



FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

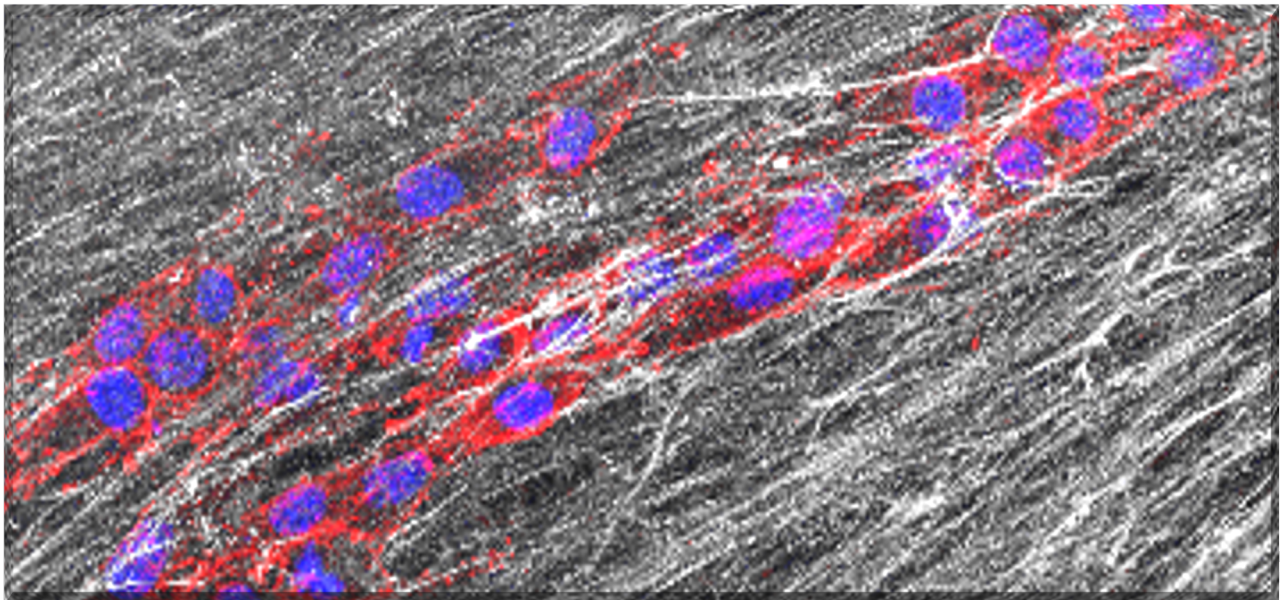


VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

## TRABAJO DE FIN DE GRADO

Técnicas de cultivo *in vitro* de células animales: la relevancia biológica de los modelos tridimensionales



*In vitro* animal cell culture techniques:  
biological relevance of three-dimensional  
models

**Mario Rodríguez Del Collado**  
Grado en Biología: 22TFG356  
2021-2022

## ÍNDICE:

Abstract (Resumen).....	III
1. OBJETIVOS.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	1
3. EL CULTIVO CELULAR.....	1
3.1. Historia y evolución.....	1
3.2. El cultivo bidimensional o 2D.....	2
3.3. El salto hacia un modelo tridimensional: importancia de la matriz extracelular.....	3
3.3.1. La matriz extracelular: estructura y papel biológico.....	3
4. TÉCNICAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONALES.....	5
4.1. Basadas en componentes artificiales.....	5
4.2. Basadas en componentes naturales de la MEC.....	7
4.2.1. Geles.....	7
4.2.2. Esferoides y derivados.....	8
4.2.3. Cultivos dinámicos.....	10
4.2.4. Dispositivos microfluídicos.....	10
4.2.5. <i>Natural-based scaffolds</i> .....	11
5. CULTIVOS CELULARES 2D vs CULTIVOS CELULARES 3D.....	12
6. DISCUSIÓN.....	15
7. BIBLIOGRAFÍA.....	16

**Abreviaturas utilizadas:** 2D, bidimensional; 3D, tridimensional; MEC, matriz extracelular; CDM: *cell-derived matrix* (matriz derivada de célula); CAF: *cancer-associated fibroblast* (fibroblasto asociado a cáncer)

## **RESUMEN:**

El cultivo *in vitro* de células animales sobre una placa o en condiciones de suspensión (denominado cultivo bidimensional o 2D) ha ayudado a esclarecer un elevado número de procesos biológicos. Sin embargo, se ha demostrado que sus resultados conllevan un sesgo intrínseco, puesto que no son capaces de recrear las condiciones nativas de los tejidos de origen al no considerar, ni las interacciones célula-célula, ni las que se producen entre la célula y la matriz extracelular, un componente activo cuyo papel biológico va más allá de servir como soporte mecánico de los tejidos. Para intentar solventar las limitaciones del cultivo 2D se han desarrollado técnicas de cultivo tridimensional (o 3D), que permiten avanzar en el conocimiento celular con estudios que no se podían realizar con modelos 2D, y sobre todo mejoran el entendimiento proporcionado por el 2D. En esta revisión se compararán los modelos 2D con las principales técnicas de cultivo 3D, que serán discutidas siguiendo un orden creciente en cuanto al acercamiento que consiguen hacia el modelo *in vivo*. Se detallarán sus aplicaciones e implicaciones, y específicamente se hará hincapié en la investigación del cáncer, pues es un campo en el que estas técnicas han cobrado una gran relevancia.

## **ABSTRACT:**

*In vitro* culture of animal cells on a plate or in suspension (so-called two-dimensional or 2D culture) has been used in research to elucidate a large number of biological processes. However, it has been shown that results are biased since they do not recreate the native conditions of the tissues of origin. 2D cultures do not consider neither cell-cell interactions nor those between the cell and the extracellular matrix, an active component with a biological role that goes beyond serving as a mechanical support for the tissues. To overcome these limitations, three-dimensional (or 3D) culture techniques have been developed to advance in cellular knowledge with studies that could not be carried out with 2D models, and, above all, to improve the understanding provided by 2D cultures. In this review, 2D models will be compared with the main 3D culture techniques, which will be discussed in increasing order of how closely they resemble *in vivo* models. Their applications and implications will be listed, with a specific focus on cancer research, a field where these techniques have become highly relevant.

## 1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es realizar una revisión bibliográfica actualizada acerca de las diferentes técnicas de cultivo *in vitro* de células animales, prestando especial atención a las técnicas de cultivo tridimensionales.

En cuanto a los objetivos específicos, se pretende hacer hincapié en los siguientes puntos:

- Describir y comparar los distintos métodos de cultivo celular 2D y 3D detallando sus aplicaciones e implicaciones, especialmente en la investigación frente al cáncer.
- Exponer la importancia de considerar la matriz extracelular si se pretende conseguir simular *in vitro* un comportamiento similar al que existe *in vivo*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para elaborar este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica utilizando artículos recomendados por las tutoras, así como ampliando la información en buscadores (Google Académico) y bases de datos compatibles con el acceso institucional proporcionado por la Universidad de Salamanca: Pubmed, Elsevier y Science Direct.

Con el objetivo de seleccionar los artículos más adecuados, se utilizaron palabras clave en inglés, entre las que destacan: “2D-culture models”, “ECM”, “3D-culture models”, “tissue engineering” “spheroids”, “scaffolds”, “organoids”, “microfluidic devices” y “2D vs 3D cell cultures”.

## 3. EL CULTIVO CELULAR

### 3.1. Historia y evolución

El cultivo celular es el aislamiento de células de un tejido u órgano animal o vegetal y su mantenimiento en un medio artificial bajo condiciones controladas que recrean las condiciones internas del organismo, permitiendo su división, crecimiento, multiplicación y, en algunos casos, diferenciación (1). Para las células animales, los orígenes de esta herramienta fundamental en investigación biomédica se remontan a la primera década del siglo XX, cuando Harrison desarrolló la primera técnica de cultivo celular *in vitro* (2-4). El conocido “método de Harrison”, que permitió estudiar el desarrollo de las fibras nerviosas (5), supuso una gran revolución y en las siguientes décadas se consiguió mejorar su eficiencia y adaptarlo al cultivo de otros tipos celulares. Carrel y Burrows fueron los pioneros en cultivar células de tejidos de mamíferos, manteniéndolas viables durante meses al utilizar subcultivos y sustituir la linfa por medios de cultivo más complejos (2, 6-8). Otros hitos importantes en la evolución del cultivo celular fueron la tripsinización, que permite obtener una suspensión de células individualizadas y generar nuevos cultivos; el uso de medios

químicamente definidos (9-11); la utilización de antibióticos como suplemento profiláctico para garantizar la asepsia (12,13); o el mantenimiento, durante un mayor rango de tiempo, de células animales en cultivo (14). Gracias a todos estos refinamientos, a mediados del siglo XX se produjeron las primeras líneas celulares estables, es decir, células que se dividen continuamente en cultivo, sin sufrir muerte celular, y que presentan las mismas características genéticas, físicas y de requerimientos nutricionales generación tras generación (15). Desde las últimas décadas del siglo XX, otro avance importante ha sido el desarrollo de las técnicas de cultivo tridimensionales (o 3D), que permiten estudiar las interacciones entre las células y el microambiente que las rodea (4). A lo largo de este trabajo se realizará una revisión sobre el estado actual de estas técnicas.

