaral *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2018).

Embora o modo de tradicional de cultivo celular em monocamada seja valioso na compreensão de muitos processos biológicos, ele não consegue reproduzir de forma adequada a organização e proliferação celular em tumores. Ainda assim, é a forma mais utilizada de avaliar medicamentos anticâncer em laboratório (Costa *et al.*, 2016). No cultivo em monocamada, as células apresentam uma morfologia bidimensional, estabelecendo predominantemente interações entre a célula e o substrato da garrafa ou placa de cultivo. Isso difere significativamente da organização tridimensional presente em tecidos e órgãos humanos, resultando em uma falta de mimetismo com o sistema fisiológico. Dessa forma, características da biologia celular, como a produção de proteínas de matriz extracelular e de ancoragem, a expressão de genes importantes, a heterogeneidade tecidual, e a atividade metabólica, são pouco representativas do que ocorre *in vivo* (Talukdar *et al.*, 2011). Assim, a cultura tridimensional de multicamadas (3D; ou também chamada de esferoides) vêm ganhando espaço como importante ferramenta de pesquisa em pesquisa básica e aplicada (Wenzel *et al.*, 2014), e será o foco dessa revisão.

2 | CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL

O método conhecido como cultivo de células tridimensional (3D) tem demonstrado melhorias nos estudos voltados para a morfologia, monitoramento do número de células, proliferação, resposta a estímulos, diferenciação, metabolismo de fármacos e síntese de proteínas (Antoni *et al.*, 2015). A capacidade das culturas em 3D de mimetizar a maneira que as células se comportam num ambiente fisiológico, faz com que esse modelo ganhe mais notoriedade nos mais diversos estudos, como pesquisas oncológicas, de células-tronco, triagem e desenvolvimento de novos medicamentos, entre outros (Ravi *et al.*, 2015). A Tabela 1 compara os diferentes aspectos do cultivo de células em 2D e 3D, e explora as vantagens e desvantagens de ambos os métodos. Além disso, o cultivo em 3D agrupo diversos métodos de cultura de células, dependendo do tipo de experimento que está sendo realizado.

Características	Cultivo 2D	Cultivo 3D	Referências
Morfologia das células	A forma das células é pavimentosa e crescem em monocamada na placa.	A forma natural da célula é preservada, e as células crescem em agregados / esferoides 3D, e contêm várias camadas.	Costa <i>et al.</i> , 2016; Langhans, 2018
Exposição aos componentes do meio	Todas as células da cultura recebem a mesma quantidade de nutrientes e fatores de crescimento. Isso faz com que mais células sincronizem a fase do ciclo celular.	Os nutrientes não são divididos igualmente entre todas as células. As células do interior permanecem quiescentes, pois recebem menor pressão de oxigênio e nutrientes.	Dhaliwal, 2012; Costa <i>et al.</i> , 2016; Langhans, 2018
Junção celular	As junções celulares são menos comuns e representam com menor precisão as interações célula/célula fisiológicas.	As junções celulares são comuns e permitem comunicação entre as células. As células se comunicam por meio de troca de íons, moléculas pequenas e correntes elétricas.	Pontes-Soares <i>et al.</i> , 2012; Ravi <i>et al.</i> , 2015; Lang <i>et al.</i> , 2019
Diferenciação celular	A diferenciação celular é pobre.	As células são bem diferenciadas.	Imamura <i>et al.</i> , 2015; Langhans, 2018
Sensibilidade a tratamentos	As células costumam ter pouca resistência a medicamentos, fazendo parecer que drogas administradas às células foram um sucesso de tratamento. As drogas não são bem metabolizadas.	As células geralmente têm mais resistência a drogas tratamento, representando mais precisamente o efeito das drogas.	Haisler <i>et al.</i> , 2015; Langhans, 2018
Proliferação celular	As células proliferam em um ritmo anormalmente rápido.	As taxas de proliferação podem ser altas ou baixas, dependendo da técnica e dos tipos de células sendo estudado.	Ravi <i>et al.</i> , 2015; Langhans, 2018
Níveis de expressão	Os níveis de expressão de genes e proteínas são frequentemente muito diferentes em comparação com modelos <i>in vivo</i> .	Os níveis de expressão de genes e proteínas se assemelham níveis encontrados a partir de células <i>in vivo</i> .	Ravi <i>et al.</i> , 2015; Costa <i>et al.</i> , 2016; Langhans, 2018
Custo	Para estudos em larga escala, é muito mais barato do que usar a cultura 3D.	Tem um custo mais elevado e requerem mais tempo. Reduz as diferenças entre a triagem de drogas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , diminuindo a necessidade de uso de modelos animais.	Costa <i>et al.</i> , 2016
Apoptose	Drogas podem facilmente induzir apoptose nas células.	Maior resistência a apoptose induzida por drogas.	Ravi <i>et al.</i> , 2015; Costa <i>et al.</i> , 2016; Langhans, 2018
Responder ao estímulo	Representação imprecisa da resposta a estímulos mecânicos.	Representação precisa da resposta a estímulos mecânicos.	Ravi <i>et al.</i> , 2015; Costa <i>et al.</i> , 2016
Uso e análise	Altamente replicável e facilmente interpretável. Melhor para culturas de longo prazo.	Pode ser difícil replicar experimentos. Pode ser difícil interpretar os dados.	Kapałczynska <i>et al.</i> , 2018

