



**Efecto de la hipoxia y la exposición a radiaciones ionizantes sobre la  
captación de glucosa en líneas celulares derivadas de tumores de seno y  
colon**

**Paula Alejandra Moreno Navarro**

**Universidad del Rosario  
Facultad de Ciencias Naturales  
Bogotá, Colombia  
2021**

**Efecto de la hipoxia y la exposición a radiaciones ionizantes sobre la captación de glucosa en líneas celulares derivadas de tumores de seno y colon**

Paula Alejandra Moreno Navarro

Tesis presentada como requisito para obtener el título de:  
**Bióloga**

Director  
**Alejandro Oyono Ondo Méndez Ph.D.**

**Facultad de Ciencias Naturales  
Pregrado en Biología  
Universidad del Rosario  
Bogotá, Colombia  
2021**

# **Efecto de la hipoxia y la exposición a radiaciones ionizantes sobre la captación de glucosa en líneas celulares derivadas de tumores de seno y colon**

Paula Alejandra Moreno<sup>1</sup>, Alejandro Ondo-Méndez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia. <sup>2</sup>Grupo de Investigación Clínica, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

## **RESUMEN**

El cáncer es una patología que se caracteriza por presentar una alta proliferación, heterogeneidad y supervivencia de células anormales. Bajo ambientes como hipoxia e irradiación las células tumorales inducen cambios en la expresión genética y metabólica que les permite adaptarse a las exigencias del microambiente tumoral. Gracias a procedimientos como el PET, podemos utilizar la captación de glucosa como un método para predecir la respuesta de los tumores aprovechando el alto flujo glucolítico de estas células. Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la hipoxia e irradiación sobre la captación de glucosa en líneas tumorales de cáncer de seno y colon usando una sonda análoga de glucosa. Aquí describimos un protocolo que usa la sonda de glucosa fluorescente (2-NBDG) en tres líneas celulares de MCF-7, HT-29 y EA.hy926 bajo distintos tratamientos experimentales, seguido de un mejoramiento de las imágenes de fluorescencia. Nuestros resultados indican una disminución en la captación de glucosa bajo el tratamiento de hipoxia y reoxigenación en las líneas celulares de EA.hy926, MCF-7 y HT29. Mientras que, en el tratamiento con irradiación, se observó un aumento significativo solamente en la línea tumoral HT-29 con respecto al control. Se sugiere que el periodo reoxigenación tuvo un efecto positivo en las células de MCF-7 y EA.hy926, mientras que en la línea tumoral HT-29 no se establece relación y se plantea un posible indicio de radioresistencia.

## **ABSTRACT**

Cancer is a pathology characterized by presenting a high proliferation, heterogeneity, and supervising of abnormal cells. In environments such as hypoxia and irradiation, the tumor cells have changes in the expression of genetics and metabolic that allow them to adapt to the demands of the tumor microenvironment. Through procedures such as PET, we can use glucose uptake as a method to predict the response of tumors, taking advantage of the high glycolytic flow of tumor

cells. This work aimed to evaluate the effect of hypoxia and irradiation on glucose uptake in tumor lines of breast and colon cancer using a glucose analog. Here we describe a protocol that uses the fluorescent glucose analog (2-NBDG) in cell lines of MCF-7, HT-29, and EA.hy926 under different experimental treatments, followed by *processing* the fluorescence images. The results indicate a decrease in uptake glucose in hypoxia and reoxygenation treatment in EA.hy926, MCF-7, and HT-29 cell lines. Whereas, in the irradiation treatment, a significant increase was observed only in the HT-29 tumor line concerning the control. It's suggested that the reoxygenation period had a positive effect on MCF-7 and EA.hy926 cells, while in the HT-29 tumor cells wasn't established any relation and on the contrary, it's an indication of possible radioresistance.

**Palabras clave/Keywords:** Microambiente tumoral/Tumor microenvironment, reoxigenación/reoxygenation, adaptación metabólica/metabolic adaptation, glucolisis/glycolysis.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades más desafiantes de las últimas décadas, que se caracteriza por presentar una alta proliferación, heterogeneidad y supervivencia de células anormales (Nakazawa, M. S., 2016). En el último año esta patología causó aproximadamente 10 millones de muertes alrededor del mundo y entre los tipos de tumores más frecuentes se encuentra el de seno, pulmón y colon con 2.26, 2.21 y 1.93 millones de casos respectivamente. Debido a esto, el cáncer se considera un importante problema de salud pública cada vez más frecuente (OMS, 2021 & OMS 2018).