### **3.2. El cultivo bidimensional o 2D**

Desde la primera mitad del siglo XX, los investigadores han usado cultivos donde las células crecen adheridas a una superficie formando una única capa o monocapa, o bien se encuentran en suspensión, como en el cultivo de linfocitos, para conseguir un acercamiento más realista al entorno biológico (16). Estos cultivos, denominados bidimensionales o 2D, presentan numerosas aplicaciones (2,8), entre las que destacan: estudios de proliferación celular, apoptosis o migración; determinación de la localización subcelular de diferentes componentes mediante técnicas microscópicas; evaluación de la respuesta a fármacos o el efecto de diferentes mutaciones; o el estudio de vías de señalización intracelular, entre otras.

Los cultivos 2D aportan ventajas que van desde un punto de vista económico, dado su bajo coste, hasta el punto de vista técnico, ya que permiten un mantenimiento sencillo de los cultivos celulares (16), son fáciles de usar (17) y los resultados son fácilmente analizables. Además, es una técnica ampliamente establecida y validada de la que existe una extensa literatura que permite comparar resultados o establecer nuevos protocolos en el laboratorio (18).

No obstante, a pesar de estas ventajas, su uso implica numerosas limitaciones: los cultivos adherentes consisten en un monocultivo celular, por lo que no recrean la compleja arquitectura de los tejidos del organismo ni las interacciones célula-célula o entre las células y la matriz extracelular (MEC), las cuales regulan procesos celulares como la diferenciación, proliferación, apoptosis o la respuesta a fármacos (16,19). Otra desventaja es que las células tienen acceso ilimitado y homogéneo a todos los componentes del medio, sean nutrientes, oxígeno o metabolitos. En los tejidos, y especialmente en los tumores, esto no se cumple dada su estructura tridimensional (16). Como consecuencia, los resultados en cultivos celulares 2D pueden proporcionar resultados erróneos o incompletos (20). Además, cada vez son más los estudios que demuestran que el cultivo celular en 2D altera el fenotipo

y la fisiología celular. Si esto se relaciona con los resultados obtenidos en ensayos preclínicos, que en su mayoría no reproducen lo que se ha visto en las líneas celulares, se podría explicar, al menos en parte, por qué hasta el 80% de los fármacos fracasan en fase II o III de ensayos clínicos, al estar basados en experimentos realizados en cultivos 2D (19, 21).

Por todo ello, existe la necesidad de encontrar modelos alternativos al cultivo bidimensional que permitan reproducir de una manera más realista el complejo entorno celular *in vivo*, lo que facilitará la obtención de resultados más fisiológicos y traslacionales hacia el paciente (22). Con este fin se han desarrollado los cultivos 3D, en los que el microambiente celular *in vitro* permite tener en cuenta la organización espacial y la composición de la matriz extracelular (MEC) del tejido o tumor (19).

### **3.3. El salto hacia un modelo tridimensional: importancia de la matriz extracelular**

Desde la segunda década del siglo XX ya se buscaban soluciones que permitieran mejorar las limitaciones de los modelos bidimensionales (23-25), aunque no fue hasta mediados de siglo cuando se hizo la primera aproximación experimental hacia un modelo tridimensional. Los investigadores observaron que las células cultivadas en un gel de colágeno crecían mejor que las cultivadas en placa. Como apuntaron, el éxito radica en la semejanza entre el gel de colágeno y la matriz extracelular de los tejidos, permitiendo un acercamiento más preciso y apropiado al simular *in vitro* el modelo *in vivo* tisular (26).

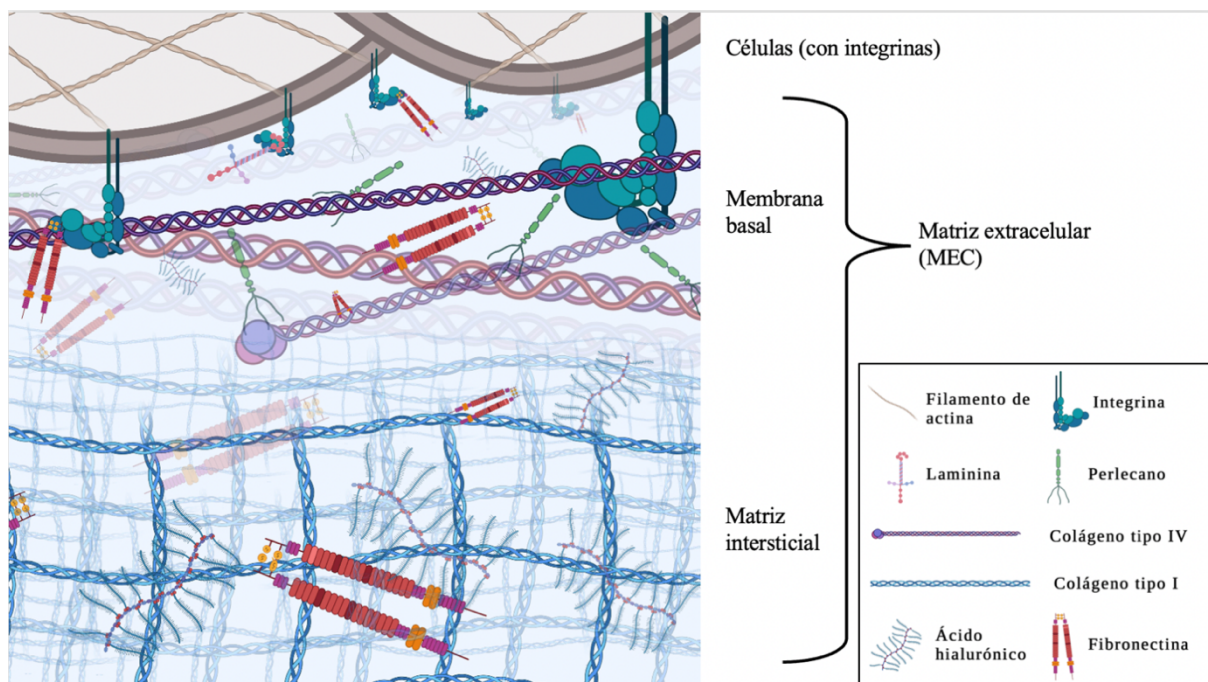
Hoy sabemos que la MEC juega un papel clave en la regulación de las propiedades celulares. Por ello, en el cultivo celular 3D, cuyo objetivo es imitar la estructura de la MEC de los tejidos (27), las células difieren tanto en su morfología como en su fisiología de las cultivadas en modelos 2D. Por tanto, si se pretende conocer el comportamiento de las células en el complejo microambiente tisular o tumoral, es necesario considerar la actuación de la MEC desde el modelo *in vitro* (28).

#### **3.3.1. La matriz extracelular: estructura y papel biológico**

La MEC es el componente acelular de los tejidos, formado por una red dinámica de macromoléculas (29). No sólo confiere un andamiaje y soporte a los tejidos, sino que es un elemento fisiológicamente activo que participa en la señalización, proliferación, diferenciación, apoptosis y homeostasis celular, así como en la comunicación célula-célula (30). Está mayoritariamente constituida por glicoproteínas (macromoléculas con azúcares donde predomina la parte proteica o peptídica) y proteoglicanos (polímeros repetitivos de disacáridos cargados negativamente, denominados glucosaminoglucanos, que están unidos covalentemente a una parte proteica) (31). Así, se encuentran formando parte de la MEC glicoproteínas como la fibronectina (32), la laminina (33), la elastina (34) y 24 de los 28 tipos

de colágeno (ya que los tipos XIII, XVII, XXIII y XXV se encuentran asociados a la membrana (35)); proteoglicanos como la asporina y el perlecano (36,37); y glucosaminoglucanos como el ácido hialurónico (38).

Los componentes de la MEC están relacionados entre sí e interaccionan de manera constante y recíproca con las células. Por un lado, la MEC está continuamente sometida a una remodelación regulada por las células. Por otro, influye en las propiedades bioquímicas y biofísicas celulares a distintos niveles (39): actúa como reservorio de moléculas bioactivas, regulando su biodisponibilidad temporal y espacial (29,40,41); transmite señales mecánicas que las células interpretan y traducen, a través de receptores de superficie como las integrinas, para regular la organización interna del citoesqueleto y activar vías de señalización que desencadenan respuestas de proliferación, adhesión celular o incluso de tumorigénesis (42); sirve de anclaje a las células, lo que resulta esencial para mantener la polaridad tisular y la división celular (29,43); e influye determinando la velocidad y dirección que siguen las células durante la migración a través de su concentración y sus componentes (29).



**Figura 1. Representación tridimensional de la matriz extracelular y sus principales componentes.** Creada con Biorender.com

Por otro lado, se ha demostrado que alteraciones en la composición y/o estructura de la MEC están asociadas a patologías como la fibrosis, las enfermedades inflamatorias o el cáncer. Durante la progresión tumoral se producen cambios en el remodelado de la MEC que afectan tanto a sus propiedades bioquímicas como mecánicas para favorecer el crecimiento tumoral, la invasión, la metástasis y la resistencia a fármacos antitumorales (43,44). A tal efecto se han desarrollado las

técnicas de cultivo tridimensionales (o 3D), puesto que las células no deben considerarse como una entidad solitaria, sino que deben ser evaluadas en el contexto de la MEC.

