

# Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo

José Meseguer, M<sup>a</sup> Ángeles Esteban, Victoriano Mulero, Alberto Cuesta y M<sup>a</sup> Pilar Sepulcre

Departamento de Biología Celular e Histología (Biología Celular), Universidad de Murcia.

meseguer@um.es, aesteban@um.es, vmulero@um.es, alcuesta@um.es, mpsepul@um.es

## INTRODUCCIÓN

Hacia finales del siglo XX, se inicia un fenómeno de convergencia entre diferentes disciplinas científicas tales como Informática, Física, Química o Matemáticas con la Biología, originando nuevos campos de actuación cuya denominación se caracteriza por el prefijo "Bio" como expresión de su orientación y contenido. Además, la mayoría de estas disciplinas de fusión, se proyectan inexorablemente hacia áreas sanitarias (Veterinaria, Medicina o Psicología) y tecnológicas (Industria, Ingeniería o Arquitectura), originando nuevos campos científicos concretos de entre los que destacan la Biosanidad y la Biotecnología. Todo ello ha determinado avances analíticos, técnicos, metodológicos e instrumentales (óptica, robótica, modelado, tratamiento de datos, sensores, materiales, marcadores, etc.) que pretenden dar respuesta a nuevas cuestiones propias de estos nuevos campos de la ciencia.

Podemos decir que, al igual que al final de la segunda guerra mundial se produce un importante desarrollo del conocimiento científico como consecuencia del uso del microscopio electrónico y el descubrimiento de la estructura del ADN, en años recientes también tiene lugar un desarrollo sorprendente del mismo, como consecuencia de los avances acontecidos en genómica y proteómica, en las técnicas de análisis y tratamiento de imágenes, así como en la propuesta de recientes modelos para el mantenimiento de células y tejidos *in vitro*. En este contexto, podemos considerar que, en el momento actual, uno de los objetivos esenciales de la Biología Celular es el conocer la estructura, ubicación e interrelación de las biomoléculas, como medio para explicar la "vida" de las células, en su situación tanto de células aisladas, como integrantes de masas celulares normales o patológicas, o como integrantes de los organismos multicelulares.

Sin lugar a duda, uno de los avances científicos actuales más importante es la producción de líneas celulares mediante reprogramación celular, técnica de Biología Celular que ha abierto nuevos horizontes y esperanzas para la solución de importantes enfermedades que aquejan a la humanidad y

que en un futuro casi inmediato se prevé que permitirán salvar numerosas vidas. Ello ha sido posible gracias a la transformación, crecimiento y división de células en el laboratorio, en condiciones de cultivo. Es por ello, que numerosos investigadores de todo el mundo se centran actualmente en la propuesta de nuevos modelos de cultivo de células, tema que abordamos a continuación.

Estudios recientes sobre comunicación, microambiente y comportamiento espacial de las células tumorales, o sobre las necesidades de métodos eficaces de expansión de las células madre, han puesto de manifiesto la necesidad de disponer de procedimientos nuevos, que permitan cultivar células en un entorno lo más similar posible al del tejido del que forman parte en el organismo vivo. En este sentido, los cultivos de células tradicionales, en dos dimensiones (2D), han mostrado limitaciones esenciales tales como la imposibilidad de reproducir la morfología y las propiedades bioquímicas que poseen las células en su emplazamiento en el organismo vivo. Para resolver estos y otros problemas de similar naturaleza, se ha propuesto el uso de modelos de cultivo en tres dimensiones (3D), tales como los denominados esferoides y esferas líquidas. Estos métodos tienen una amplia variedad de usos: permiten investigaciones *in vitro* sobre las relaciones estructura-función celulares en situaciones normales o patológicas; en estudios sobre la interacción célula-sustancias o estructuras del medio orgánico, tales como los factores de crecimiento, las citoquinas, los componentes de la matriz extracelular, etc., para el diagnóstico clínico; o en el análisis de la relación entre células y diferentes agentes suministrados al medio.

Los resultados obtenidos con el uso de estos modelos de cultivo 3D permiten concluir que las condiciones de mantenimiento de las células, según dichos modelos, son altamente similares a aquellas condiciones en las que se encuentran en el organismo vivo.