Se ha demostrado que las alteraciones en el metabolismo de las células tumorales, comúnmente de carbohidratos, proteínas y lípidos, viene acompañada de cambios en su comunicación con el microambiente que definen el inicio, progresión y metástasis de la enfermedad (Quail, D. F., & Joyce, J. A., 2013). Estas interacciones con su entorno influyen asociativamente para promover la diversidad de los tumores y la capacidad autónoma de las células para crecer sin control (Hu, M., & Polyak, K., 2008). Como resultado, las células tumorales se reprograman metabólicamente y suplen el elevado requerimiento energético para sobrevivir y crecer en ambientes adversos (Fadaka, A., 2017).

Estas alteraciones metabólicas generalmente implican una mayor captación de sustratos del medio, como la glucosa, para satisfacer las demandas energéticas (Annibaldi, A., 2010). Una forma de obtener energía a partir de ese sustrato es por medio de la glucólisis, donde el piruvato

resultante, en vez de seguir el Ciclo de Krebs en la mitocondria en forma de Acetil-CoA, se convierte en lactato (Sánchez Pascua, C., 2017).

A simple vista la glucólisis es un medio ineficaz para la producción de ATP en comparación con la respiración mitocondrial. Sin embargo, constituye una de las rutas metabólicas más efectivas para las células tumorales. La principal razón se debe a un fenómeno conocido como efecto Warburg, en el cual, la glucólisis ya sea en presencia o no de oxígeno ocurre de 10 a 100 veces más rápido que la oxidación de la glucosa en las mitocondrias (Liberti, M. V., 2016). Lo anterior, le aporta a la célula tumoral gran cantidad de ATP y además, le proporciona intermediarios para diferentes procesos de síntesis por medio de la degradación (Chen, Z., Lu, W., 2007).

Así, aumentar el consumo energético implica elevar el crecimiento y la proliferación celular sin control. Esto permite que las células tumorales se aparten de los vasos sanguíneos y desarrollen rápidamente zonas deficientes de oxígeno o áreas hipóxicas intratumorales (Semenza, G. L., 2008 & Brahimi-Horn, M. 2007). Este efecto generalmente se acompaña de una gran heterogeneidad en donde células de la matriz extracelular y tumorales cambian y alteran sus metabolismos para adaptarse a las nuevas condiciones, en un entorno conocido como microambiente tumoral (León, J. D., 2019).

En tumores sólidos como los de seno y colon, el grado de hipoxia tumoral es relevante en el resultado final de la terapia. Esto se debe a que las células hipóxicas inducen cambios en el metabolismo y expresión genética que les confiere un fenotipo más agresivo (Tribastone P., 2020). Dependiendo de la oxigenación espacial que les impone el microambiente, estas células tumorales muestran una menor o mayor resistencia a los diferentes tratamientos de quimio y radioterapia (Pires, I. M., 2012).

Además de la hipoxia, existen otros agentes externos como las radiaciones ionizantes usadas en radioterapia (RT) para el tratamiento en cáncer, que también presentan un impacto sobre el microambiente tumoral. Usualmente la energía que producen en presencia de oxígeno se deposita en el agua intracelular y genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) (Leroi, N., 2016). Estas moléculas al interactuar con las células producen efectos indirectos sobre el DNA que afectan múltiples procesos biológicos como la proliferación celular, la apoptosis y la reprogramación metabólica no solo para las células tumorales sino también para todos los componentes celulares del microambiente (Weinberg, F., 2019).

Procedimientos y técnicas de diagnóstico como la tomografía por emisión de positrones (PET), que utiliza análogos de glucosa como la 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose (18FDG), para evaluar el rendimiento metabólico aprovechando el elevado metabolismo glucolítico de las células cancerosas (Kubota, K. 2001 & García M., 2002), nos permite detectar las lesiones tumorales y por ende, la respuesta de las células ante diversos tratamientos. A partir de esta información, podemos establecer que tan quimio o radiosensibles son los tumores y ajustar el tratamiento con el fin de reducir efectos secundarios, costos innecesarios y aumentar la efectividad (Weber, W. A. 2005).