#### 4. TÉCNICAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONALES

El salto hacia el cultivo 3D, es decir, aquel que intenta reflejar las interacciones entre los componentes que rodean a las células, se produjo durante las últimas décadas del siglo XX. Con el descubrimiento de las moléculas que forman la MEC, se decidió apostar por estos modelos como punto de partida para estudiar a las células en un ambiente más similar al de los tejidos o tumores (4). Existen numerosas clasificaciones de las técnicas de cultivo 3D, cada una orientada hacia parámetros técnicos muy específicos y diferentes entre ellos. En la presente revisión se ha optado por presentar las técnicas desde las menos cercanas a las que ofrecen resultados más similares a los obtenidos en los modelos *in vivo*. Para conseguir además una clasificación lo más representativa de los modelos actuales, se han incluido los soportes basados en componentes artificiales, los geles de matriz tisular, los dispositivos microfluídicos y los métodos dinámicos.

##### 4.1. Basadas en componentes artificiales: *artificial scaffolds*

Una de las aproximaciones utilizadas para el cultivo 3D consiste en crear, con materiales sintéticos, un soporte que proporcione a las células un andamiaje donde puedan adherirse, proliferar, migrar y diferenciarse (45). Esto implica que dichos materiales imiten las propiedades químicas y mecánicas de la MEC, no muestren toxicidad y sean perfectamente biodegradables, de manera que con el tiempo la MEC producida y remodelada naturalmente por las células pueda sustituir al soporte artificial (46,47). Dos de los métodos utilizados para su fabricación son la liofilización y las técnicas de fabricación aditiva, comúnmente denominadas técnicas de “impresión 3D”.

La criodeshidratación, liofilización o *freeze-drying* es una técnica que transforma soluciones poliméricas en un soporte sólido tridimensional al aplicar una congelación por debajo del punto triple del solvente (la temperatura más baja a la cual coexisten simultáneamente las fases sólida, líquida y gaseosa de una sustancia) seguida de un doble secado por técnicas físicas (48). Estas condiciones permiten la eliminación del solvente utilizado por sublimación y formar una red sólida y porosa del polímero que sirve como base para el cultivo celular (49). Así, se han diseñado, por ejemplo, soportes de alcohol polivinílico (o PVA) que permiten la maduración de cardiomiocitos a partir de células humanas pluripotentes inducidas (50), de policaprolactona (o PCL) para estudios de regeneración del tendón (51), o incluso soportes biocompatibles de mezclas de polímeros con futuras aplicaciones en implantología de los tejidos blandos (52). No obstante, la principal limitación de la criodeshidratación



es que es una técnica que consume mucho tiempo para producir soportes que no siempre van a tener la misma porosidad ni rigidez (27,49).

La fabricación aditiva se define como “el proceso de unir materiales, normalmente capa sobre capa, para construir objetos tridimensionales a partir de un modelo asistido por ordenador, en oposición a las metodologías tradicionales de fabricación que cortan, taladran y muelen” (53). Entre sus técnicas se encuentran el modelado por deposición fundida (*fused deposition modelling*), que superpone diferentes capas de un material termoplástico, que ha sido calentado previamente, mediante un cabezal de extrusión (54,55); el electrohilado (o *electrospinning*), que produce fibras con un diámetro micrométrico al aplicar un campo eléctrico en la punta de la boquilla por la que sale la solución polimérica (56) y la estereolitografía, que construye los soportes en la superficie de un fotopolímero expuesto a un haz de luz ultravioleta (57). Con estos métodos se ha conseguido imitar la compleja estructura de las vellosidades intestinales en un modelo *in vitro* (58), crear soportes que permiten el crecimiento de células madre de cáncer de mama (59), o incluso, generar guías neurales artificiales para la reparación de lesiones en nervios periféricos (60).

La principal ventaja sobre los modelos 2D es que tienen en consideración la organización 3D que presentan las células en los tejidos. Esto ha propiciado grandes avances en el campo de la ingeniería tisular, disciplina que tiene como objetivo la generación de parches, vendas o implantes de tejidos que sean biocompatibles y puedan reemplazar a un órgano (o parte de él) con un daño o lesión. El principal inconveniente de estos soportes es que están fabricados con materiales no presentes de forma natural en la MEC que no proporcionan las señales necesarias para que exista comunicación intercelular (61), por lo que se ha decidido apostar por el uso de componentes naturales de la MEC para mejorar la compatibilidad de las células con estos soportes y así obtener resultados más acertados. En la **tabla 1** se detallan las ventajas y desventajas de los soportes artificiales.

**Tabla 1. Ventajas y desventajas de los soportes 3D que emplean polímeros artificiales para el cultivo celular (49,56).**

Ventajas	Desventajas
Permite simular la estructura de la MEC y la difusión de gases y nutrientes entre los huecos y poros del soporte	Al utilizar materiales sintéticos, los resultados presentan una artificialidad y un sesgo intrínseco
Ausencia de postcurado (es decir, de pérdida de resistencia mecánica de los materiales al ser calentados por encima de una temperatura máxima)	Algunos de los polímeros son tóxicos y contienen grupos funcionales que pueden intervenir con la bioquímica celular y producir reacciones indeseadas
Gran variedad de materiales a utilizar	La adhesión celular a estos soportes suele ser muy reducida
Permite controlar parámetros como el diámetro y tamaño de las fibras (no en la liofilización)	Los soportes diseñados por liofilización no consideran el efecto fibrilar

*MEC: matriz extracelular*

## 4.2. Basadas en componentes naturales de la MEC

### 4.2.1. Geles

Los geles son materiales compuestos por uno o varios polímeros, unidos mediante interacciones físicas, iónicas o covalentes, que se entrecruzan tridimensionalmente formando redes inmersas en un fluido (62). En la literatura, se suelen utilizar indistintamente los términos “gel” e “hidrogel”, lo cual no es del todo correcto, puesto que los hidrogeles son un tipo de geles donde el agua constituye el componente más abundante (63). En cualquier caso, los geles ofrecen como ventajas el alto grado de biocompatibilidad de los materiales, las propiedades adhesivas naturales de estos, y que permiten una alta tasa de viabilidad celular, un cultivo caracterizado por una proliferación y diferenciación controladas, y a menudo, un comportamiento celular muy similar al existente *in vivo* (45).

Aunque se pueden fabricar geles con polímeros sintéticos, el colágeno (y en particular, el de tipo I) constituye aproximadamente el 30% de la MEC, por lo que la utilización de geles fabricados a partir de esta glicoproteína permite un enfoque más apropiado en los estudios celulares (64,65). Son obtenidos fundamentalmente por procesamiento ácido del tendón de la cola del ratón y proporcionan una adhesión celular en un entorno viscoelástico que se asemeja en gran medida al nativo de los tejidos (66). No obstante, también presenta limitaciones, como la contracción significativa de la matriz si se hace un cultivo prolongado en estos geles (66), la ausencia de sitios de unión específicos para factores de crecimiento (limitando las funciones ejercidas por la MEC), la dificultad técnica para producir geles con una rigidez elevada (necesarios para estudios de hueso o cartílago (67)), o que solo considere los efectos del colágeno y no del resto de componentes de la MEC.

Otro tipo de gel basado en colágeno es el Matrigel, que deriva de la matriz producida por células de sarcoma EHS (o Engelbreth-Holm-Swarm, nombre de los tres investigadores que lo estudiaron) de ratón y está formado por componentes de la membrana basal de la MEC, fundamentalmente laminina y colágeno tipo IV. Al ser una marca registrada (Corning® Matrigel®), se ha observado que la composición y propiedades mecánicas difieren significativamente entre lotes, llevando a resultados con un sesgo intrínseco (68). Pese a estas limitaciones, el Matrigel se utiliza para estudiar la diferenciación de células epiteliales (que cultivadas dentro del gel forman acinos, y en la superficie, conductos) (69), hacer ensayos de invasión y crecimiento celular (70), y dado el origen tumorigénico del Matrigel, si se cultivan células cancerígenas, se induce la formación de organoides (70), que serán posteriormente discutidos.

Existen otros tipos de geles, como los de fibrina, ampliamente usados en estudios de reparación tisular tras heridas (71), los de ácido hialurónico, para el cultivo de condrocitos (al ser un componente

mayoritario del cartílago) (72) y los de alginato, polisacárido procedente de las algas pardas o de cultivos de *Pseudomonas* o *Azotobacter*, que puede ser modificado para que contenga un ligando adhesivo (como el péptido RGD de la fibronectina que contiene la secuencia arginina-glicina-aspartico de la que deriva su nombre) que permite el anclaje a las células (66). Recientemente se han creado nuevos tipos de geles más complejos, como el denominado gel de matriz tisular (*tissue matrix gel* o *TMG*), que fue extraído inicialmente del tejido mamario porcino (73) y contiene prácticamente todos los componentes de la MEC (74), lo que permite una aproximación *in vitro* más realista al tener en cuenta el conjunto de las interacciones de la MEC. En 2021 se creó el primer gel de matriz tisular extraído directamente de tejido mamario humano (75). Usando técnicas de inmunofluorescencia, microscopía y modelos computacionales de redes neuronales, se compararon su microestructura, sus propiedades elásticas y su capacidad como sustrato para el cultivo celular con respecto a las que tienen un gel de colágeno tipo I, el Matrigel y un gel de matriz tisular porcino. La conclusión fue que el uso del gel de matriz tisular humano permite examinar, mejor que cualquier otro gel, el comportamiento de las células epiteliales mamarias al conseguir recrear tanto la microestructura como la mecánica propia de ese tejido *in vitro*. Además, los investigadores se muestran optimistas con que esta técnica pueda abrir camino hacia una investigación y medicina mucho más personalizada, ya que en vez de utilizar bien un modelo 2D o bien un modelo animal, se podrán hacer los cultivos de células en los geles extraídos del propio tejido del paciente (75).

