

ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES EN LA EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ANTICANCEROSAS*

Juan Carlos Gallardo Pérez, Magali Espinosa Castilla,
Jorge Meléndez Zajgla y Vilma Maldonado Lagunas

RESUMEN

El cultivo de los esferoides tumorales multicelulares (MTS) ha cobrado relevancia en los últimos años como modelo *in vitro* de los tumores sólidos. La estructura general de los MTS mimetiza las etapas iniciales de los microtumores sólidos *in vivo* antes de la vascularización. Por lo anterior han sido utilizados en el estudio de la biología tumoral incluyendo migración, invasión y angiogénesis. La resistencia a diferentes fármacos antineoplásicos de los MTS es similar a la del tumor sólido. Además, empiezan a ser incluidos en pruebas fármaco-toxicológicas y en la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer como paso previo a su aplicación en los tumores sólidos *in vivo*.

PALABRAS CLAVE: Esferoides tumorales multicelulares, tumor sólido, resistencia, fármacos, terapia.

ABSTRACT

In the last years the culture *in vitro* of multicellular tumor spheroids (MTS) has gained relevance as model of solid tumors. The general structure of MTS clearly mimic the initial stages of solid microtumors formation before vascularization. Therefore, MTS have been employed in migration, invasion and angiogenesis studies. The MTS also resemble to solid tumor in multidrug resistance. In addition, MTS begin to be included in pharmaco-toxicologic tests and in evaluation of novel therapeutic strategies against cancer previously to its application in solid tumors.

KEY WORDS: Multicellular tumor spheroids, solid tumor, resistance, drugs, therapy.

INTRODUCCIÓN

En la investigación biomédica el cultivo tradicional *in vitro* de células cancerosas en monocapa (cultivos bidimensionales), ha brindado una enorme gama de resultados con respecto al comportamiento y respuesta celular a diversos agentes terapéuticos. Sin embargo, dichos resultados son muchas veces contradictorios cuando se escalan a nivel clínico. A diferencia de los tumores, los cultivos en monocapa son esencialmente homogéneos en cuanto al estado

nutricional, tensión de oxígeno, estado proliferativo, pH y eliminación de productos de desecho (1). La estructura tridimensional nativa de los carcinomas gobierna numerosas interacciones autócrinas y parácrinas relacionadas a la progresión del tumor. Estas interacciones no pueden ser recreadas en el modelo de cultivo en monocapa, en donde los contactos célula-célula están disminuidos y pierden la heterogeneidad asociada con un tumor sólido. Este problema se ha resuelto, en parte, con el uso de nuevos

modelos en cultivo que semejan la intrincada y compleja red tridimensional de las células en un organismo. Holtfreter, al final de la década de los setenta y posteriormente Moscona instrumentaron el cultivo celular tridimensional de fibroblastos de ratón (2). Posteriormente, Sutherland los utilizó en la evaluación de la eficacia de fármacos terapéuticos utilizando células humanas de cáncer.

Estos cultivos, denominados esferoides tumorales multicelulares (MTS, del inglés: Multicellular Tumor

*Recibido: 12 de agosto de 2006 Aceptado: 21 de noviembre de 2006

Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Subdirección de Investigación Básica, Laboratorio de Biología Molecular. Av. San Fernando, 22 Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, 14000, México, D.F. Fax: 56 28 04 32.
Correo E: jcgallardo@ciencias.unam.mx

Spheroids), tienen una complejidad intermedia entre los cultivos bidimensionales *in vitro* y los tumores sólidos *in vivo*. Los MTS presentan una compleja red organizada con interacciones tridimensionales célula-célula y célula-matriz extracelular (uniones comunicantes, desmosomas y E-cadherina, principalmente), por lo que cada célula individual está expuesta a diferentes condiciones de espacio y de disponibilidad de nutrientes (2, 3). Esta revisión pretende enfatizar las ventajas del cultivo de los esferoides tumorales, como modelo *in vitro* de los microtumores sólidos, sus características, su resistencia y la forma en que se han empleado para la evaluación de novedosas estrategias anticancerosas. Si bien es cierto que este modelo es un poco más parecido al tumor sólido que el cultivo en monocapa, también es cierto que carece de algunos elementos como su interacción con otros tipos celulares que rodean y forman al carcinoma y la neoangiogénesis, entre otros.