Debido a lo anterior y al impacto de la reprogramación metabólica ocasionada por el microambiente tumoral en la efectividad a los diversos tratamientos contra el cáncer y a la buena predicción de técnicas como el PET para estimar la respuesta del tumor, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la hipoxia y las radiaciones ionizantes sobre la captación de glucosa en líneas derivadas de tumores de seno y colon mediante el uso de la sonda análoga de glucosa (2-NBDG).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Las imágenes adquiridas en este estudio para evaluar el efecto de las radiaciones ionizantes y los cambios en las concentraciones de oxígeno sobre la captación de glucosa fueron obtenidas a partir de la tesis de postgrado presentada por Agudelo A., 2012. La metodología empleada utiliza dos líneas tumorales cultivadas de forma aislada, MCF-7 de cáncer de mama, HT29 derivado de adenocarcinoma colorrectal y la línea referencia de células endoteliales EA.hy926, que son un tipo de células no cancerosas asociadas al microambiente tumoral.

De acuerdo con Agudelo A., 2012, los cultivos de cada línea celular fueron expuestos a un estado de hipoxia de 24 horas seguido de un periodo de reoxigenación, mientras que, para la irradiación se utilizó un acelerador lineal de partículas con una dosis de 2Gy. Para evaluar el efecto de cada estado sobre la captación de glucosa, se simularon cuatro condiciones experimentales: Hipoxia y reoxigenación, hipoxia y reoxigenación con irradiación, normoxia y normoxia con irradiación. Como extensión de la metodología, se llevó a cabo un procesamiento de las imágenes obtenidas de fluorescencia mediante un flujo de trabajo de tres etapas: pre-procesamiento, detección y medición. A continuación, se describe con detalle la metodología.

## **2.1 Cultivo celular**

Se emplearon tres líneas celulares MCF-7 procedente de cáncer de mama, HT29 derivado de adenocarcinoma colorrectal y EA.hy926 de células endoteliales de cordón umbilical como cultivo control. Cada línea celular se cultivó de forma aislada en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% (Medio de cultivo completo) y ajustado a un pH de 7.2.

## **2.2 Inducción de hipoxia y reoxigenación**

Para inducir el estado de hipoxia las células fueron incubadas por un periodo de 24 horas a una temperatura de 37°C en una cámara de hipoxia aislada (C-Chamber, BioSpherix®) junto a un controlador para la concentración de oxígeno y dióxido de carbono ProOx C-21 (BioSpherix®), previamente calibrados con nitrógeno puro y se inyectó una concentración de gases del 1% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>.

Después del periodo de incubación, las células se expusieron a oxígeno ambiental durante 30 minutos induciendo el estado de reoxigenación celular. Todos los cultivos de cada línea MCF-7, HT-29 y EA.hy926 se implementaron con una confluencia celular aproximada del 50% y se utilizó el estado de normoxia como control positivo.

## **2.3 Irradiación**

Consecutivamente, las células fueron transportadas a 4°C e irradiadas con fotones a una dosis de 2 Gy, en un acelerador lineal de uso clínico Clinac IX Trilogy (Varian®), con una energía de 6 MeV y una tasa de dosis de 500 cGy/UM, en el Centro de Control de Cáncer Ltda.

De esta manera, se simularon los estados de hipoxia e irradiación y se evaluaron los siguientes escenarios experimentales: Hipoxia y reoxigenación, Hipoxia y reoxigenación con irradiación a 2Gy, normoxia y normoxia con irradiación a 2Gy.

## **2.4 Captación celular de 2-NBDG y adquisición de imágenes**

Para los ensayos de captación de glucosa, las líneas celulares se cultivaron en cajas de 24 pozos a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y oxígeno al 21% y posteriormente se incubaron con la sonda análoga de glucosa fluorescente 2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino-2-deoxiglucosa (2-NBDG) a una concentración de 300 mM durante 30 minutos. Después del

periodo de incubación se realizaron lavados con MBSS en cada pozo durante 10 minutos y finalmente se colocaron 0.5 ml de D-MEM completo.

Los ensayos se realizaron por triplicado en cada línea celular y las señales de fluorescencia se obtuvieron usando un microscopio de fluorescencia Zeiss AXIO Observer A1 (Zeiss) equipado con una lámpara de fluorescencia HBO100 VE y con una cámara monocromática adaptada (AXIO camHRm Carl Zeiss Microimaging 6 GMBH) y configurada al programa AxioVision Release 4,8,2 (06-2010) con un objetivo de 40X. Consecutivamente, las imágenes se digitalizaron bajo las mismas condiciones y se almacenaron para su posterior procesamiento.