Los orígenes de los esferoides como método de estudio 3D se remontan a los trabajos sobre morfogénesis realizados hacia los años cuarenta y siguientes por investigadores tales como Holtfreter (1944) o Moscona (1952, 1961), que

utilizaron reagregados esferoideales de células, o por Sutherland y colaboradores (1971, 1988) que utilizaron esferoides multicelulares de células tumorales en sus estudios sobre la respuesta de estas células a agentes terapéuticos. En contraste, las esferas líquidas han sido principalmente objeto de estudio de la Física y la Química, habiendo despertado el interés de la Biología y de la Medicina muy recientemente. Actualmente son numerosas las áreas científicas en las que se están utilizando los esferoides como modelos de cultivo 3D para el desarrollo de investigaciones biomédicas, hasta tal punto que podemos afirmar que nos movemos desde los cultivos 2D hacia una nueva era de los estudios *in vitro*, la era de los cultivos en 3D. La diferencia fundamental entre ambos tipos de cultivo es que en los cultivos 2D las células crecen en monocapa, adheridas a un sustrato plano o en suspensión, mientras que en los modelos de cultivos 3D las células se localizan sobre andamiajes sólidos (naturales o artificiales), o formando grupos celulares generalmente de forma esferoide (esferoides) o en pequeñas formaciones a modo de cápsulas esféricas (esferas líquidas). En ellos, las interacciones que se establecen son del tipo célula-célula o célula-medio, de modo semejante a como acontece *in vivo*. Las condiciones que proporcionan estos modelos resultan de especial trascendencia en el caso de estudios de replicación y penetración viral (Finocchiaro *et al.*, 2004) o en los estudios de células del cáncer, ya que, es sabido que las condiciones del medio en que se desarrollan las células tumorales tienen efectos determinantes sobre sus propiedades neoplásicas, lo cual afecta al modo en que responden las células tumorales a los tratamientos quimioterapéuticos (Sahai y Marshall, 2003). Además, una de las características destacables de los cultivos 3D esferoideales es su geometría, en cuanto a que esta determina la forma, el estado de polaridad y el ambiente celular, los cuales están íntimamente relacionados con la expresión de genes y el comportamiento biológico de las células (Mueller-Klieser, 1997). Se han generado diferentes modelos de cultivos 3D de entre los que cabe citar los que utilizan: explantes de tejidos u órganos; microtransportadores; vasos de pared rotatoria o biorreactores de microgravedad; sistemas de matriz de gel; cultivo de una balsa epitelial; masas esferoideales de células; etc. (Andrei *et al.*, 2005).

Es importante considerar que, al seleccionar uno de estos modelos para un determinado trabajo, se ha de tener en cuenta el tipo de matriz que habrá de rodear las células, ya que esta determinará el que las células permanezcan en un ambiente lo más parecido posible al del tejido del cual proceden, condicionando la conservación de la morfología y las funciones celulares durante el tiempo de cultivo, se trata de reproducir la reciprocidad célula-matriz extracelular, siendo este un tema objeto de debate, como consecuencia del hecho de que son las propias células las que producen la matriz y generan las señales de comunicación tanto

extracelulares como intracelulares, por lo que se ha sugerido que el solo hecho de la tridimensionalidad no debe ser el único aspecto a considerar (Baker y Chen, 2012). Por otra parte, el cultivo de más de un tipo celular simultáneamente permite simular mejor las condiciones *in vivo*. En el caso de investigaciones que se proponen barridos amplios de datos, resultan de gran utilidad aquellos modelos que permiten desarrollar fácilmente numerosos cultivos individuales que sean susceptibles de ser trabajados de modo automático.