ESTRUCTURA DEL MTS

De acuerdo a su origen, existen dos tipos de esferoides tumorales. Los MTS clonogénicos y los MTS agregados. Los del primer tipo provienen de una célula tumoral o un pequeño explante de tejido (éste último conocido como OMS: esferoide multicelular organotípico) cultivadas, en una primera fase, en recipientes que contienen una superficie antiadherente y estática, lo que permite la creación de un núcleo primario. Después, los esferoides son sometidos a una segunda fase de agitación orbital, suave (40 a 50 rpm) que favorece la consolidación del MTS (Fig. 1). Estudios recientes revelan que la capacidad que poseen las células para crecer en forma tridimensional está influida por factores de señalización del suero tales como antígeno carcinoembrional, interferón- γ , IGF-II, heregulina β 1, plasmina, y E-

cadherina (4). La integridad del esferoide se mantiene por el incremento de uniones estrechas, comunicantes y desmosomas entre las células y un aumento de matriz extracelular. Los MTS clonogénicos pueden ser monocultivos (una sola línea celular) o co-cultivos con fibroblastos, células inmunes, mesenquimales o endoteliales, con lo que se añaden nuevos niveles de complejidad (1).

El segundo tipo de crecimiento en esferoide son los MTS agregados. En

este modelo no existe la formación de un núcleo primario ya que las células tumorales se colocan inmediatamente en agitación orbital constante para permitir su agregación (Fig. 1). Básicamente no hay formación de un centro necrótico y la mayor parte de las capas contienen células en proliferación. Las células en los agregados permanecen unidas entre sí por un tiempo determinado. Los MTS de tipo agregado pueden ser fácilmente disociados por fuerzas mecánicas ya que