Tabela 1: Diferenças críticas entre os modelos de cultivo em monocamada (2D) e de esferoides (3D)

Diversas técnicas são empregadas para reproduzir modelos celulares tridimensionais em laboratório. Essas técnicas são classificadas em duas categorias: se há ou não um suporte mecânico para as células se desenvolverem e crescerem. Nas técnicas que não utilizam suportes, os esferoides são criados sem o uso de plataformas artificiais para promover o crescimento das células. Em vez disso, as células crescem e se organizam naturalmente em uma estrutura tridimensional (Knight *et al.*, 2015). Existem cinco principais técnicas para criar modelos sem suporte: **cultivo em agitação** (Franchi *et al.* 2021; Khot *et al.*, 2018; Cartaxo *et al.*, 2020), **gota suspensa** (do inglês, *hanging drop*) (Djomehri *et al.*, 2018; Amaral *et al.*, 2017), **sobreposição líquida** (Costa *et al.*, 2018; Muniandy *et al.*, 2021), **levitação magnética** (Haisler *et al.*, 2013; Hoarau-Véchet *et al.*, 2018) e **técnicas microfluídicas** (Figura 1).

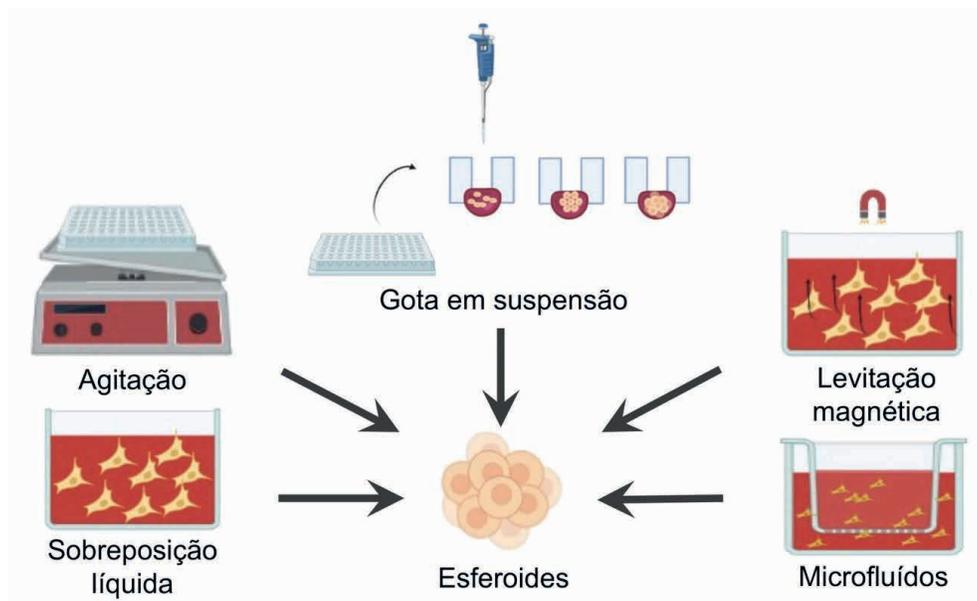


Figura 1. Técnicas para geração de modelo de câncer 3D *in vitro* sem uso de suportes.