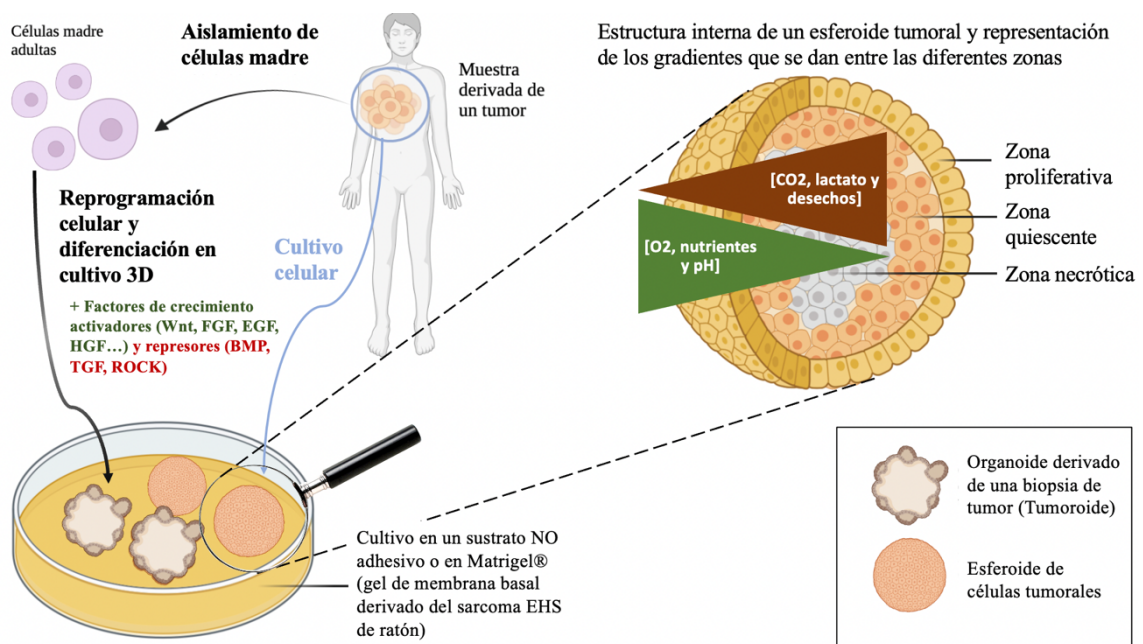
A pesar de las modificaciones que se están llevando a cabo para conseguir geles que contengan todas las moléculas de la MEC y que se obtengan de tejidos humanos, la realidad es que los geles proporcionan resultados difíciles de replicar, no son capaces de recrear la organización espacial de la matriz, no reflejan un gradiente de nutrientes preciso, o incluso, como en el caso del Matrigel, poseen componentes que influyen en la bioquímica celular (16) por lo que, aunque aportan grandes ventajas (mencionadas al inicio de esta sección), es necesario considerar otros modelos tridimensionales para el estudio del comportamiento celular.

#### **4.2.2. Esferoides y derivados**

Dos de los modelos 3D más utilizados para el cultivo celular *in vitro* son los esferoides y los organoides. A pesar de que en la literatura ambos términos suelen confundirse, en esta revisión se ha optado por compararlos como dos técnicas independientes, ya que poseen características y aplicaciones muy diferentes.

Los esferoides son agrupaciones de células que en vez de unirse a una superficie plana se unen y ensamblan entre sí gracias a un ambiente que favorece la interacción entre moléculas de la superficie celular y de la MEC, como fibras del citoesqueleto de actina, cadherinas e integrinas (76,77). Se

pueden producir bien usando un sustrato no adhesivo tipo Matrigel (como se ha comentado en el apartado anterior); bien a partir del cultivo de líneas de células en gota suspendida, para lo cual se pipetea 20-30  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular en un portaobjetos o tapa de una placa que se invierte para conseguir que, por fuerza gravitatoria y tensión superficial, las células se autoagreguen y dispongan juntas en el fondo de la gota (78); o bien mediante otras técnicas ampliamente discutidas en publicaciones recientes (79,80). La principal ventaja que aportan los esferoides es que reproducen la cinética de crecimiento de un tumor real, ya que poseen un núcleo de células necróticas que está rodeado por una capa de células quiescentes (o con un bajo nivel de proliferación), y todo ello envuelto por células que se están dividiendo continuamente (81) (**figura 2**). Esto permite la existencia de gradientes de oxígeno, de metabolitos y de pH que implican condiciones de hipoxia y acidosis en la parte interna del esferoide, características típicas de un tumor sólido. Además, permiten incluir varios tipos celulares, ayudando a conocer cómo se produce la migración e invasión en cáncer (82,83).



**Figura 2. Cultivo de esferoides y organoides. Estructura interna de un esferoide tumoral. Creada con Biorender.com**

Los organoides son modelos 3D que aprovechan las propiedades de pluripotencialidad de las células madre para reproducir el desarrollo de órganos corporales como pulmón, cerebro, hígado o intestino. Su obtención requiere seguir protocolos en los que el tiempo y la combinación de diferentes factores de crecimiento o inhibidores necesitan de una exactitud milimétrica para recrear fielmente cada una de las etapas del desarrollo de manera análoga a lo que ocurriría en el feto (84). A medida que se van diferenciando las células, es importante que el cultivo permita su expansión en tres dimensiones, por

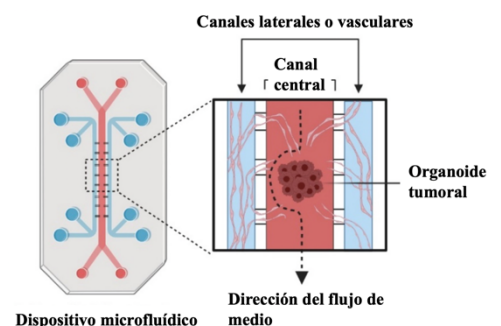
lo que se utilizan geles como el Matrigel o sustratos no adhesivos para que se agreguen las células y se permita su organización espacial (85,86) (**figura 2**). Los protocolos implican una mayor complejidad que otras técnicas e incluso resultados difíciles de interpretar, pero su obtención también permite el estudio del cáncer gracias a los denominados tumoroides, que son otro tipo de organoides creados a partir de biopsias de tumores de pacientes. A diferencia de los esferoides, estos modelos no presentan las tres capas características (necrótica, quiescente y proliferativa), pero sí las diferentes zonas y fisiología de un órgano *in vivo* (84), permitiendo reconstruir *in vitro* la vasculatura y microambiente tumoral (87) y realizar ensayos de acción de antitumorales (88).

#### 4.2.3. Cultivos dinámicos

Existe un tipo especial de aparatos, denominados biorreactores dinámicos, que utilizan una hélice o propulsor para crear turbulencias que permiten la agrupación celular en esferoides. Además, a diferencia de los esferoides anteriormente comentados, el movimiento rotatorio permite, por un lado, homogeneizar la llegada de oxígeno y nutrientes y, por otro lado, poder estudiar a las células en condiciones de microgravedad, cuyos cambios en la diferenciación y crecimiento celular son conocidos en viajes espaciales (89), aunque éste es un campo muy reciente y requiere de tiempo para implementarse (21). Por tanto, hoy en día se utilizan principalmente como otra técnica más para crear esferoides.

#### 4.2.4. Dispositivos microfluídicos

Aunque los esferoides y organoides permiten un conocimiento pormenorizado del desarrollo e histología de un órgano o tumor, su principal desventaja es que al existir únicamente una difusión pasiva y gradientes metabólicos entre el interior y el exterior, hay una tendencia a la acumulación de productos de desecho en el núcleo central del organoide cuando este va desarrollándose, de forma que se compromete su viabilidad y crecimiento (84). Además, ninguno de los métodos anteriores tiene en cuenta la dinámica de fluidos, un aspecto con importancia capital a la hora de entender, por ejemplo, cómo se distribuye un fármaco antitumoral por el sistema sanguíneo hasta llegar al tejido diana (81) o cuál es el proceso de vascularización producido en un estado metastásico (84). Por ello, con el fin de integrar estos conceptos se desarrollaron los dispositivos microfluídicos (90), que permiten manipular y controlar el flujo



**Figura 3. Estructura de un dispositivo microfluídico.** Se aprecia cómo por el canal central discurre el organoide tumoral y cómo por los adyacentes, las células endoteliales, cultivadas en un gel, participan en el proceso de vascularización. Imagen adaptada de (90) y generada con Biorender.com.

(generalmente laminar), y la velocidad de una pequeña fracción de un fluido que circula a través de un sistema de canales y válvulas (91). Algunas de sus principales aplicaciones son el estudio de los procesos de vascularización y angiogénesis, de resistencia a fármacos (92), y de metástasis (93). Para investigar la angiogénesis, el método más sencillo consiste en introducir esferoides dentro de la cámara central del dispositivo (**figura 3**), que está a su vez conectada a una serie de canales adyacentes que contienen fibroblastos y células endoteliales (79). Así, se consiguen recrear, por ejemplo, las condiciones que existirían en los capilares sanguíneos humanos (81). No obstante, a pesar de que está permitiendo avances, estos dispositivos están dando sus primeros pasos, por lo que todavía falta tiempo para implementarlos, optimizarlos y desarrollar modelos cuyos parámetros de base (flujo, velocidad, diámetro de los canales, etc) estén controlados.