En definitiva, podemos decir que sumar a los cultivos 2D la tercera dimensión supone entrar en un mundo nuevo y diferente de la investigación *in vitro*, ya que implica un cambio en la expresión de genes, en la producción de proteínas, y en la forma y las relaciones de las células, es decir nos planteamos una situación completamente nueva en cuanto a cómo se diferencian, proliferan, interactúan y sobreviven las células en cultivo (Dance, 2012). En el presente trabajo de revisión dedicaremos nuestra atención exclusivamente a dos de los modelos: los conocidos como cultivos 3D utilizando “esferoides” y al recientemente propuesto método de encapsulación de líquido, bajo el nombre de “esferas líquidas” como posible modelo (McHale y Newton, 2015). El desarrollo de estos modelos ha supuesto la integración de conocimientos de la Biología Celular, las Matemáticas, la Física, la Química y la Ingeniería. Así mismo, está conllevando el desarrollo de nuevas líneas celulares y de nuevos métodos de análisis cuantitativo, incluidas las técnicas de imagen tridimensional. Por otra parte, el uso de estos métodos está determinando un descenso notable del uso de animales de laboratorio, de modo particular en el caso de ensayos de toxicidad o de pruebas farmacológicas mediante esferoides.

## LOS ESFEROIDES

Los esferoides son un modelo de cultivo 3D que aprovecha la tendencia natural a agregarse que muestran muchos tipos celulares, para crear masas multicelulares de forma esferoide, que son objeto de cultivo *in vitro*. En la práctica, este modelo puede ser utilizado en cualquier tipo de investigación biomédica, debido a que, si se dan las condiciones adecuadas, se pueden formar esferoides con cualquier tipo de célula. Los esferoides se vienen utilizando con éxito en importantes campos científicos, tales como el de la Biología Celular (adhesión, migración o morfogénesis), la Virología (aislamiento, propagación y cuantificación de virus, interacción célula-virus); la Farmacología (evaluación de fármacos); la Inmunología (producción de vacunas, uso de moduladores inmunitarios); la Cirugía (comportamiento de células de diferentes tejidos, como las de hueso y cartílago en diferentes medios o frente a diferentes materiales); la Oncobiología y la Cancerología (recreación de tumores, estudios de quimiocinas en células cancerosas, o terapia

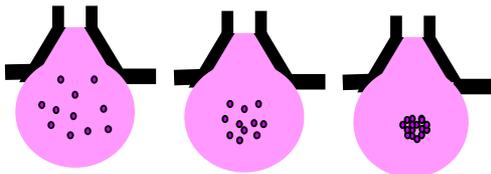
basada en anticuerpos); la Biología del Desarrollo y de la Fertilización (desarrollo de embriones), etc.

Un método sencillo para generar esferoides consiste en crear gotas de una suspensión celular (“método de la gota colgante”) sobre la cara inferior de una superficie de vidrio o plástico (placa de Petri) o utilizando placas de 96 pocillos de fondo horadado (figura 1).



**Figura 1.** Método de la gota colgante. a) Esferoides en la cara inferior de un vidrio circular. b) Esferoides en una placa de 96 pocillos de fondo horadado.

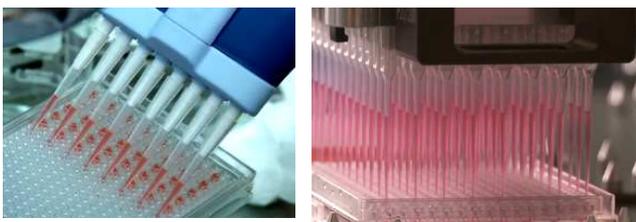
En cada gota así creada, las células se desplazan hacia el fondo de la misma, donde forman un agregado, para originar finalmente una masa de forma esferoidal o esferoide (figura 2).



**Figura 2.** Esquema del desplazamiento celular durante la formación de un esferoide en el interior de una gota colgante.

Atendiendo al número de tipos celulares presentes en el esferoide, se pueden crear esferoides en forma de cultivo simple (esferoide monocelular) o como cocultivos (esferoide multicelular). Una vez creadas las gotas pendientes de su soporte, conteniendo cada gota un esferoide, el soporte es llevado a un incubador.

Las suspensiones celulares pueden ser dispensadas mediante pipeta, multipipeta o con dispensador mecánico (figura 3).