Já nas técnicas que se baseiam em modelos com suporte, os esferoides são criados em estruturas artificiais feitas de polímeros ou outros materiais que reproduzem as condições da matriz extracelular (ECM). Estas técnicas tendem a ter um custo mais elevado dependendo do material escolhido, oferecendo suporte para o crescimento celular e permitindo que as células cresçam em condições semelhantes às dos tumores *in vivo*. Existem vários tipos de suportes, incluindo **hidrogéis**, por exemplo *Matrigel* (Flores-Torres *et al.*, 2021; Hongisto *et al.*, 2013), **suportes descelularizados** (Koh *et al.*, 2018), **fibrosos** (Girard *et al.*, 2013; Rabie *et al.*, 2022), **microesferas** (Dhamecha *et al.*, 2020; Pradhan *et al.*, 2017) e suportes **bioimpressos** em 3D (Wu *et al.*, 2016) (Figura 2) A escolha do tipo

de suporte vai depender da *expertise* do grupo de pesquisa em determinada técnica de produção desejadas.

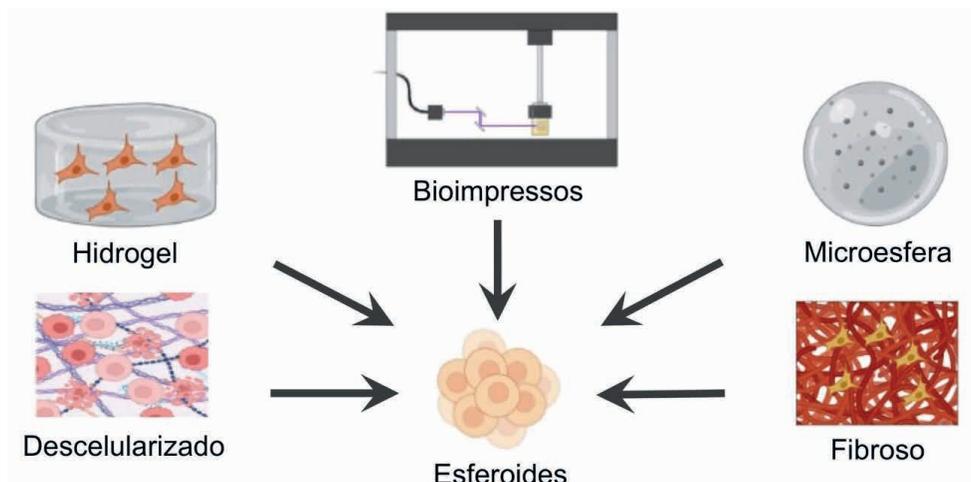


Figura 2. Técnicas para geração de modelo de câncer 3D *in vitro* com uso de suportes.

3 I CÂNCER E CULTIVO TRIDIMENSIONAL

O cultivo celular em 3D é amplamente utilizado para estudar diferentes tipos de câncer *in vitro*, por exemplo, mama (Costa *et al.*, 2014), cervical (Costa *et al.*, 2014), cólon (Ludwig *et al.*, 2013), pulmão (Amann *et al.*, 2014), pâncreas (Dufau *et al.*, 2012; Shankar *et al.*, 2011) e próstata (Takagi *et al.*, 2007; Wartenberg *et al.*, 2005a, 2005b), e suas vantagens em relação ao cultivo celular em monocamadas (2D) serão exploradas a seguir.

3.1 Heterogeneidade celular e sinalização célula-célula

O conceito atual da heterogeneidade do tumor é baseado nos princípios básicos evolutivos propostos por Darwin, sendo a essência do crescimento e desenvolvimento neoplásico. Esse princípio afirma que uma única célula somática possui característica hereditária para a proliferação com mutação, que confere uma vantagem adaptativa de sobrevivência sobre aquelas células sem essa característica (Kleppe & Levine, 2014; Almendro *et al.*, 2013).