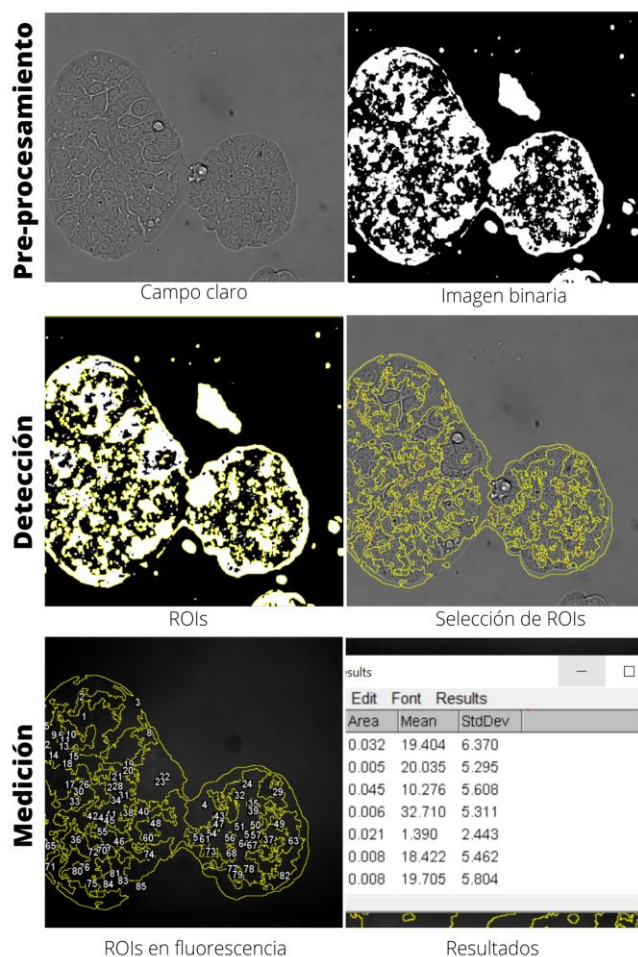
Como extensión de la metodología presentada por Agudelo A., 2012, se llevó a cabo una mejora de las imágenes adquiridas en campo claro que nos permitió obtener una aproximación a la intensidad media de fluorescencia y, por ende, a la captación de glucosa de las células evaluadas en cada condición como se describe a continuación:

## **2.5 Procesamiento de imágenes de fluorescencia**

Para mejorar las imágenes digitales adquiridas en formato TIFF con una profundidad de pixel de 8 bits seguimos un flujo de trabajo de tres etapas: pre-procesamiento, detección y medición de las intensidades de fluorescencia.

En la primera etapa que corresponde al **pre-procesamiento**, se mejoraron las imágenes utilizando un algoritmo que comprende un conjunto de pasos aplicados secuencialmente. Primero, las imágenes se transformaron a una escala de grises para resaltar los bordes y luego, se aplicó un filtro de Canny para detectar un rango de bordes diversos que permitió obtener una mejor definición de las zonas de interés. Este código se escribió en lenguaje Python y se ejecutó en la nube mediante el entorno de “Google Colaboratory”.

El objetivo fue eliminar el ruido o background y acentuar las características de las imágenes de campo claro para lograr clasificar los píxeles y segmentar las formas celulares. Lo anterior, nos permitió obtener una imagen binaria con divisiones aproximadas a las estructuras celulares que se encontraban antes de la incubación con la sonda de glucosa (2-NBDG).



**Figura 1. Flujo de trabajo utilizado para la identificación y medición de las regiones con emisión de fluorescencia en las líneas celulares EA.hy 926, HT29 y MCF-7.** Se siguieron tres etapas: pre-procesamiento, detección y medición de las intensidades mediante el programa Fiji de ImageJ.

En la siguiente etapa de **detección**, se implementó el algoritmo “Analyze Particles” del programa Fiji de ImageJ sobre la imagen binaria con un rango de tamaño mínimo de pixel de 100 con el fin de enumerar los contornos de las células segmentadas. Consecutivamente, se usaron las herramientas de dibujo ROI (Region Of Interest) para etiquetar cada contorno y extrapolar la etiqueta a las imágenes de campo claro. Esto nos permitió comparar y eliminar contornos de partículas no deseadas o regiones detectadas que no pertenecían a células en la imagen binaria.

Finalmente, en la última etapa de **medición**, se guardaron las regiones de interés (ROI) y se superpusieron sobre las imágenes de fluorescencia tomadas después de realizar el ensayo de captación con la sonda (2-NBDG). Para cada imagen, se estimó la media de fluorescencia con su

respectiva desviación estándar de acuerdo con las regiones detectadas como se muestra en la figura 1.