**Figura 3.** Dispensado de la suspensión celular a) Mediante multipipeta. b) Mediante dispensador automático.

Otro método muy simple para crear esferoides, en el estudio de tumores, consiste en sembrar un número definido de células tumorales en suspensión (de 1000 a 20 000 células) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo o cónico, en medio de crecimiento estándar, y centrifugar durante 10 minutos a 1000g. A las 24 horas de cultivo se genera un esferoide individual en cada pocillo. Todos ellos muestran uniformidad de tamaño, morfología y estratificación de células (los esferoides multicelulares tumorales, al igual que los tumores sólidos y las metástasis avasculares *in vivo*, constan de varios cientos de células dispuestas en tres capas: una capa externa de células proliferantes, responsables del crecimiento del tumor en los organismos vivos; una capa media de células quiescentes; y una zona interna de necrosis central, formada por células que han muerto por deficiencia aguda de nutrientes e hipoxia). Se ha comprobado que si se adiciona a estos cultivos 3D extracto de membrana basal, algunas de las líneas celulares tumorales evolucionan rápidamente desde agregados celulares hasta la morfología esferoidal. Una descripción detallada del protocolo para la consecución de esferoides siguiendo este método, puede ser consultada en el artículo publicado por Phung *et al.* (2011).

Se asume que la tasa de crecimiento celular es diferente en la periferia y en el centro de cada esferoide, siendo posible predecir matemáticamente el cambio de volumen del esferoide con el tiempo. Dicha tasa de crecimiento puede ser modificada experimentalmente mediante una o más señales mecánicas o bioquímicas del ambiente local (presión, ósmosis, temperatura, cambios en la composición del medio, moléculas solubles, nutrientes, vitaminas, factores de crecimiento, etc.). Este aspecto resulta de gran interés para estudios sobre el crecimiento de tumores, entre otros. Una consecuencia no deseada de estos tratamientos es la formación de tejidos aberrantes, en especial, como consecuencia de un incremento inadecuado en la presión hidrostática.

También se pueden crear esferoides mediante vasos de pared rotatoria o biorreactores. En ambos casos la agregación de las células se produce por efecto gravitatorio sumado a la tendencia natural de agregación de las células.

No es factible producir esferoides de más de 500 micrómetros de diámetro, debido a que las células del centro mueren al carecer de nutrientes suficientes. No obstante, con la intención de abordar estudios biofísicos de corta duración, este mismo año ha sido publicado un método sorprendente para producir grandes esferoides (tamaño milimétrico en imágenes a tiempo real) que permiten caracterizar diferentes propiedades mecánicas de éstos, incluidas la tensión superficial, viscosidad y tensión de fluencia (deformación elástica irreversible) (Mazuel *et al.*, 2015). Para ello, les son

conferidas propiedades magnéticas a las células añadiendo nanopartículas magnéticas al medio de cultivo, que son absorbidas por estas células sin que se vean alteradas sus funciones. A continuación se llena un molde con dichas células y se someten a un campo magnético para conseguir compactarlas, hasta formar un esferoide de tamaño mucho mayor que los producidos con los métodos anteriores. Finalmente se procede a aplanar los esferoides sobre una superficie plana mediante aplicación de un campo magnético permanente. Con este método se comprueba que los “esferoides magnéticos” más pequeños se comportan como gotas de líquido frente al proceso de aplastamiento, mientras que los “esferoides magnéticos” más grandes se comportan como sólidos elásticos en tiempos cortos y como gotas líquidas en tiempos más largos. Esta técnica se considera muy prometedora para el estudio de cómo los procesos de división o muerte celular cambian las propiedades de un tejido, y para caracterizar otros sistemas blandos diferentes de los esferoides, tales como los hidrogeles o las esferas líquidas.

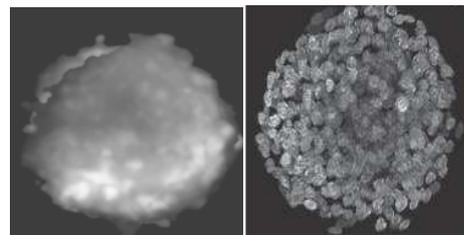
Cuando se trabaja con células que están polarizadas en su estado natural, como es el caso de los epitelios (células endoteliales, células de los túbulos renales, folículos, acini, etc.), es posible obtener la formación de quistes, esferas huecas de una monocapa de células, perfectamente polarizadas, flotando en un gel de colágeno hidratado. En este caso, las células crecen de modo que sus superficies latero-basales (exterior del quiste) quedan en contacto con el gel, mientras que su superficie apical contacta con el fluido interno de la cavidad (de modo altamente similar a como ocurre en los capilares sanguíneos y linfáticos, o en la nefrona).