#### **4.2.5. Natural-based scaffolds**

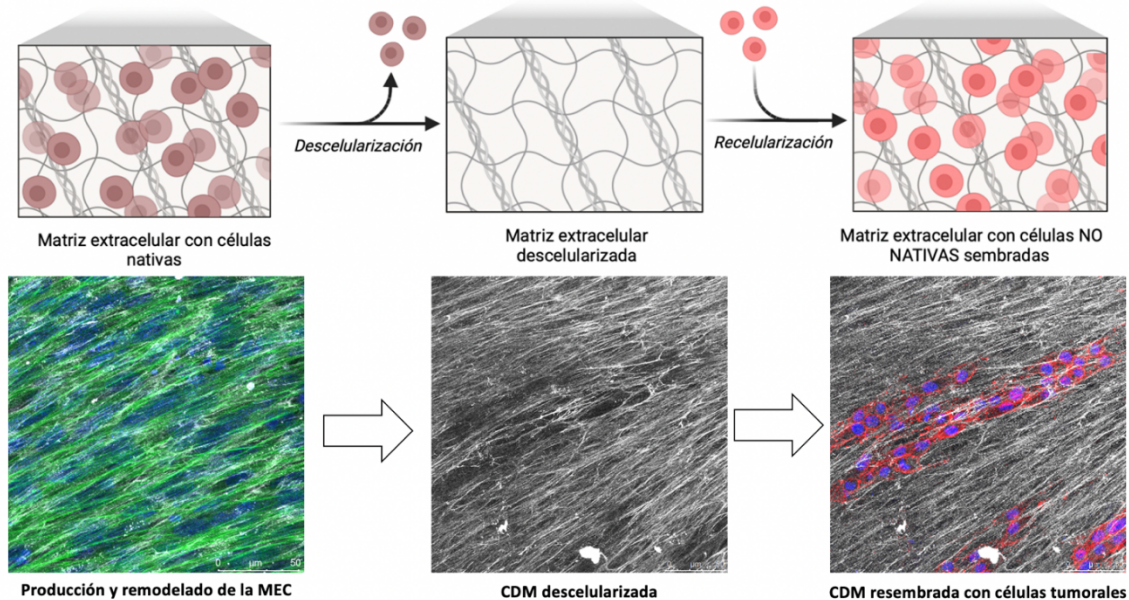
Tal y como se comentó en el apartado 4.1, los soportes de matriz (o *scaffolds*) son una herramienta muy útil para reproducir la organización tridimensional de la MEC, ya que permiten crear una matriz porosa y fibrilar con una estructura similar a la que existe en el interior de los tejidos, donde poder cultivar las células. Del mismo modo que se ha utilizado una amalgama de polímeros sintéticos y técnicas de manipulación aditiva para crear soportes que sirvan de base para el cultivo celular, también se pueden generar matrices constituidas por materiales que se encuentran de forma natural en la MEC, como colágeno tipo I (o tipo IV) o fibronectina (61). De hecho, numerosos estudios demuestran cómo estos polímeros naturales son biológicamente activos y permiten de por sí la adhesión de las células al soporte, algo que no ocurría en los artificiales, salvo que se añadiera, por ejemplo, un ligando adhesivo como el RGD de la fibronectina (94).

No obstante, si hay una técnica que está revolucionando el campo de la investigación del cáncer es la obtención de una MEC generada y remodelada por células productoras de matriz, como los fibroblastos asociados a cáncer (o *CAFs*, *cancer-associated fibroblasts*). Para ello, se siembran estas células sobre un recubrimiento de gelatina que les permita secretar, depositar y remodelar la matriz. En estas condiciones, los CAFs utilizan como base esa gelatina, y empiezan a generar y secretar MEC, obteniéndose una matriz que guarda una gran similitud con las matrices tisulares o tumorales *in vivo*, lo que supone una característica única de este modelo frente a otros (61,95).

Estas matrices, denominadas *cell-derived matrix* (o CDM) se pueden descelularizar (es decir, eliminar las células y dejar intacta la matriz generada) para poder sembrar en ellas diferentes tipos celulares (como células tumorales), lo que permite estudiar el efecto de las interacciones célula-MEC, hacer cocultivos de distintas poblaciones celulares en un ambiente muy similar al que existe en el tejido o

tumor, y conocer cuáles son las señales bioquímicas que induce la MEC en procesos como la migración, invasión, o la respuesta a fármacos (21) (**figura 4**).

#### Obtención de matriz extracelular por descelularización para el cultivo 3D de células



**Figura 4. Obtención de matriz extracelular por descelularización para el cultivo tridimensional de células.** Figura adaptada de Biorender.com a la que se han añadido microfotografías cedidas por la Dra. Cristina Cuesta y la Dra. Esther Castellano (investigadoras del Centro de Investigación del Cáncer CIC-USAL), donde se observa por inmunofluorescencia y bajo el microscopio confocal, la disposición de las fibras de la MEC y cómo la CDM descelularizada se ha utilizado para resembrar células tumorales.

Con este método se ha estudiado también cómo la MEC contribuye al comportamiento de las células cancerosas (96), a la progresión y supresión tumoral (97), e incluso, las CDMs están permitiendo conocer el papel de la vía de señalización RAS-PI3K en CAFs en la producción de la MEC (98). El grupo de la Dra. Esther Castellano ha demostrado que las matrices generadas por CAFs en las que la interacción entre RAS y PI3K está inhibida, están más desorganizadas y son más finas que las generadas por CAFs silvestres (o WT, *wild-type*). Además, estas matrices reducen la proliferación y la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales resembradas en ellas, en comparación con las matrices generadas por CAFs en los que la señalización RAS-PI3K está intacta, lo que podría tener importantes implicaciones en el diseño de nuevas terapias antitumorales.

## 5. CULTIVOS CELULARES 2D vs CULTIVOS CELULARES 3D

La consideración de la matriz extracelular en estudios celulares ha permitido desarrollar modelos donde las interacciones célula-MEC, las funciones de señalización de la MEC y la estructura 3D nativa de los tejidos, están presentes. Y por ello, han permitido avanzar en el conocimiento celular y de enfermedades más allá de la información proporcionada por los modelos animales y 2D. Así, se

ha demostrado, por ejemplo, la utilidad de los geles de colágeno para el estudio de modelos de infección de parásitos como *Toxoplasma gondii*, donde tanto la distribución de los parásitos como la salida de estos de las células se realiza en una manera similar a lo que ocurre *in vivo* (99), la utilidad de los organoides de pulmón para conocer los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades respiratorias como la COVID-19 (100) o la aplicabilidad de los dispositivos microfluídicos para entender las relaciones entre la microbiota comensal de la mucosa intestinal con su hospedador (101). No obstante, en esta revisión se ha decidido destacar las principales aplicaciones de los modelos 3D en investigación del cáncer, puesto que es una de las patologías donde más se utilizan. Se ofrece un resumen de ellas en la **tabla 2**.

**Tabla 2. Principales aplicaciones e implicaciones de los modelos 3D en investigación en cáncer.**

Modelo 3D	Aplicaciones e implicaciones derivadas	Referencias
<b>Artificial scaffolds</b>	Estudios de ingeniería tisular y regeneración de hueso, cartilago y articulaciones; estudios de penetración celular en las fibras de la MEC; estudios de la producción de la MEC; observar el comportamiento de la célula tumoral; recrear la estructura de las vellosidades intestinales	(45-57, 60,61,94,102)
<b>Geles</b>	Han permitido descubrir el mecanismo de angiogénesis del glioblastoma; estudios de diferenciación, invasión celular y tumorigénesis; estudios de microestructura de la MEC	(67-75, 103,104)
<b>Esferoides y derivados</b>	Ensayos de penetración de fármacos en las células, al tener en cuenta propiedades que se encuentran en los tumores, como un gradiente de O <sub>2</sub> y de nutrientes; evaluar el movimiento de las células inmunitarias a través de la MEC; estudiar <i>in vitro</i> las interacciones entre las células del microambiente tumoral y los tumoroides; estudios de morfogénesis en organoides	(18,82-88)
<b>Métodos dinámicos</b>	Además de ser un método relativamente sencillo para crear organoides, están permitido realizar estudios de diferenciación de células madre en condiciones de microgravedad (como los llevados a cabo en la Estación Espacial Internacional) para determinar cómo algunas células madre cancerosas son capaces de revertir un estado de quiescencia	(21,27,89)
<b>Dispositivos microfluídicos</b>	Permiten modelar la vascularización tumoral <i>in vitro</i> ; replicar la activación de la MEC al cultivar fibroblastos asociados a cáncer; estudiar interacciones entre la célula cancerosa y el microambiente tumoral; estudiar la migración a través de un flujo de gel controlado	(27,30,81,84, 92,93)
<b>Natural-based scaffolds</b>	Estudios de migración, invasión, metástasis y de las interacciones entre célula y MEC; estudiar la transición epitelio-mesénquima; comparar diferencias morfológicas y en vías de señalización entre modelos 2D y 3D; ensayos con fármacos en un ambiente similar al nativo; obtener perfiles transcriptómicos elaborados a partir del cultivo de células cancerígenas en matrices descelularizadas con resultados similares a los que presentan pacientes con cáncer	(61,96-98)