## **2.6 Análisis Estadísticos**

Se analizaron al menos 6 réplicas o imágenes independientes de cada experimento ( $n \geq 6$ ) y se calculó la media  $\pm$  desviación estándar (SD) de las réplicas por condición y tipo de línea celular por medio del programa Fiji de ImageJ. Una vez obtenidos los datos, se utilizó el programa Rstudio y la librería “ggplot2” para graficar el comportamiento de las observaciones y verificar la tendencia de normalidad por medio de la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov seguido de un test de Barlett para comprobar la homocedasticidad de los datos.

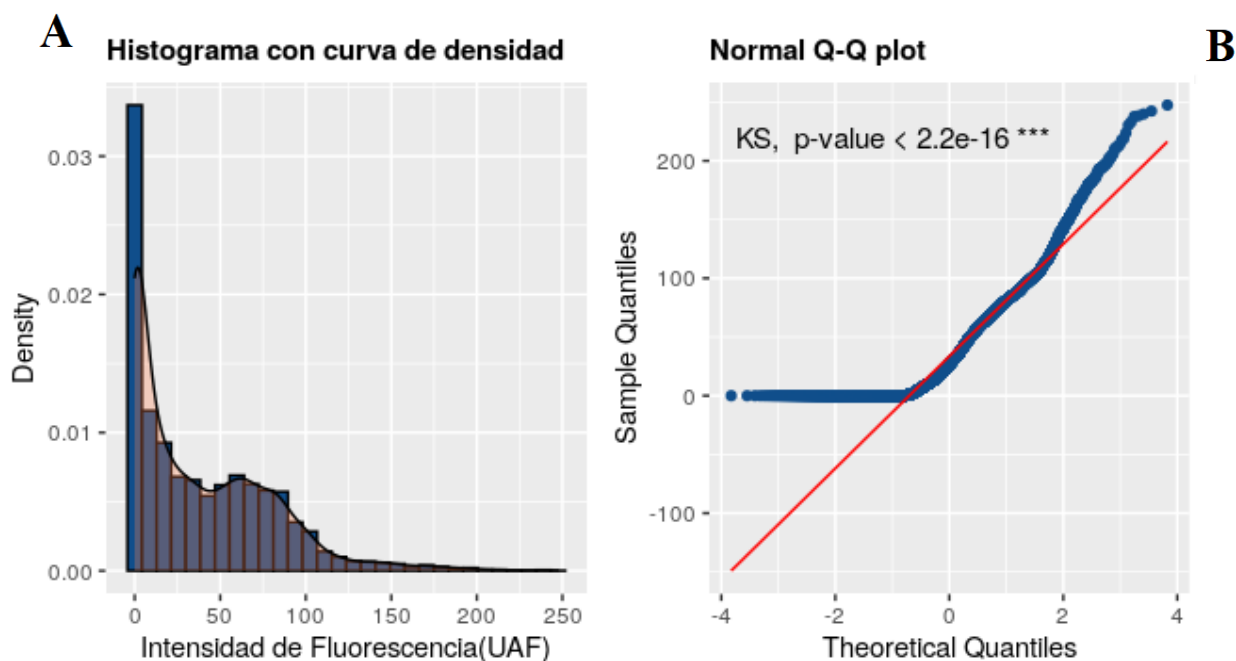
Luego, para conocer si las diferencias observadas entre las intensidades medias de fluorescencia en cada línea celular fueron estadísticamente significativas según las condiciones de estrés se empleó una ANOVA con corrección de Welch con un p-value del 5% (\*). Adicionalmente, se ejecutaron comparaciones múltiples mediante un análisis post hoc con el test Games-Howell, disponible en la librería “rstatix” en Rstudio, para determinar la condición de estrés estadísticamente diferente con respecto al control con un nivel de significancia del 5%. La significancia se define con cuatro asteriscos o más para observaciones estrictamente significativas.

## **3. RESULTADOS**

Con el fin de identificar un posible efecto de las condiciones de estrés celular asociadas al microambiente tumoral sobre la captación de glucosa en células tumorales, se utilizaron tres líneas celulares HT-29, MCF-7 y EAHY cultivadas de forma aislada. Cada línea se agrupó como una población diferente y se establecieron cuatro condiciones experimentales que corresponden a normoxia, hipoxia y reoxigenación, hipoxia y reoxigenación con irradiación a una dosis de 2Gy y normoxia irradiación a una dosis de 2Gy. Se analizaron para las cuatro condiciones en cada línea celular seis (6) réplicas o imágenes independientes y se midió la intensidad media de fluorescencia, que es directamente proporcional a la captación de glucosa, en cada imagen siguiendo el flujo de trabajo de tres etapas: pre-procesamiento, detección y medición como se describe en la sección de métodos.