El uso de esferoides, como modelo de cultivo 3D, supone importantes ventajas: 1) Las células del esferoide no se encuentran adheridas a un soporte, sino que forman un agregado celular de forma esferoidal en el interior de un líquido pipeteable durante todo el tiempo que dura el cultivo. 2) Las células del esferoide no requieren un andamiaje externo o interno para agregarse. 3) Las células del esferoide se pueden unir unas a otras, mimetizando un ambiente fisiológico similar al del tejido de procedencia. 4) Las células del esferoide pueden originar su propia matriz extracelular. 5) Las células del esferoide ven preservado su fenotipo celular específico característico de un tejido diferenciado.

Cuando se trabaja con agregados celulares (esferoides) grandes, se ha de llevar un control cuidadoso del intercambio de gas, así como de la difusión de los nutrientes solubles y de los agentes químicos.

Los esferoides, como cualquier cultivo de células, requieren del control y el análisis microscópicos. Esto ha determinado la necesidad de métodos microscópicos que nos

proporcionen condiciones tales como capacidad para la obtención de secciones ópticas, una rápida tasa de grabado de imágenes que permitan el apilamiento y la resolución espacial, amplio campo de visión, y bajo nivel de excitación de fluoróforos, entre otras. La microscopía de fluorescencia confocal resulta insuficiente. También resulta insuficiente la microscopía multifotón debido a los efectos de fotoblanqueo y fototoxicidad. Así mismo, la tomografía presenta limitaciones (de coherencia óptica o de proyección óptica) en términos de resolución espacial y de tasa de grabado. La creación de novedosos métodos microscópicos tales como el microscopio de fluorescencia confocal theta, microscopía confocal 4Pi, microscopía I<sup>5</sup>M, y microscopía de fluorescencia de depleción de emisión estimulada (STED) ha permitido el estudio de células fijadas. Pero, salvo el microscopio theta, estos métodos no permiten el estudio adecuado de muestras vivas de varios cientos de micras de espesor, como es el caso de muchos esferoides. Actualmente parece prometedora la recién creada microscopía de fluorescencia por hojas de luz (microscopía de iluminación en un solo plano o SPIM) que combina el seccionado por fluorescencia óptica y determinados aspectos de la tomografía (figura 4).



**Figura 4.** a) Esferoide observado con microscopio de fluorescencia confocal. b) Esferoide observado mediante microscopía de fluorescencia basada en hojas de luz. Máxima proyección de un apilamiento de una reconstrucción de multivisión de doce apilamientos grabados a lo largo de diferentes ángulos (0° a 330°) con un incremento sucesivo de 30°. Lente objetivo Carl Zeiss Apocromática 40x y apertura numérica de 0.8. El apilamiento comprende 400 secciones obtenidas con un espaciado axial de 0.5 micrómetros. Los núcleos fueron teñidos con Draq5 (excitación 647 nm, emisión 670 nm). Imagen final después de deconvolución. (Imagen modificada y adaptada de la presente en el trabajo de Pampaloni *et al.*, 2007).

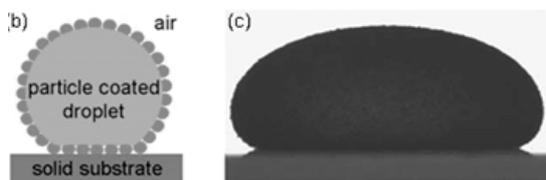
Aunque los esferoides imitan, de modo altamente semejante, las condiciones biológicas de las células en su emplazamiento vivo, deben ser tenidas en cuenta las distancias existentes entre cualquier modelo y la realidad. Así, en estudios sobre el cáncer, es obvio que los esferoides similares a tumores cancerosos representan, en todo caso, una estructura y composición mimética mucho más simple que el verdadero tumor (Trepatt, 2011).