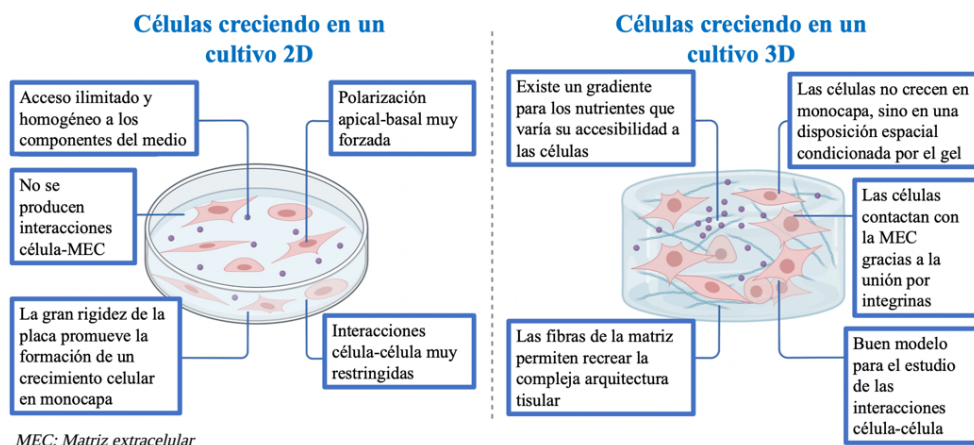
Una de las aplicaciones más usadas de los cultivos 3D en la investigación del cáncer es la evaluación de fármacos antitumorales. En aras de determinar la eficiencia y eficacia de los agentes quimioterapéuticos, tradicionalmente se han utilizado cultivos 2D. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado cómo las células tumorales que se cultivan en modelos 3D presentan una menor sensibilidad a estos mismos fármacos (105-108). Así, utilizando soportes de colágeno para testar la eficacia de la combinación de terapia fotodinámica y de actinomicina en células de cáncer de ovario, se comprobó una menor eficacia de estas terapias en cultivos 3D debido a la menor capacidad de difusión que tiene el oxígeno en estos soportes (109). Lo mismo sucede en investigaciones con esferoides de células de cáncer de mama, que demostraron una menor eficacia de los antitumorales



testados en los modelos 3D al encontrar en las células sembradas en ellos una mayor expresión de proteínas de supervivencia celular (como Akt) y de resistencia a fármacos (como PGP) (105), pero también en modelos 3D de otros tipos de cáncer como pulmón, páncreas y mieloma múltiple (105), lo que pone de manifiesto la importancia de considerar a los cultivos 3D, y no solo a los 2D, que siguen copando la mayoría de estudios preclínicos de fármacos antitumorales (107).

Además de cambios en la respuesta a fármacos, el cultivo 3D de las células tumorales también muestra diferencias en la morfología (**figura 5**), que deja de ser esencialmente elongada en el 2D para constituir en los modelos 3D formas muy diferentes (110,111), donde varía significativamente el diámetro celular (112), o incluso se llega a la formación de agregados en los que resulta muy difícil establecer los límites de cada célula (105,106). También se ha observado cómo al pasar de modelos 2D a 3D existe una formación del cultivo mucho más lenta (16), un descenso en la viabilidad y proliferación celular (105,112) y diferencias significativas en cuanto a la expresión génica (113,114), transcriptómica (115) y proteómica (116).

### Cultivos celulares 2D vs cultivos 3D

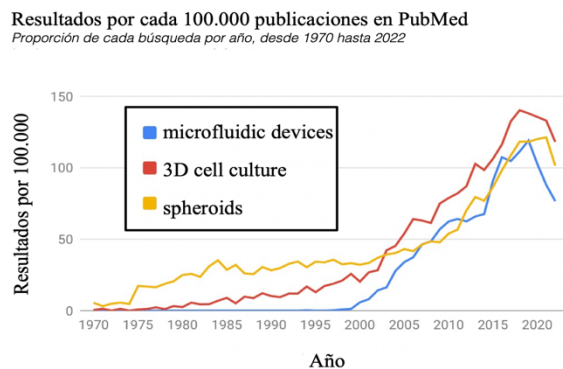


**Figura 5. Comparativa entre los cultivos celulares 2D y los cultivos 3D.** Adaptada de (110,121-123) y generada con BioRender.com

Por último, los modelos de cultivo 3D también han permitido conocer cómo las propiedades mecánicas y químicas de la MEC regulan el comportamiento de la célula tumoral. Estos estudios que no se pueden hacer en modelos 2D (al no tener en cuenta estos a la MEC) han demostrado cómo la disposición en paralelo de las fibras de colágeno y de la fibronectina generada por los CAFs es utilizada por las células tumorales “a modo de carreteras” para su rápida diseminación por las diferentes partes del tumor (113,117,118), y cómo una alta densidad de colágeno aumenta el grado de rigidez de la MEC, lo que es percibido por las células epiteliales mamarias como un estímulo mecánico que activa, vías FAK-Rho-ERK y Akt, la invasión y proliferación celular (114,119).

## 6. DISCUSIÓN

Con esta revisión se ha buscado enfatizar la importancia de considerar el papel ejercido por la MEC en los estudios celulares *in vitro* gracias a las diferentes técnicas de cultivo 3D, que han sido discutidas y comparadas con los modelos 2D. Si se realiza una búsqueda en PubMed con las palabras clave “3D cell culture”, “microfluidic devices” y “spheroids” y se analiza el número de publicaciones que contienen estos términos (120), se obtiene el gráfico representado en la **figura 6** donde se observa una tendencia al alza en las publicaciones de PubMed que tratan las técnicas de cultivo 3D.



**Figura 6.** Proporción de artículos de PubMed sobre dispositivos microfluídicos, esferoides y cultivos celulares 3D (en inglés) representados por año desde 1970 hasta 2022. No son resultados brutos, sino una proporción de artículos que contienen dichos términos sobre cien mil. Realizado con Search Workbench y PubMed by Year (120).

La razón es evidente: a pesar de que los modelos 2D propician grandes avances en la ciencia, son relativamente fáciles de manejar, de bajo coste, y proporcionan resultados fácilmente reproducibles, con el modelo 3D se va un paso más allá al conseguir un comportamiento celular más similar al que exhiben las células dentro de los tejidos. Esto se debe a que permiten una organización celular de una forma mucho más fisiológica al considerar, en los casos en que se utiliza, la presencia de la matriz extracelular, cuyo papel biológico es clave no solo para determinar los procesos celulares, sino también para establecer y regular las interacciones que se dan entre células, y entre estas y los diferentes componentes del microambiente celular. De ahí que en los últimos años se esté optando por dar el salto hacia la fabricación y desarrollo de modelos 3D, que tal y como se ha comentado en esta revisión, intentan recrear la estructura de la MEC (como los soportes artificiales o los basados en componentes naturales), utilizan sus componentes (como los geles), o se basan en su capacidad de permitir interacciones y la formación de agregados celulares (como en esferoides, organoides y dispositivos microfluídicos). Es por ello por lo que los modelos 3D no sólo han mejorado el entendimiento proporcionado por los modelos 2D, sino que también han permitido comprender y desvelar procesos que no pueden ser estudiados con un cultivo 2D, y presentan numerosas aplicaciones en prácticamente todas las disciplinas de la Biología. Pero aún más importante, a pesar de requerir de largos protocolos, de ser técnicamente complejos, y de no ser un modelo *in vivo* (y, por tanto, presentar sus limitaciones), los resultados que aportan son más realistas y acertados que los del modelo 2D, ¿por qué? La razón se encuentra en el fundamento del cultivo 3D: las células se disponen

bajo unas condiciones que intentan recrear la organización celular, la arquitectura nativa tisular y donde a diferencia del modelo 2D, no existe un acceso ilimitado ni homogéneo de sustancias a los componentes del medio (16,121,122). Esto permite la interacción de las células entre sí y con la MEC, que regula activamente procesos como la migración y la proliferación, determina la morfología de las células y forma una barrera natural que condiciona la llegada de metabolitos, gases, o incluso de fármacos a las capas de células más internas y ocultas por el microambiente celular (109). De ahí que la célula altere la expresión génica o la actividad de proteínas y se puedan entender los diferentes resultados en los estudios comentados.