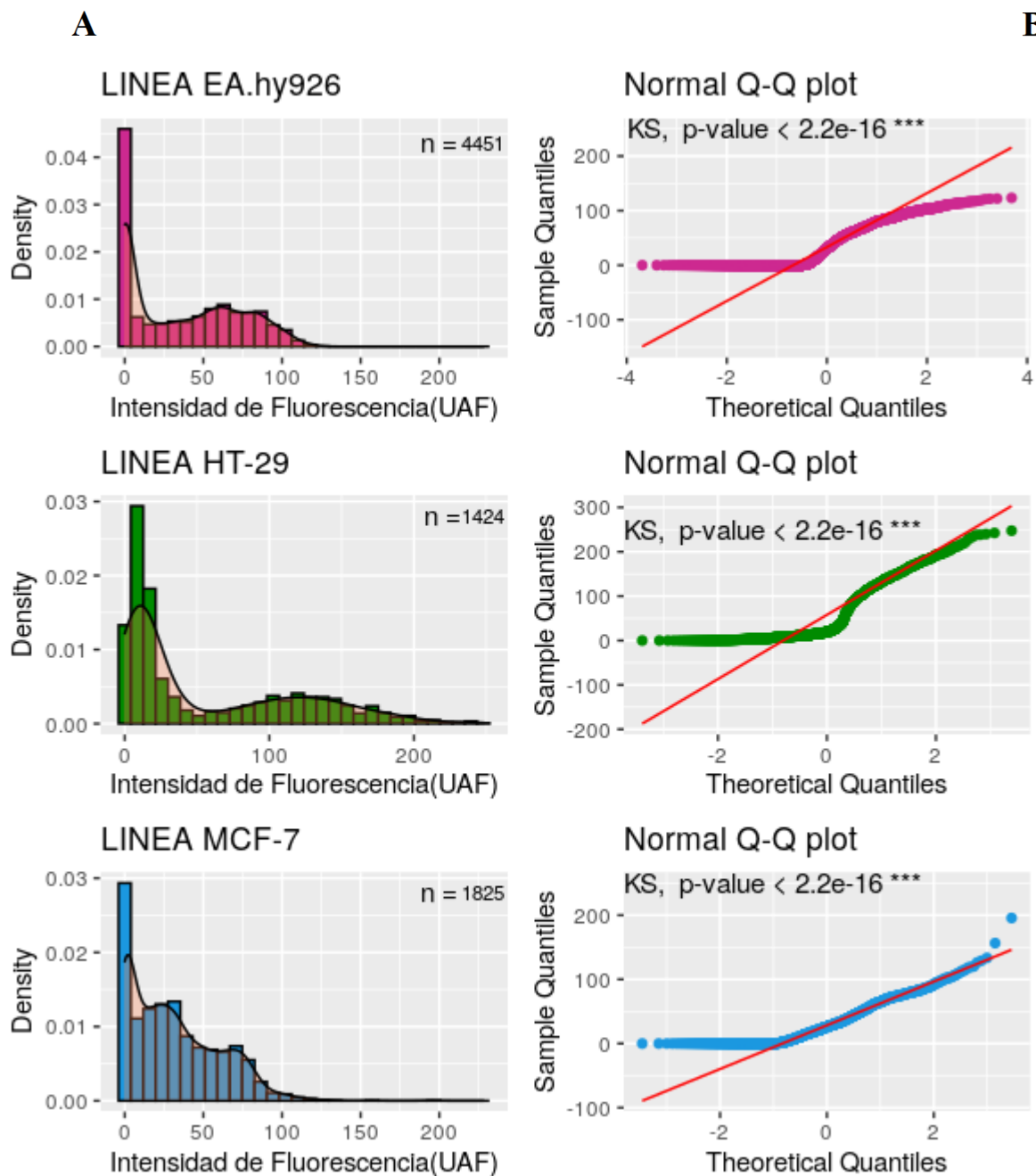
En conjunto, se identificaron 7700 células en las tres líneas bajo las cuatro condiciones de estrés celular y se evaluó la intensidad media de fluorescencia en Unidades Arbitrarias de Fluorescencia

(UAF). Las células detectadas emitieron una intensidad de fluorescencia promedio de  $\bar{x} = 38.734$  UAF (SD=40.698 UAF), el valor mínimo calculado fue cero (0) y el máximo 247.4 UAF. Según las estimaciones, los datos presentan una amplia dispersión con un posible sesgo. De acuerdo con la Fig. 2A, se evidencia una distribución asimétrica con un sesgo positivo hacia la derecha, es decir, que la mayoría de las células detectadas obtuvieron una intensidad de fluorescencia menor a la media y solo unas pocas células emitieron alta fluorescencia.