## ESFERAS LÍQUIDAS

Una esfera líquida es una gota pequeña de líquido encapsulada mediante una delgada capa de partículas no solubles (concha), que la convierte en un objeto blando no-húmedo. La interfase líquido-vapor es reemplazada por una interfase sólido-líquido. Estas estructuras fueron creadas por primera vez haciendo rodar una pequeña gota de agua sobre una superficie sólida cubierta de granos de polen (hidrofóbicos). Curiosamente, los granos de polen se adherían fuertemente a la superficie de la gota de agua originando una estructura encapsulada (Aussillous y Quéré, 2001).

Todas las esferas líquidas encapsulan un líquido, convirtiendo lo que sería un contacto líquido-sólido en un contacto sólido-sólido (capa de partículas sólidas-sólido de soporte o sustrato). Estos conceptos fueron inicialmente planteados en términos de propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas de las partículas de la cápsula o concha en su interacción con el líquido de la gota.

El volumen de líquido encapsulado puede ser incrementado hasta cierto límite. Se pueden crear partículas de mayor tamaño, que no se corresponden con la concepción de cuerpo esférico de las esferas líquidas (figura 5).



**Figura 5.** a) Esquema de esfera líquida y de una gran gota de líquido no esférica, dispuestas sobre un sustrato sólido. Adaptado del esquema presente en el artículo de McHalle y Newton (2015).

Las partículas que forman la concha de cada esfera líquida se disponen en una capa, sueltas entre sí, de modo que no aíslan completamente al líquido, y pueden tener forma y tamaño variable e incluso se pueden usar partículas con extremos de diferente forma y orientación (por ejemplo, partículas con forma de barra prismática simple, o con uno de sus extremos de forma esférica). También se pueden producir esferas líquidas con concha de agregados multicapa, formados por partículas diferentes, en dos regiones de la superficie (región semiconductor/región dieléctrica, que permiten la orientación de la esfera mediante un campo eléctrico). La rigidez de la concha determina la forma de la esfera líquida.

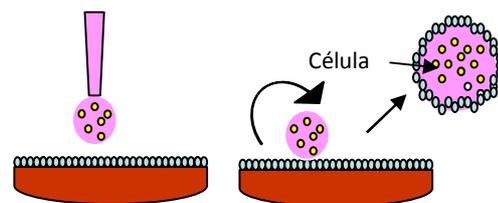
La concha permite una baja tasa de evaporación o desvanecimiento del líquido interior, modificando las propiedades de deformación y de impacto de la esfera

líquida. Las esferas líquidas pueden ser depositadas, a su vez, en otros líquidos y de modo general presentan propiedades de baja adhesión y alta movilidad tanto en interfases sólido-sólido como en interfases sólido-líquido. Además, se puede establecer contacto térmico con la gota de líquido a través de los componentes de la concha. Pueden ser mantenidas a baja temperatura ( $-7^{\circ}\text{C}$ ), pero se ha visto que bajas temperaturas dan lugar a cambios en la forma, la cual deja de ser esférica, para ser acampanada.

El tiempo de vida de una esfera líquida depende de su tamaño y del tipo de material que constituye la concha, el cual puede ser muy variado (grafito, metal, plástico, material biológico, lípidos, partículas magnéticas o magnetizables, etc.). Así, las esferas líquidas de partículas de grafito reducen la tasa de evaporación en un 25-45% comparadas con las gotas de líquido del mismo tamaño desprovistas de concha. Además, nanopartículas de óxido de hierro han sido utilizadas no solo para formar la concha, sino que han sido dispersadas en el interior de esferas líquidas, para permitir actuación magnética sobre ellas.

Existe una amplia gama de métodos para preparar partículas para la concha, las cuales, como ya se ha indicado, pueden tener diferente forma y tamaño (bolas, cápsulas, bastones, nanotúbulos, nanofibras, etc.).

En definitiva, podemos imaginar que una esfera líquida es una porción pequeña de líquido cuya superficie esférica está recubierta por partículas de baja rigidez de unión, con una baja tasa de evaporación. Sería como una red de nudos superficial imaginaria, forzada a determinar la forma de la gota, en la que cada nudo es una partícula (figura 6).