Esferoides tumorais podem ser compostos apenas por células do câncer (chamados de esferoides homotípicos) ou por células do câncer cultivadas junto com outros tipos de células (chamados de esferoides heterotípicos) para criar um microambiente tumoral mais parecido ao do corpo humano, essa combinação de diferentes células auxilia no entendimento de como o câncer interage com o seu ambiente e como pode afetar outros tecidos. É comum cultivar esferoides tumorais com fibroblastos (Costa *et al.*, 2014), células endoteliais (Sampaio *et al.*, 2012) ou células imunes (Rodríguez *et al.*, 2012).

Os esferoides heterotípicos têm diferentes proporções de células de câncer para células estromais (células de tecido conjuntivo, como os fibroblastos, células do sistema imunológico, os pericitos, as células endoteliais e as células inflamatórias) para melhor mimetizar a heterogeneidade celular e o microambiente encontrados em tumores sólidos (Costa *et al.*, 2014). Nos esferoides, as células crescem em contato mútuo, dessa maneira reproduzindo a citoarquitetura, as comunicações celulares e as vias de sinalização observadas em tumores sólidos (Hanahan e Coussens, 2012). Essa comunicação é vital para o estabelecimento de um ambiente resistente a tratamentos quimioterápicos, como observado *in vivo* (McMillin *et al.*, 2013)

3.2 Estrutura interna dos esferoides

Em comparação aos tumores sólidos, os esferoides multicelulares apresentam semelhança com a heterogeneidade celular, morfologia e características funcionais, mimetizando microrregiões de tumores avasculares, regiões de tumores entre capilares, e micrometástases (McIntyre *et al.*, 2012; Valley *et al.*, 2014). As células dos esferoides são expostas a um fornecimento de oxigênio e nutrientes de forma heterogênea, onde as células na periferia são compostas por células com altas taxas de proliferação, e remonta a situação de células tumorais próximas a vasos sanguíneos, que estão em plena atividade (Trédan *et al.*, 2007). Já as células localizadas mais no interior são quiescentes e acabam morrendo por apoptose ou necrose devido à ausência de oxigênio (hipóxia) e nutrientes (Minchinton e Tannock, 2006; Trédan *et al.*, 2007; Mehta *et al.*, 2012) (Figura 3).

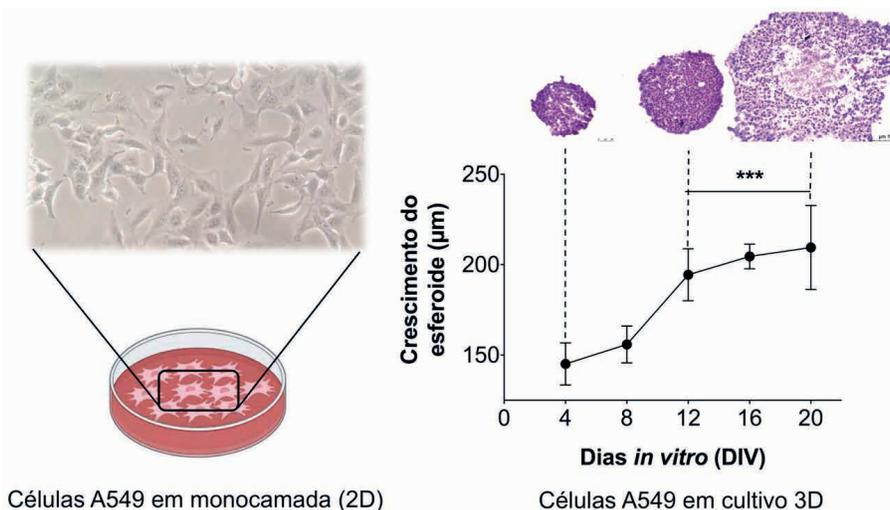


Figura 3. Células de adenocarcinoma humano A549 em cultivo de monocamada (2D) e em esferoide (3D). Esquerda: Micrografia da linhagem em crescimento exponencial demonstrando sua morfologia pavimentosa, aderida ao fundo da placa. Direita: Curva de crescimento dos esferoides cultivados por diferentes dias *in vitro* (DIV). Acima: cortes histológicos de esferoides de 4, 12 e 20 dias de cultivo, corados com hematoxilina/eosina, demonstrando o crescimento em volume, diferentes densidades celulares, e a formação de um interior quiescente/necrótico aos 20 DIV.