**Figura 2.** Simetría de los datos y normalidad. **A.** histograma de la variable intensidad con curva de densidad que nos indica una distribución asimétrica con un sesgo positivo en donde la mayoría de las células detectadas obtuvieron una intensidad de fluorescencia menor a  $\bar{x} = 38.734$  UAF. **B.** Plot de normalidad donde se compara la distribución de los datos de Intensidad con respecto a una distribución normal teórica (línea roja), se evidencia que los datos visualmente no siguen el supuesto de normalidad. Adicionalmente, se confirma con una prueba de bondad de ajuste o Kolmogorov Smirnov al 5% con un p-value < 2.2e-16 esta observación.

De acuerdo con la tendencia y a la Fig. 2B, los datos no se ajustaron a la distribución teórica de normalidad. Para confirmar este resultado ejecutamos una prueba de bondad de ajuste o Kolmogorov-Smirnov al 5% y obtuvimos un p-value < 2.2e-16\*\*\*\*, así descartamos el supuesto de normalidad. Consecutivamente, los datos se agruparon en función del estresor y línea celular y se estableció la condición de “normoxia” como grupo control para comparar las condiciones y la línea endotelial EA. hy926 como referencia para las líneas tumorales.



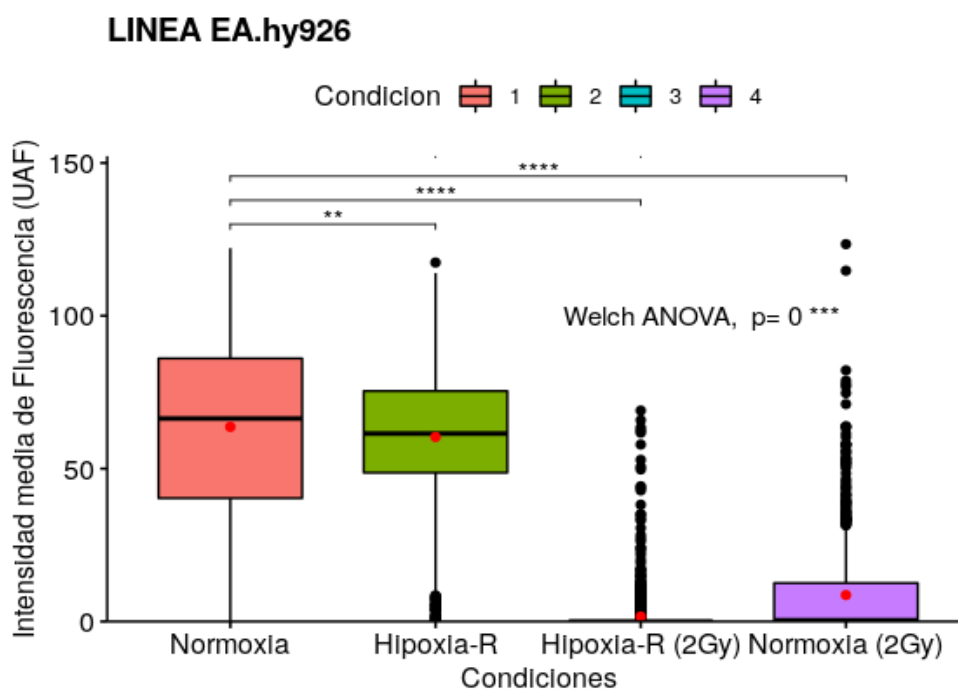
**Figura 3.** Análisis de normalidad por línea celular. **A.** Histogramas con curva de densidad en donde se observa que las distribuciones son asimétricas con un sesgo positivo hacia la derecha en cada línea celular. **B.** Distribuciones de normalidad para cada línea donde se evidencia que ninguno de los grupos sigue una distribución normal teórica (línea roja). Esta observación se confirma por medio de una prueba de bondad de ajuste al 5%, en donde cada línea obtuvo un  $p < 2.2e-16$  \*\*\* eliminando el supuesto de normalidad.