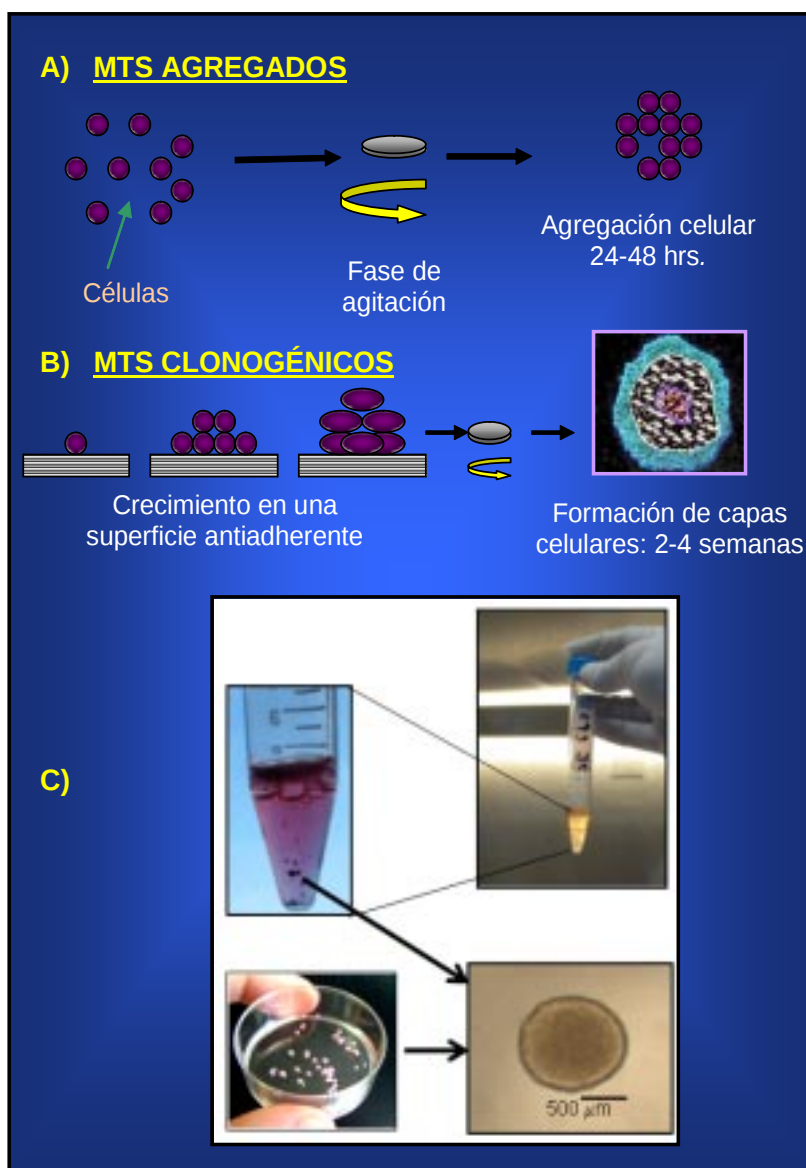


Figura 1. A) Modelo de la formación de MTS agregados y B) clonogénicos. C) Morfología de MTS clonogénicos derivados de la línea celular CaLo, cultivados con la técnica de "liquid overlay" (ver Tabla 1). El tamaño de estos esferoides tumorales puede llegar a ser de hasta 1500 μ m de diámetro. Microfotografía tomada con microscopía de luz de campo claro.

sus uniones no son fuertes. Este tipo de esferoides se utiliza cuando se requieren estudios que consuman poco tiempo ya que son de rápida formación de unos cuantos días, por lo que no se les da la oportunidad de compartimentalizarse, con respecto a los esferoides clonogénicos (algunas semanas) y son empleados principalmente para el estudio de penetrabilidad de fármacos o vectores de terapia génica, mientras que los esferoides clonogénicos se prefieren en estudios en donde se analiza el efecto de la hipoxia sobre la estructura esferoidal completa. Casi todas las líneas celulares tumorales pueden generar ambos tipos de esferoides.

Es importante distinguir entre MTS clonogénicos y MTS agregados ya que sólo los primeros forman una estructura compartimentalizada como en los microtumores sólidos (Fig. 1). En esta revisión nos referiremos principalmente a los MTS clonogénicos. Las principales técnicas de cultivo empleadas para generar MTS pueden revisarse en la Tabla 1. El método más ampliamente utilizado, debido a su bajo costo y fácil implementación en el laboratorio, es el de líquido sobrelapante o "liquid overlay", en el que básicamente se cubre la superficie inferior de una caja de Petri con agarosa, se siembra la línea celular tumoral de interés, a una confluencia de 40-60 % y se mantienen durante una semana en incubadora a 37 °C y 5% de CO₂. Luego son transferidos a matraces o tubos de cultivo y se mantienen en agitación orbital constante en incubadora. La principal desventaja de este método de cultivo es el tiempo de formación de la estructura esferoidal ya que, dependiendo de la línea celular, se pueden obtener algunos cientos de esferoides en un periodo de 2 a 5 semanas. Las demás técnicas mencionadas en la Tabla 1 derivan del "liquid overlay" y algunas ocupan materiales más especializados, sin embargo, mantienen la prin-

Técnica	Diámetro (mm)	Días	Método
Líquido sobrelapante "Liquid overlay" (clonogénicos)	1-1.5	20 - 40	Fase 1. Las líneas celulares se siembran en cajas cubiertas con agar o agarosa, en una incubadora sin movimiento. Fase 2. Después de 1 semana se trasladan a un matraz con medio fresco y se mantienen en agitación constante (18).
CultiSpherG (clonogénicos)	1-2	30	Emplea cuentas acarreadoras en gelatina macroporosa. Las células se aglutinan más fácilmente entre los poros de la membrana microacarreadora y establecen contactos. Favorece la aglutinación de células independientes (19).
Cytodex-3 (clonogénicos)	1-2	20	Las células se siembran junto con las cuentas microacarreadoras en placas cubiertas con 10% de poli (2-hidroxietilmetacrilato) para prevenir la adhesión celular (20)
Polímero de gelación termo-reversible (TGP) (clonogénicos)	1-1.5	28	Consiste en conjugados de polietilenglicol y poli-N-isopropilacrilamida. Las fases transitorias entre solución y gel son manipuladas al cambiar la temperatura. La solución acuosa del polímero permite el crecimiento tridimensional. El cambio de medio y la obtención de los esferoides se realizan disminuyendo la temperatura, permitiendo así la gelación del polímero (21).
Matraz Spinner o Rotación giratoria (agregados)	0.250	2-4	Las células se colocan en matraces Erlenmeyer de plástico o en tubos de cultivo, con medio. Los matraces se colocan en una incubadora giratoria (22).
Gota colgante (agregados)	0.250	5	Es un método suave para la generación de esferoides, en el cual se forma un esferoide en una gota colgante suspendida de una placa de microtitulación. Los esferoides resultantes son muy homogéneos (23).

cipal desventaja del tiempo de formación del esferoide. Está establecido que los esferoides de una sola línea celular forman tumores sólidos con todas sus características cuando se inyectan en ratones (5).