**Figura 6.** Esquema del proceso de formación de una esfera líquida. Adaptado del presente en el artículo de McHalle y Newton (2015).

Las esferas líquidas pueden ser desplazadas sobre superficies sólidas y responder a estímulos tales como cambios de pH, radiaciones o gases. Pueden ser utilizados como biorreactores (dos esferas líquidas que contienen diferentes líquidos separados, que cuando coalescen inician una reacción, o pueden ser conectados mediante un puente conductor creando un reactor micro-electroquímico).

Es particularmente novedoso su muy reciente uso en diferentes campos de la investigación biosanitaria, de modo

especial en ensayos diagnósticos tales como los de sangre para Rh y grupos sanguíneos, creando esferas líquidas de sangre, o inyectando anticuerpos a esferas líquidas de suspensiones celulares. También han comenzado a ser utilizadas en tratamientos de suspensiones celulares que supongan reacciones con cambios de color visualmente detectables. En microbiología y virología se han comenzado a aplicar en el estudio de la interacción célula-partícula. Es típico su uso clínico como cápsulas para suministro oral de fármacos semisólidos o líquidos de baja solubilidad en agua.

Actualmente, como un paso en la evolución del uso de las esferas líquidas, se plantea su aplicación en la tecnología de microarrays (de ácidos nucleicos, de células o de tejidos).

## CONCLUSIÓN

Existen razones suficientes para depositar grandes esperanzas en el uso de la tercera dimensión *in vitro*. Dada la trascendencia de los resultados de los estudios de las relaciones estructura-función celulares mediante la aplicación de modelos de cultivo 3D, estos se nos muestran como valiosas herramientas de investigación que permitirán avanzar en los estudios de integración de los datos de la genómica y la proteómica, de la Biología Celular y de la Biología Molecular. Así mismo, podemos prever que la introducción de la tercera dimensión en los cultivos propiciará la obtención de resultados esenciales en la investigación del uso de fármacos y en la investigación clínica. Además, la posibilidad de realizar barridos de toxicidad a gran escala se nos presenta como una prometedora alternativa, de gran valor ético y económico, al uso necesario de numerosos animales de laboratorio. Por otra parte, la necesidad de desarrollar nuevos métodos en la tecnología de imagen, permitirá salvar los obstáculos existentes en la observación de las células vivas que crecen en cultivos 3D (Pampaloni, 2007; McHale y Newton, 2015).

En lo que respecta a los conocimientos sobre las esferas líquidas, estos han avanzado sustancialmente durante los últimos años, pasando a ser tomadas en consideración para propósitos científicos concretos, sobre todo en lo que se refiere a los campos de la investigación biológica, biotecnológica y biomédica. Sus potenciales aplicaciones en la experimentación resultan ilimitadas, en particular en lo relativo a cultivos 3D (McHale y Newton, 2015).

## REFERENCIAS

- Andrei, G., (2006). Three-dimensional culture models for human viral diseases and antiviral drug development. Elsevier B.V. Bélgica.
- Aussillous, P., y Quéré, D. (2001). Liquid marbles. *Nature*, 411(6840): 924-927.
- Baker, B.M., y Chen, C.S. (2012). Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.*, 125: 3015-3024.
- Dance, A. (2012). Enter the Third Dimension. Cell culture goes 3D with devices that better mimic *in vivo* conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 109: 2173-2178.
- Finocchiaro, L.M., Bumashny, V.F., Karara, A.L., Fiszman, G.L., Casais, C.C., y Glikin, G.C. (2004). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in multicellular tumor spheroids. *Cancer Gene Ther.*, 11: 333-345.
- Holtfreter, J. (1944). A study of the mechanism of gastrulation. *J. Exp. Zool.*, 95: 171-212.
- Mazuel, F., Reffay, M., Du, V., Bacri, J.C., Rieu, J.P., y Wilhelm, C. (2015). Magnetic flattening of stem cell spheroids indicates a size-dependent elastocapillary transition. *Phys. Rev. Lett.*, 114: 098-105.
- McHale, G y Newton, M. I. (2015). Liquid marbles: topical context within soft matter and recent progress. *Soft Matter*, 11: 2530-2546.