En definitiva, las mejoras que conllevan sobre los modelos 2D, las aplicaciones que permiten, y que los resultados que aportan sean similares a los obtenidos en el modelo *in vivo*, hacen de los modelos 3D una de las herramientas con mayor proyección en el campo de la investigación biomédica. En el futuro es muy probable que las técnicas aquí descritas se optimicen, mejoren y abran paso al desarrollo de otros modelos, pero que siempre consideren el papel biológico de la matriz extracelular y del microambiente tumoral, pues deben tenerse en cuenta si se pretende conocer realmente cuál es el comportamiento celular y cómo poder mejorar el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Taylor MW. A History of Cell Culture. In: Taylor MW, editor. Viruses and Man: A History of Interactions Cham: Springer International Publishing; **2014**. p. 41-52
2. Torres-García SE, Olvera-Sandoval C, Ramírez-Castillo FY, Muro AL, Avelar-González FJ. Cell Culture: History, Development and Prospects. International Journal of Current Research and Academic Review. **2014**;2(12):188–200.
3. Souza AG, C Ferreira IC. Advances in cell culture: More than a century after cultivating cells. J Biotechnol Biomater **2016**;6(2).
4. Simian M, Bissell MJ. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. J Cell Biol **2017**;216(1):31–40.
5. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **1906**;4(1):140-143
6. Burrows MT. THE CULTIVATION OF TISSUES OF THE CHICK-EMBRYO OUTSIDE THE BODY. J Am Med Assoc **1910**;55(24):2057-2058
7. Carrel A, Burrows MT. Cultivation of adult tissues and organs outside of the body. J Am Med Assoc **1910**;55(16):1379-1381.
8. Jedrzejczak-Silicka M. History of Cell Culture. In: Sivakumar Joghi Thatha Gowder, editor. New Insights into Cell Culture Technology Rijeka: IntechOpen; **2017**
9. Pannett CA, Compton A. THE CULTIVATION OF TISSUES IN SALINE EMBRYONIC JUICE. The Lancet **1924**;203(5243):381-384
10. Baker LE. Artificial Media for the Cultivation of Fibroblasts, Epithelial Cells and Monocytes. Science **1936**;83(2164):605-606
11. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. Reprod Med Biol **2017**;16(2):99–117.
12. Abraham EP, Chain E, Fletcher CM, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, et al. FURTHER OBSERVATIONS ON PENICILLIN. The Lancet **1941**;238(6155):177-189
13. Kuhlmann I. The prophylactic use of antibiotics in cell culture. Cytotechnology **1995** June 01;19(2):95-105
14. Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E. Production of Malignancy in Vitro. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells. J Natl Cancer Inst **1943**;4(2):165-212

15. Lozano YY, Ochoa DC, Zapata AC. Cultivos de células animales: historia, aplicaciones y perspectivas. *Ámbito Investigativo*. **2019**;4(1).
16. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science* **2018**;14(4):910-919
17. Ryan SL, Baird AM, Vaz G, Urquhart AJ, Senge M, Richard DJ, et al. Drug Discovery Approaches Utilizing Three-Dimensional Cell Culture. *Assay Drug Dev Technol* **2016** February 01;14(1):19-28
18. Mimetas B.V. [Internet]. 2D Versus 3D Cell Cultures: Advantages and Disadvantages (s.f.) [Consultado 12/04/2022] <https://www.mimetas.com/en/blogs/315/2d-versus-3d-cell-cultures-advantages-and-disadvantages.html>
19. Lv D, Hu Z, Lu L, Lu H, Xu X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol Lett* **2017** December 01;14(6):6999-7010
20. Abbott A. Biology's new dimension. *Nature* **2003** August 01;424(6951):870-872
21. Fitzgerald AA, Li E, Weiner LM. 3D Culture Systems for Exploring Cancer Immunology. *Cancers* **2021**;13(1)
22. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* **2014** May 01;12(4):207-218
23. Herbst C. Über das Auseinandergehen von Furchungs- und Gewebezellen in kalkfreiem Medium. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* **1900**;9(3):424-463. German.
24. Wilson HV. ON SOME PHENOMENA OF COALESCENCE AND REGENERATION IN SPONGES. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society* **1907**;23(4):161-174
25. Lewis WH. The adhesive quality of cells. *Anat Rec* **1922**;23(7):387-392
26. Ehrmann RL, Gey GO. The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen. *J Natl Cancer Inst* **1956**;16(6):1375-1403
27. Habanjar O, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**;22(22)
28. Hutmacher DW. Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nat Mater* **2010** February 01;9(2):90-93
29. Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *Int J Mol Sci* **2018**;19(10).
30. Colombo E, Cattaneo MG. Multicellular 3D models to study tumour-stroma interactions. *Int J Mol Sci* **2021**;22(4):1633.
31. Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* **2010**;339(1):237-46.
32. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* **2016** February 01;97:4-27
33. Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2012**;28:523-553
34. Kaur J, Reinhardt DP. Chapter 3 - Extracellular Matrix (ECM) Molecules. In: Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M, editors. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* Boston: Academic Press; **2015**. p. 25-45
35. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**;3(1):a004978.
36. Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**;4(1):a004903.
37. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**;3(7):a004952-a004952.
38. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2007**;23(1):435-61.
39. Sainio A, Järveläinen H. Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications. *Cell Signal* **2020**;66(109487):109487.
40. Rozario T, DeSimone DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* **2010**;341(1):126-40.
41. Yue B. Biology of the extracellular matrix: An overview. *J Glaucoma* **2014**;23:S20-3.
42. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2nd ed.: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; **2013**
43. Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov* **2022**;12(1):31-46.
44. Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**;109(38):15101-8.
45. Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol* **2018**;9:6.
46. Evangelatov A, Pankov R. The evolution of three-dimensional cell cultures towards unimpeded regenerative medicine and tissue engineering. En: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. InTech; **2013**.
47. Eltom A, Zhong G, Muhammad A. Scaffold techniques and designs in tissue engineering functions and purposes: A review. *Adv Mater Sci Eng* **2019**;2019:1-13.

48. Fereshteh Z. 7 - Freeze-drying technologies for 3D scaffold engineering. En: Deng Y, Kuiper J, editores. *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*. Woodhead Publishing; **2018**. p. 151–74.
49. Capuana E, Lopresti F, Carfi Pavia F, Brucato V, La Carrubba V. Solution-based processing for scaffold fabrication in tissue engineering applications: A brief review. *Polymers (Basel)* **2021**;13(13):2041.
50. Dattola E, Parrotta EI, Scalise S, Perozziello G, Limongi T, Candeloro P, et al. Development of 3D PVA scaffolds for cardiac tissue engineering and cell screening applications. *RSC Adv* **2019**;9(8):4246–57.
51. Mozafari M, Kargozar S, de Santiago GT, Mohammadi MR, Milan PB, Foroutan Koudehi M, et al. Synthesis and characterisation of highly interconnected porous poly( $\epsilon$ -caprolactone)-collagen scaffolds: a therapeutic design to facilitate tendon regeneration. *Mater Technol (UK)* **2018**;33(1):29–37.
52. Luo K, Wang L, Chen X, Zeng X, Zhou S, Zhang P, et al. Biomimetic polyurethane 3D scaffolds based on polytetrahydrofuran glycol and polyethylene glycol for soft tissue engineering. *Polymers (Basel)* **2020**;12(11):2631.
53. American Society for Testing and Materials (ASTM). [Internet]. Additive Manufacturing Overview. (s.f.) [Consultado 19/04/2022] <https://v1backup.astm.org/industry/additive-manufacturing-overview.html>
54. Moroni L, Burdick JA, Highley C, Lee SJ, Morimoto Y, Takeuchi S, et al. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat Rev Mater* **2018**;3(5):21–37.
55. INEO PROTOTIPOS. [Internet]. Modelado por Deposición Fundida (FDM). (s.f.) [Consultado 18/04/2022] <https://www.ineo.es/es/tecnologias-menuoff/modelado-deposicion-fundida-fdm-menuoff>
56. Hong J, Yeo M, Yang GH, Kim G. Cell-electrospinning and its application for tissue engineering. *Int J Mol Sci* **2019**;20(24):6208.
57. Gross BC, Erkal JL, Lockwood SY, Chen C, Spence DM. Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences. *Anal Chem* **2014**;86(7):3240–53.
58. Creff J, Courson R, Mangeat T, Foncy J, Souleille S, Thibault C, et al. Fabrication of 3D scaffolds reproducing intestinal epithelium topography by high-resolution 3D stereolithography. *Biomaterials* **2019**;221(119404):119404.
59. Polonio-Alcalá E, Rabionet M, Guerra A, Yeste M, Ciurana J, Puig T. Screening of additive manufactured scaffolds designs for triple negative breast cancer 3D cell culture and stem-like expansion. *Int J Mol Sci* **2018**;19(10):3148.
60. Frost HK, Andersson T, Johansson S, Englund-Johansson U, Ekström P, Dahlin LB, et al. Electrospun nerve guide conduits have the potential to bridge peripheral nerve injuries in vivo. *Sci Rep* **2018**;8(1):16716.
61. Unnikrishnan K, Thomas LV, Ram Kumar RM. Advancement of scaffold-based 3D cellular models in cancer tissue engineering: An update. *Front Oncol* **2021**;11:733652.
62. Elisseeff J. Hydrogels: structure starts to gel. *Nat Mater* **2008**;7(4):271–3.
63. Gels and hydrogels [Internet]. *Nat* [Consultado 27/05/2022] <https://www.nature.com/subjects/gels-and-hydrogels>
64. Friedl P, Bröcker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **2000**;57(1):41–64.
65. Xie J, Bao M, Bruekers SMC, Huck WTS. Collagen gels with different fibrillar microarchitectures elicit different cellular responses. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**;9(23):19630–7.
66. Caliarì SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods* **2016**;13(5):405–14.
67. Sarrigiannidis SO, Rey JM, Dobre O, González-García C, Dalby MJ, Salmeron-Sanchez M. A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities. *Mater Today Bio* **2021**;10(100098):100098.
68. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* **2010**;10(9):1886–90.
69. Benton G, George J, Kleinman HK, Arnaoutova IP. Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix. *J Cell Physiol* **2009**;221(1):18–25.
70. Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer* **2011**;128(8):1751–7.
71. Sivaraj D, Chen K, Chattopadhyay A, Henn D, Wu W, Noishiki C, et al. Hydrogel scaffolds to deliver cell therapies for wound healing. *Front Bioeng Biotechnol* **2021**;9:660145.
72. Mohan R, Mohan N, Vaikkath D. Hyaluronic acid dictates chondrocyte morphology and migration in composite gels. *Tissue Eng Part A* **2018**;24(19–20):1481–91.
73. Rijal G, Wang J, Yu I, Gang DR, Chen RK, Li W. Porcine breast extracellular matrix hydrogel for spatial tissue culture. *Int J Mol Sci* **2018**;19(10).
74. Ruud KF, Hiscox WC, Yu I, Chen RK, Li W. Distinct phenotypes of cancer cells on tissue matrix gel. *Breast Cancer Res* **2020**;22(1):82.
75. Keller CR, Hu Y, Ruud KF, VanDeen AE, Martinez SR, Kahn BT, et al. Human breast extracellular matrix microstructures and protein hydrogel 3D cultures of mammary epithelial cells. *Cancers (Basel)* **2021**;13(22):5857.
76. Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov Today Technol* **2017**;23:27–36.
77. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a type of three-dimensional cell