A nivel estructural se pueden distinguir tres capas de poblaciones celulares en los MTS: un centro apoptótico/necrótico, una capa intermedia de células quiescentes con tendencia a diferenciarse y una capa externa de células en proliferación. El centro necrótico/apoptótico aparece en MTS con diámetro mayor de 500 µm (Fig. 2).

La formación de las diferentes capas desarrolla microambientes con gradientes de oxígeno, nutrientes, concentración de glucosa, lactato, ATP, factores de crecimiento derivados del suero, concentración de productos de desecho y pH (6). La capa central e intermedia del esferoide constituye un microambiente hostil en el cual existe menor cantidad de nutrientes y oxígeno (zonas hipóxicas). En general, las capas de los esferoides de más de 1 mm de diámetro contienen aproximadamente un centro necrótico de 50-70% del total, una capa quiescente de 25-45% y una capa externa proliferante de 5-10%.

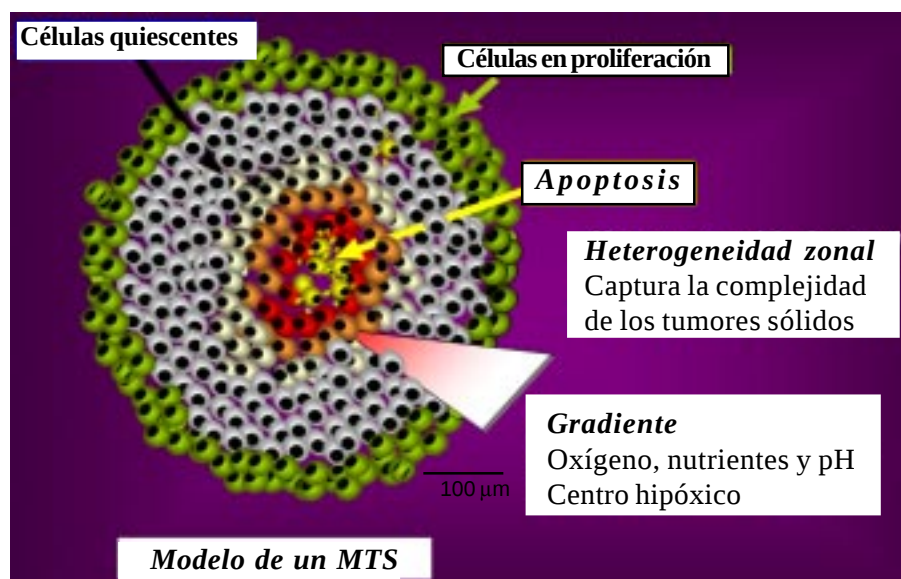


Figura 2. Estructura de un MTS clonogénico de por lo menos 500 μm de diámetro que representa sus tres principales capas: células proliferativas, quiescentes y necróticas.

En los MTS existe un aumento en los niveles de Fas/CD95, de $\text{TNF}\alpha$ (Factor de Necrosis Tumoral) y de $\text{TGF}\beta$ (Factor de Crecimiento Tumoral), factores inducidos por hipoxia. De esta forma se activa la vía de Fas/CD95 en la capa de células hipóxicas contribuyendo así a la formación del centro apoptótico/necrótico. Las células de capas intermedias que sufren hipoxia, pero no a niveles letales, adquieren una mayor resistencia a la radiación y drogas (3).

CRECIMIENTO DEL MTS

Los MTS se caracterizan por una dinámica de crecimiento como la descrita en el modelo de Gompertz (1), la cual se explica a continuación: al inicio de la formación del esferoide se presenta un crecimiento lento, seguido de una fase de crecimiento exponencial y finalmente se presenta nuevamente un crecimiento lento con una fase de meseta en la cual mantienen su tamaño final, aún cuando el suplemento de nutrientes sea el óptimo, debido a que estos nutrientes ya no alcanzan las capas más profundas. Esto va acompañado por el incremento de la población de células necróticas

y la disminución de la población de células proliferativas. La presencia de E-cadherina es fundamental al inicio de la formación del esferoide; sin embargo, la capa externa de células en proliferación de los esferoides deja de expresar E-cadherina (7).