Além disso, em ambientes hipóxicos (com baixa disponibilidade e/ou concentração de oxigênio), as células convertem o piruvato glicolítico em lactato para obter energia, através de um processo de reprogramação metabólica conhecido como efeito Warburg. O acúmulo de lactato nos esferoides é um dos responsáveis pela acidificação do seu microambiente (levando a uma queda do pH de 6,5 - 7,2), o que também ocorre em tumores sólidos *in vivo* (Koppenol *et al.*, 2011; Trédan *et al.*, 2007). Os quimioterápicos citotóxicos que promovem a morte celular através da formação de espécies reativas de oxigênio, como a doxorrubicina (Kovacic e Osuna, 2000; Wartenberg *et al.*, 2005a, 2005b) e cisplatina (Deavall *et al.*, 2012), têm menor eficácia terapêutica nas regiões mais internas dos esferoides, devido a formação de hipóxia e a baixa taxa proliferativa (Trédan *et al.*, 2007). Assim, drogas que possuem ação eficaz em células que se dividem rapidamente, por exemplo, o paclitaxel (Mitchison, 2012) têm pouco efeito terapêutico nas regiões interiores dos esferoides, pois são constituídos por células quiescentes/senescentes e necróticas (Minchinton e Tannock, 2006; Trédan *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de diferentes técnicas para uso do modelo celular tridimensional permitiu o estudo de características dos esferoides tumorais, como a morfologia (Desmaison *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2015), o tamanho (Evensen *et al.*, 2013), a organização celular em camadas (Amann *et al.*, 2014), as proteínas e expressão gênica (Chen *et al.*, 2014; Härmä *et al.*, 2014), padrões do ciclo celular (Khaitan *et al.*, 2006; Laurent *et al.*, 2013; Lorenzo *et al.*, 2011) e o potencial invasivo e metastático das células cancerígenas. Além disso, essas técnicas são extremamente importantes para o entendimento dos tumores e para caracterizar o efeito de novas terapêuticas anticancerígena em esferoides multicelulares (Carver *et al.*, 2014; Goodman *et al.*, 2008; Desmaison *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2012), apoiando assim a translação pré-clínica para clínica, que permanece ainda baseada principalmente em experimentação animal.

4 | CONCLUSÃO

É de extrema importância a busca por modelos alternativos ao uso de animais em laboratório que possam produzir resultados confiáveis e previsíveis, semelhantes aos obtidos em ensaios clínicos. A implementação de cultivos celulares em 3D pode ser um indicativo da academia à preocupação crescente das sociedades científicas em relação ao uso indiscriminado de animais de laboratório como modelos experimentais, em sintonia a política dos 3Rs (*Substituição, Redução e Refinamento*). Dentre as diversas formas de obtenção de esferoides, o modelo adequado deve ser escolhido levando-se em consideração o objetivo do estudo, as condições experimentais do grupo de pesquisa e suas *expertises*.

Apesar da técnica de cultivo tridimensional ser uma excelente alternativa, existem desafios para sua validação como substitutos aos ensaios clássicos com uso de animais

de laboratório. A confiabilidade dos resultados é primordial e depende da reprodutibilidade adequada de protocolos, da padronização de métodos de cultivo, das boas práticas em métodos *in vitro*, da automação dos métodos de análise e da avaliação de vias de efeitos adversos. Embora represente diversos desafios, o cultivo 3D de células representa um avanço em direção a modelos mais próximos da fisiologia dos tecidos sendo assim, são candidatos promissores como alternativas ao uso de animais em na pesquisa científica.