- cultures-examples of methods of preparation and the most important application. *Int J Mol Sci* **2020**;21(17):6225.
78. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp* **2011**;(51).
  79. Costa EC, de Melo-Diogo D, Moreira AF, Carvalho MP, Correia IJ. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and practical approaches. *Biotechnol J* **2018**;13(1).
  80. Velasco V, Shariati SA, Esfandyarpour R. Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsyst Nanoeng* **2020**;6(1):76.
  81. Van Zundert I, Fortuni B, Rocha S. From 2D to 3D cancer cell models-the enigmas of drug delivery research. *Nanomaterials (Basel)* **2020**;10(11):2236.
  82. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther* **2016**;163:94–108.
  83. Gunti S, Hoke ATK, Vu KP, London NR Jr. Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications. *Cancers (Basel)* **2021**;13(4):874.
  84. Kim J, Koo B-K, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**;21(10):571–84.
  85. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* **2014**;9(10):2329–40.
  86. Pleguezuelos-Manzano C, Puschhof J, van den Brink S, Geurts V, Beumer J, Clevers H. Establishment and culture of human intestinal organoids derived from adult stem cells. *Curr Protoc Immunol* **2020**;130(1):e106.
  87. Palikuqi B, Nguyen D-HT, Li G, Schreiner R, Pellegata AF, Liu Y, et al. Adaptable haemodynamic endothelial cells for organogenesis and tumorigenesis. *Nature* **2020**;585(7825):426–32.
  88. Sogawa C, Eguchi T, Namba Y, Okusha Y, Aoyama E, Ohyama K, et al. Gel-free 3D tumoroids with stem cell properties modeling drug resistance to Cisplatin and Imatinib in metastatic colorectal cancer. *Cells* **2021**;10(2):344.
  89. Grimm D, Wehland M, Corydon TJ, Richter P, Prasad B, Bauer J, et al. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells. *Stem Cells Transl Med* **2020**;9(8):882–94.
  90. Bragheri F, Martínez Vázquez R, Osellame R. Chapter 12.3 - Microfluidics. In: Baldacchini T, editor. *Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization (Second Edition)*: William Andrew Publishing; **2020**. p. 493-526
  91. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **2006**;442(7101):368–73.
  92. Rabiee M, Namaei Ghasemnia N, Rabiee N, Bagherzadeh M. Chapter 7 - Microfluidic devices and drug delivery systems. In: Hamblin MR, Karimi M, editors. *Biomedical Applications of Microfluidic Devices*: Academic Press; **2021**. p. 153-186
  93. Ma Y-HV, Middleton K, You L, Sun Y. A review of microfluidic approaches for investigating cancer extravasation during metastasis. *Microsyst Nanoeng* **2018**;4(1):17104.
  94. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today (Kidlington)* **2011**;14(3):88–95.
  95. Franco-Barraza J, Beacham DA, Amatangelo MD, Cukierman E. Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol* **2016**;71(1):10.9.1-10.9.34.
  96. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* **2008**;17 Suppl 4(S4):467–79.
  97. Kaukonen R, Mai A, Georgiadou M, Saari M, De Franceschi N, Betz T, et al. Normal stroma suppresses cancer cell proliferation via mechanosensitive regulation of JMJD1a-mediated transcription. *Nat Commun* **2016**;7(1):12237.
  98. Centro de investigación del Cáncer - Comprehensive Cancer Center Research [Internet]. Esther Castellano: Research Areas. (s.f.) [Consultado 23/05/2022]. <https://www.cicancer.org/grupo?id=38>
  99. Danielson JJ, Perez N, Romano JD, Coppens I. Modelling *Toxoplasma gondii* infection in a 3D cell culture system In Vitro: Comparison with infection in 2D cell monolayers. *PLoS One* **2018**;13(12):e0208558.
  100. Han Y, Duan X, Yang L, Nilsson-Payant BE, Wang P, Duan F, et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids. *Nature* **2021**;589(7841):270–5.
  101. Barrila J, Crabbé A, Yang J, Franco K, Nydam SD, Forsyth RJ, et al. Modeling host-pathogen interactions in the context of the microenvironment: Three-dimensional cell culture comes of age. *Infect Immun* **2018**;86(11).
  102. Pape J, Emberton M, Cheema U. 3D cancer models: The need for a complex stroma, compartmentalization and stiffness. *Front Bioeng Biotechnol* **2021**;9:660502.
  103. Wang X, Li X, Ding J, Long X, Zhang H, Zhang X, et al. 3D bioprinted glioma microenvironment for glioma vascularization. *J Biomed Mater Res A* **2021**;109(6):915–25.
  104. Kim MJ, Chi BH, Yoo JJ, Ju YM, Whang YM, Chang IH. Structure establishment of three-dimensional (3D) cell culture printing model for bladder cancer. *PLoS One* **2019**;14(10):e0223689.
  105. Breslin S, O'Driscoll L. The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance. *Oncotarget* **2016**;7(29):45745–56.
  106. Fontoura JC, Viezzer C, Dos Santos FG, Ligabue RA, Weinlich R, Puga RD, et al. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2020**;107(110264):110264.
  107. Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, et al. Comparison of 2D- and 3D-

- culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* **2015**;33(4):1837–43.
108. Muguruma M, Teraoka S, Miyahara K, Ueda A, Asaoka M, Okazaki M, et al. Differences in drug sensitivity between two-dimensional and three-dimensional culture systems in triple-negative breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **2020**;533(3):268–74.
  109. Benelli R, Zocchi MR, Poggi A. Three-dimensional (3D) culture models in cancer investigation, drug testing and immune response evaluation. *Int J Mol Sci* **2020**;22(1):150.
  110. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *Int J Mol Sci* **2018**;19(1):181.
  111. Ravi M, Ramesh A, Patabhi A. Contributions of 3D cell cultures for cancer research: Contributions of 3d cell cultures for cancer research. *J Cell Physiol* **2017**;232(10):2679–97.
  112. Rosendahl J, Svanström A, Berglin M, Petronis S, Bogestål Y, Stenlund P, et al. 3D printed nanocellulose scaffolds as a cancer cell culture model system. *Bioengineering (Basel)* **2021**;8(7):97.
  113. Erdogan B, Ao M, White LM, Means AL, Brewer BM, Yang L, et al. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J Cell Biol* **2017**;216(11):3799–816.
  114. Northey JJ, Barrett AS, Acerbi I, Hayward M-K, Talamantes S, Dean IS, et al. Stiff stroma increases breast cancer risk by inducing the oncogene ZNF217. *J Clin Invest* **2020**;130(11):5721–37.
  115. Koedoot E, Wolters L, Smid M, Stoilov P, Burger GA, Herpers B, et al. Differential reprogramming of breast cancer subtypes in 3D cultures and implications for sensitivity to targeted therapy. *Sci Rep* **2021**;11(1):7259.
  116. Kim YE, Jeon HJ, Kim D, Lee SY, Kim KY, Hong J, et al. Quantitative proteomic analysis of 2D and 3D cultured colorectal cancer cells: Profiling of tankyrase inhibitor XAV939-induced proteome. *Sci Rep* **2018**;8(1):13255.
  117. Dumont N, Liu B, Defilippis RA, Chang H, Rabban JT, Karnezis AN, et al. Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia* **2013**;15(3):249–62.
  118. Ray A, Provenzano PP. Aligned forces: Origins and mechanisms of cancer dissemination guided by extracellular matrix architecture. *Curr Opin Cell Biol* **2021**;72:63–71.
  119. Provenzano PP, Inman DR, Eliceiri KW, Keely PJ. Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage. *Oncogene* **2009**;28(49):4326–43.
  120. Sperr E. [Internet] Search Workbench 2017 [Consultado 24/05/2022]. <https://searchworkbench.info/>
  121. Hussey GS, Dziki JL, Badylak SF. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat Rev Mater* **2018**;3(7):159–73.
  122. Merck KGaA [Internet]. Hydrogels (s.f.) [Consultado 24/05/2022]. <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/products/cell-culture-and-analysis/3d-cell-culture/hydrogels>
  123. Mimetas B.V. [Internet]. 3D Cell Cultures vs. Traditional 2D Cell Culture Explained (s.f.) [Consultado 24/05/2022]. <https://www.mimetas.com/en/blogs/345/3d-cell-culture-vs.-traditional-2d-cell-culture-explained.html>