RESISTENCIA MULTICELULAR

En los tumores sólidos, *in vivo*, las células más resistentes a quimioterapia o radioterapia se ubican a una distancia entre 100 y 150 μm de los vasos sanguíneos y áreas necróticas con reducida concentración de oxígeno. Dentro del esferoide, al aumentar el número de células y compartamentalizarse, se incrementa también su resistencia al efecto de diversos fármacos, tal y como sucede *in vivo*. Esto se conoce como resistencia multicelular e incluye a la quimioterapia, radiación, terapia vectorial y mecanismos de defensa y sólo puede ser estudiada en un concepto tridimensional, es decir, en una situación en la que las células están expuestas a concentraciones diferenciales de oxígeno o a otros elementos ya mencionados, a causa de su posición dentro de la masa tumoral y que favorecen la modulación de la

expresión génica. La mayor resistencia a la radiación y a las drogas fue descrita originalmente por Durand y Sutherland y la llamaron efecto de contacto. Posteriormente Desoize y Jardillier (8) dividieron a la resistencia multicelular en dos tipos: resistencia adquirida y resistencia intrínseca o inherente a la estructura del esferoide. En la figura 3 pueden observarse los dos tipos de resistencia. La resistencia adquirida es generada por diversos factores relacionados con la hipoxia y asociados con el crecimiento tridimensional. La segunda, es la resistencia intrínseca que desarrolla el tumor desde su origen.

La mayoría de los fármacos citotóxicos convencionales (cisplatino, estaurosporina, taxol) matan células (tumores y no tumores) que se encuentran proliferando. Debido a la estructura tridimensional del esferoide y del tumor sólido, la concentración final del fármaco, en las capas más profundas o alejadas de los vasos sanguíneos, es tan baja que resulta ineficaz contra las células ya sean quiescentes o no. Además, hay fármacos que deben ser menos eficaces en condiciones hipóxicas, acídicas o de menores concentraciones de nutrientes (9). Finalmente, las células expuestas a estas condiciones modulan su patrón de expresión génica. En los tumores sólidos así como también en los esferoides tumorales, principalmente clonogénicos, se han descrito como posibles responsables del proceso de resistencia la sobreexpresión de glicoproteína P, la cual actúa como bomba de eflujo de drogas desintoxicando a las células cancerosas, la desregulación de proteínas de reparación del DNA, el incremento de Hsp 70 o la desregulación de procesos celulares como la apoptosis, la cual es un paso crítico en la generación y mantenimiento del cáncer y cuyo mecanismo implica la sobreexpresión de Bcl-2 y DR5 (10) y de IAPs (datos de nuestro grupo no publicados).