REFERÊNCIAS

- Amaral, R.L.F.; Miranda, M.; Marcato, P.D.; Swiech, K. (2017) **Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening**. *Front. Physiol*, 8, 605
- Amaral, J. B. do; Machado-Santelli, G. M. (2011) **A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen**. *Naturalia*, v. 34, p. 1–20.
- Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., and Noel, G. (2015). **Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo**. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 5517–5527. doi: 10.3390/ijms16035517
- Cartaxo, A.L.; Estrada, M.F.; Domenici, G.; Roque, R.; Silva, F.; Gualda, E.J.; Loza-Alvarez, P.; Sflomos, G.; Brisken, C.; Alves, P.M.; et al (2020). **A novel culture method that sustains ER α signaling in human breast cancer tissue microstructures**. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 39, 161
- Costa, E.C.; de Melo-Diogo, D.; Moreira, A.F.; Carvalho, M.P.; Correia, I.J (2018). **Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches**. *Biotechnol. J.*, 13, 1700417.
- Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., and Correia, I. J. (2016). **3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis**. *Biotechnol. Adv.* 1427–1441. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002
- Djomehri, S.I.; Burman, B.; Gonzalez, M.E.; Takayama, S.; Kleer, C.G. (2018) **A reproducible scaffold-free 3D organoid model to study neoplastic progression in breast cancer**. *J. Cell Commun. Signal*, 13, 129–143.
- Ferreira, L. P., Gaspar, V. M., and Mano, J. F. (2018). **Design of spherically structured 3D in vitro tumor models-advances and prospects**. *Acta Biomater.* 75, 11–34. doi: 10.1016/j.actbio.2018.05.034
- Franchi-Mendes, T.; Eduardo, R.; Domenici, G.; Brito, C. (2021). **3D Cancer Models: Depicting Cellular Crosstalk within the Tumour Microenvironment**. *Cancers*, 13, 4610.
- Knight, E.; Przyborski, S. (2015) **Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro**. *J. Anat.*, 227, 746–756
- Khot, M.I.; Perry, S.L.; Maisey, T.; Armstrong, G.; Andrew, H.; Hughes, T.A.; Kapur, N.; Jayne, D.G. (2018) **Inhibiting ABCG2 could potentially enhance the efficacy of hypericin-mediated photodynamic therapy in spheroidal cell models of colorectal cancer**. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 23, 221–229.

Prestwich GD. (2008) **Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery.** *Accounts of chemical research.* 41: 139–148

Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., and Solomon, F. P. (2015). **3D cell culture systems: advantages and applications.** *J. Cell. Physiol.* 230, 16–26. doi: 10.1002/jcp.24683

Stelzer E, Parczyk K, Prechtl S e Steigemann P. (2014) **3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions.** *Experimental cell research.* 323: 131–143

Talukdar S, Mandal M, Hutmacher DW, Russell PJ, Soekmadji C, Kundu SC. (2011) **Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model.** *Biomaterials.* 32: 2149–2159

Foglietta, F.; Canaparo, R.; Muccioli, G.; Terreno, E.; Serpe, L. (2020) **Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids.** *Life Sci.*, 254, 117784.

Haisler, W.L.; Timm, D.M.; Gage, J.A.; Tseng, H.; Killian, T.; Souza, G.R (2013). **Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation.** *Nat. Protoc.*, 8, 1940–1949.

Hoarau-Véchet, J.; Rafii, A.; Touboul, C.; Pasquier, J.(2018) **Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?** *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 181.

Lu, Z.; Rajan, S.A.P.; Song, Q.; Zhao, Y.; Wan, M.; Aleman, J.; Skardal, A.; Bishop, C.; Atala, A.; Lu, B(2021). **3D scaffold-free microlivers with drug metabolic function generated by lineage-reprogrammed hepatocytes from human fibroblasts.** *Biomaterials*, 269, 120668.

Muniandy, K.; Ahmad, Z.A.; Dass, S.A.; Shamsuddin, S.; Kumaran, N.M.; Balakrishnan, V. (2021) **Growth and Invasion of 3D Spheroid Tumor of HeLa and Caski Cervical Cancer Cells.** *Oncologie*, 23, 279–291.

Moshksayan, K.; Kashaninejad, N.; Warkiani, M.E.; Lock, J.G.; Moghadas, H.; Firoozabadi, B.; Saidi, M.S.; Nguyen, N.-T.(2018) **Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture.** *Sens. Actuators B Chem.*, 263, 151–176.

Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, Osterland M, Golfier S, Råse S, Ansari N, Esner M, Bickle M, Pampaloni F, Mattheyer C, Stelzer E, Parczyk K, Prechtl S e Steigemann P. (2014) **3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions.** *Experimental cell research.* 323: 131–143.