RESISTENCIA MULTICELULAR

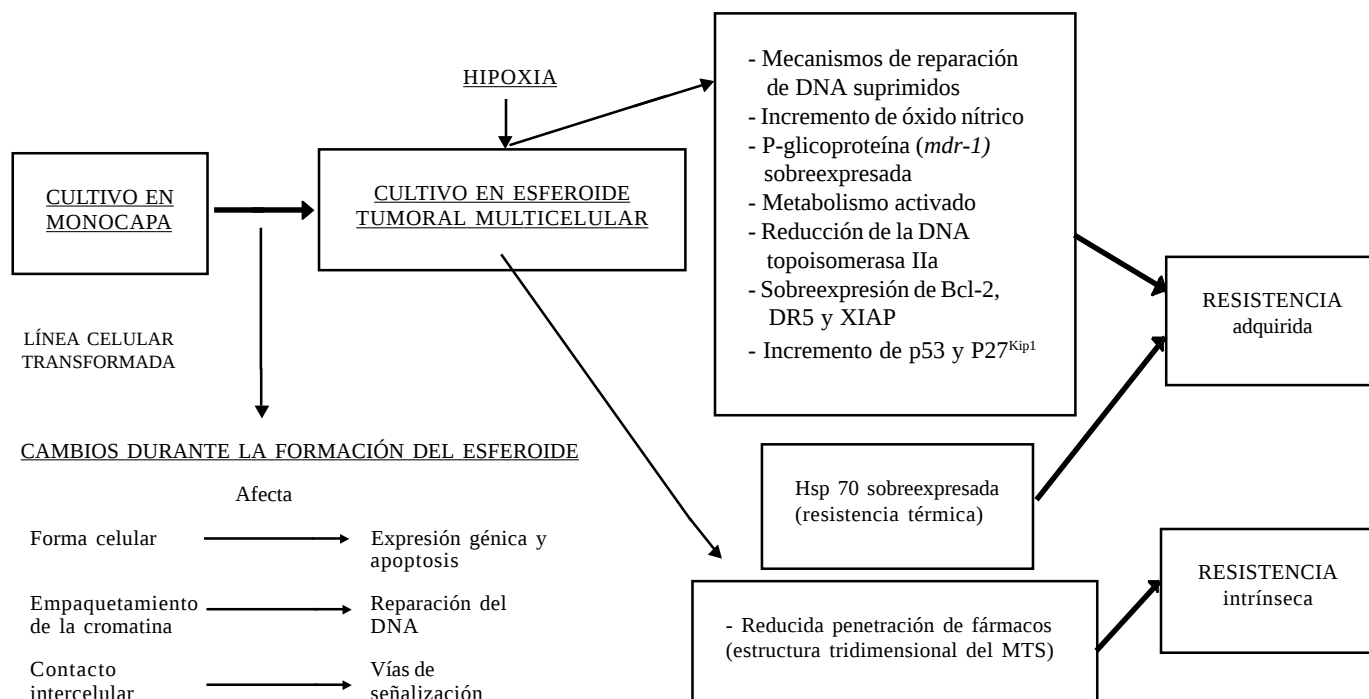


Figura 3. Eventos celulares que originan la resistencia adquirida e intrínseca durante el crecimiento tridimensional en los MTS

Todo lo anterior constituye el principal problema en el diseño de drogas y en su efectividad contra los tumores, de allí la importancia del modelo de esferoides tumorales en la investigación de blancos terapéuticos.

Uno de los principales problemas en la terapia contra el cáncer, es que las drogas o los vectores usados en terapia génica, no pueden ser introducidos fácilmente en toda la población celular dentro de un tumor. La erradicación exitosa de los tumores depende de un fenómeno llamado efecto "bystander", en donde las células tumorales adyacentes son sensibles al efecto citotóxico o terapéutico. Este efecto también es encontrado en los MTS y es factible gracias a la presencia de uniones comunicantes que permiten que la transfección, o la incorporación de un fármaco a tan sólo una minoría de células tumorales, sea capaz de conducir a la regresión tumoral efectiva.

La correcta comprensión de los mecanismos asociados a la resistencia multicelular permitirá diseñar nue-

vos y mejores fármacos que superen la inescrutabilidad en la penetración del tumor sólido *in vivo*. Existe una excelente revisión de Kunz-Schughart (11) que trata sobre el potencial de los MTS para el desarrollo de nuevos fármacos.

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EVALUADAS EN LOS MTS

La proteína transportadora de membrana, glicoproteína P (P-gp), tiene un papel importante en la resistencia farmacocinética al actuar como bomba de eflujo, dependiente de ATP, que exporta drogas al exterior de las células. Se ha observado que en esferoides de cáncer de mama, P-gp se encuentra sobreexpresada, y media el arresto celular en la fase G_0 - G_1 , favoreciendo la resistencia de estas células a taxol. El grupo de Walker y colaboradores (12) observó que la P-gp media la resistencia a doxorubicina en MTS de una línea celular de cáncer de mama. Utilizando un potente inhibidor de P-gp, el XR9576, estos investiga-

dores restauraron la eficacia citotóxica de ese fármaco.

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) juegan un papel importante en la invasión y angiogénesis tumoral al degradar la matriz extracelular y permitir la migración de células tumorales a tejidos circundantes y permitir la migración de células precursoras de endotelio (13). Se ha establecido que la inhibición de MMPs bloquea la angiogénesis en diversos tumores sólidos. Debido a esto, Wartenberg y colaboradores (13) han evaluado antioxidantes usados en la medicina tradicional china, por su capacidad para disminuir la expresión de MMPs, en esferoides tumorales de próstata. Asimismo, en los MTS se están probando y analizando fármacos relevantes para el tratamiento del hepatocarcinoma celular en conjunto con el efecto de radiación. En estos estudios se ha observado que es posible una disminución de la cantidad de radiación cuando se colocan menores cantidades de fármacos. Esto podría

disminuir los efectos colaterales de ambos tipos de tratamientos utilizados por separado.

Uno de los métodos clásicos propuesto para superar la resistencia multicelular, es el uso de la hialuronidasa testicular, una enzima que rompe interacciones adhesivas intercelulares. En este sentido, las nuevas metodologías se están basando en el uso de anticuerpos monoclonales para intervenir con las interacciones célula-célula mediadas por E-cadherina. Este es un nuevo concepto llamado "quimiosensibilización antiadhesiva", en el cual Green y colaboradores (14) encontraron que la inhibición de la adhesión mediada por E-cadherina sensibiliza a los MTS de adenocarcinoma colorectal al tratamiento con 5-fluorouracilo, taxol, vinblastina y etopósido. Sin embargo, la mayoría de los cánceres humanos no presentan E-cadherina en sus etapas invasivas y estos estudios están proyectados a demostrar que en el inicio del cáncer, las adhesiones celulares pueden ser excelentes blancos terapéuticos en la quimioterapia de los microtumores iniciales.

El herpes simple o los adenovirus, han tomado relevancia como vectores para mejorar y aumentar la eficiencia en la expresión de genes transfectados dentro de los MTS, por su mecanismo infeccioso replicativo. El primer estudio de terapia génica con virus validado en los MTS, lo realizó Fujiwara y colaboradores en 1993 (15), observando el efecto de p53 transducido por un retrovirus y su efecto quimiosensibilizador al tratamiento con cisplatino. En MTS de tumor cerebral se han empleado adenovirus de replicación competente que expresan el gen de la luciferasa y se ha encontrado una expresión transgénica en las células de capas profundas del esferoide.

En una estrategia reciente, De Graaf y colaboradores (16) crearon un adenovirus que codifica para la β -glucuronidasa, una proteína de fusión

que activa glucuronida, un profármaco de doxorrubicina y un anticuerpo de adhesión a células epiteliales. La proteína de fusión retuvo ambas funciones y se expresó en MTS de células de cáncer de mama. La administración intratumoral *in vivo* del vector adenoviral favoreció la disminución del crecimiento del tumor sólido favoreciendo la monoterapia con doxorrubicina. Además de los virus competentes a la replicación, se están ensayando virus oncolíticos selectivos al tumor. Esto indica que los virus se replican en células tumorales y no en células normales. La selectividad puede ser adquirida durante el proceso de infección y/o replicación.

Los mecanismos que se basan en el silenciamiento de genes, como el RNA de interferencia (RNAi), comenzarán a ser evaluados y se verá su importancia en el modelo de los MTS. Al respecto, Lakka y colaboradores (5) utilizaron el promotor del citomegalovirus para inducir RNAi (un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional que disminuye la expresión de un gen en particular a nivel de proteína) y bloquear MMP-9 y catepsina B (los cuales participan en el proceso de crecimiento tumoral, vascularización e invasión) en MTS de glioblastoma humano. Sorprendentemente encontraron una reducción en la conducta invasiva de estas células y una ruptura de la formación de redes capilares, tanto en el modelo de los MTS, como en un modelo *in vivo* e incluso en este último, observaron la regresión del tumor preestablecido.

CULTIVOS TRIDIMENSIONALES Y CÉLULAS TRONCALES

En la actualidad se están realizando cultivos tridimensionales de células madres o troncales de tejidos adultos, sanos y tumorales, ya que las células troncales tienen una mayor capacidad para formar esferoides que una célula normal debido a que se mantienen en

constante proliferación. En la actualidad se están desarrollando sistemas tridimensionales de cultivo de células epiteliales mamarias humanas, llamados "mamoesferas" (17). Subsecuentemente estas estructuras, de 40 a 100 células, se diferencian en lóbulos y ductos organotípicos complejos, con lumen, núcleos polarizados, desmosomas y microvellosidades sobre su superficie apical. Adicionalmente, se ha logrado demostrar la presencia de los 3 linajes de células mamarias: células mioepiteliales, células epiteliales ductales y células alveolares productoras de leche. Las células dentro de la mamoesfera son clonales, provenientes de una sola célula troncal pluripotente. Los estudios futuros estarán encaminados a exponer estas células troncales a diversos agentes mutagénicos con el objeto de descubrir las consecuencias de la transformación como un mecanismo para la etiología del cáncer de mama.

PERSPECTIVAS

El uso de MTS ha permitido profundizar en el estudio de la biología tumoral y en la evaluación de diversas estrategias contra el cáncer. Los avances en las investigaciones futuras sobre los temas antes tratados permitirán una mejor comprensión de la biología del cáncer y las alternativas para contrarrestarlo. El estudio de los MTS favorecerá una mejor comprensión de la resistencia a fármacos observada *in vivo* y facilitará el análisis de nuevos blancos terapéuticos previo a su evaluación en modelos animales.

Actualmente, nuestro grupo de investigación realiza el cultivo de MTS de diversas líneas celulares de cáncer humano, como herramienta para estudiar los mecanismos apoptóticos y su relación con las diversas vías de señalización. Lo anterior es de relevancia clínica debido a que permitirá comprender los mecanismos que confieren resistencia a las células cultiva-

das en esferoide. Asimismo, se está implementando el uso de vectores retrovirales con secuencias para generar RNAi contra diversos genes cuyas proteínas participan en la apoptosis. Una vez dentro del MTS, el virus será capaz de interferir con factores antiapoptóticos que pueden sensibilizar al MTS a la muerte por apoptosis, con esto se buscarán posibles blancos terapéuticos.

REFERENCIAS

- Mueller-Klieser W (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* 273:C1109-C1123.
- Folkman J, Moscona A (1978) Role of cell shape in growth control. *Nature* 273:345-349.
- Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R (1998) Multicellular tumour spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Path* 79:1-23.
- Novak JF, Tronka F (2005) Proenzyme therapy of cancer. *Anticancer Res* 25:1157-1177.
- Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Olivero WC, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS (2004) Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis. *Oncogene* 23:4681-4689.
- Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W (2002) Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol Engineering* 18:149-262.
- Kawano K, Kantak SS, Murai M, Yao CC, Kramer RH. (2001) Integrin $\alpha 3 \beta 1$ engagement disrupts intercellular adhesion. *Exp Cell Res* 262:180-196.
- Desoize B, Jardillier JC (2000) Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 36:193-207.
- Minchinton AI, Tannock IF. (2006). Drug penetration in solid tumors. *Nat Rev Cancer* 6:583-592.
- Kim K, Wilson SM, Abayasiriwardana, et al (2005) A novel in vitro model of human mesothelioma for studying tumor biology and apoptotic resistance. *Am J Resp Cell Mol Biol* 33:541-548.
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R (2004) The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9:273-85.
- Walker J, Martin C, Callaghan R (2004) Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy. *Eur J Cancer* 40:594-605.
- Wartenberg M, Budde P, De Marees M, Grunheck F, Tsang SY, Huang Y, Chen ZY, Hescheler J, Sauer H (2003) Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix metalloproteinase expression in confrontation cultures-of embryoid bodies and tumor spheroid by plant ingredients used in traditional chinese medicine. *Lab Invest* 83:87-98.
- Green SK, Francia G, Isidoro C, Kerbel RS (2004) Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro. *Mol Cancer Ther* 3:149-159.
- Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, Cai DW, Owen-Schaub LB, Roth JA. (1993) A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 53:4129-4133.
- De Graaf M, Pinedo HM, Oosterhoff D, van der Meulen-Muileman IH, Gerritsen WR, Haisma HJ, Boven E (2004) Pronounced antitumor efficacy by extracellular activation of a doxorubicin-glucuronide prodrug after adenoviral vector-mediated expression of a human antibody-enzyme fusion protein. *Hum Gene Ther* 15:229-238.
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG (2005) Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with Stem/Progenitor Cell Properties. *Cancer Res* 65:5506-5511.
- Enmon RM, O'Connor KC, Lacks DJ, Schwartz DK, Dotson RS. (2000) Dynamics of spheroid self-assembly in liquid overlay culture of DU 145 human prostate cancer cells. *Biotechnol Bioeng* 72:579-591.
- Rasey JS, Cornwell BJ, Maurer DJ, et al. (1996) Growth and radiation response to cells grown in macroporous gelatin microcarriers (CultiSpher-G). *Br J Cancer Suppl* 27:S78-S81.
- Qiu Q, Ducheyne P, Gao H, Ayaswamy P. (1998) Formation and differentiation of three-dimensional rat marrow stromal cell culture on microcarriers in a rotating-wall vessel. *Tissue Eng* 4:19-34.
- Tsukikawa S, Matsuoka H, Kurahashi Y, et al. (2003) A new method to prepare multicellular spheroids in cancer cell lines using a thermo-reversible gelation polymer. *Artif Organs* 27:598-604.
- Pawlik TM, Souba WW, Sweeney TJ, Bode BP. (2000) Amino acid uptake and regulation in multicellular hepatoma spheroids. *J Surg Res* 9:15-25.
- Timmins E, Dietmar S, Nielsen LK. (2004) Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumor angiogenesis. *Angiogenesis* 7:97-103.