Con el fin de descartar alguna alteración en la distribución de los datos al dividir las observaciones en cada línea celular, EA.hy926, HT-29, MCF-7, se evaluó el supuesto de normalidad en cada población con el test de Kolmogorov-Smirnov al 5%. Para las tres poblaciones, se evidenció una distribución asimétrica con un sesgo positivo hacia la derecha como se describió en el análisis general de los datos. Visualmente ninguno de los grupos se asemeja a la distribución teórica de normalidad, esta observación se confirmó con un p-value  $< 2.2e-16^{***}$  en cada línea celular (Ver Figura 3).

Adicionalmente, se empleó el test de Bartlett para verificar la homocedasticidad de las varianzas. En cada línea celular se confirmó la heterocedasticidad de las varianzas con un  $p < 2.2e-16^{***}$ . Debido a la diferencia en las varianzas, se empleó la prueba de ANOVA con corrección de Welch para varianzas desiguales, a pesar de la asimetría de los datos, seguido de un análisis post hoc mediante el test de Games-Howell para comparar “normoxia” con las demás condiciones y establecer diferencias significativas.

### **3.1 Línea Endotelial EA.hy926**

Para la línea de referencia endotelial EA.hy926, que son un tipo de células no cancerosas asociadas al microambiente tumoral, se identificó un total de  $n = 4451$  (Ver figura 3A) células con una intensidad media de fluorescencia de  $\bar{x} = 36.30$  UAF (SD =35.30 UAF). En este grupo la intensidad mínima detectada fue cero (0) y la máxima 123.45 UAF. De acuerdo con la figura 4, para las distintas condiciones de estrés celular se evidenció que la intensidad de fluorescencia fue significamente diferente (Welch ANOVA,  $p=0^{***}$ ). Al ejecutar la comparación por pares, se demostró que el estado de hipoxia y reoxigenación ( $6.00e-3^{**}$ ), hipoxia y reoxigenación a 2Gy ( $0^{****}$ ) y normoxia a 2Gy ( $6.42e-11^{****}$ ) disminuyeron significativamente la intensidad media de fluorescencia con respecto al control.

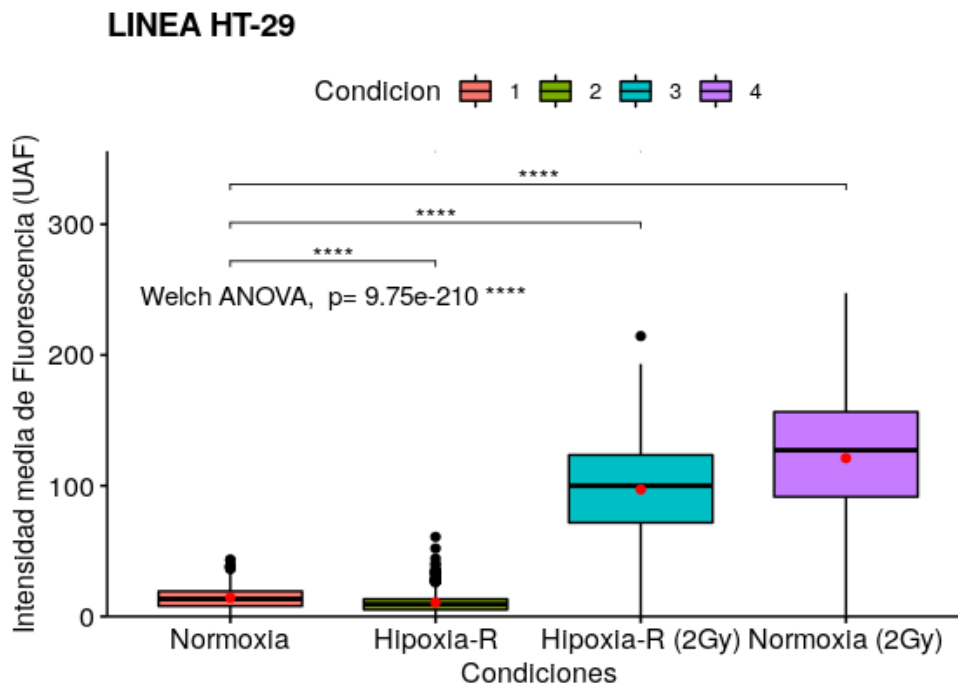


**Figura 4. Variaciones en las intensidades medias de fluorescencia en la línea control EA.hy926 según la condición de estrés celular.** Se establece que existen diferencias estadísticamente significativas en todas las condiciones de estrés con respecto a normoxia (control). Al comparar la diferencia entre medias, el estado de hipoxia-reoxigenación a 2Gy presentó la mayor divergencia (62.1), por esta razón, se considera que al variar las concentraciones de oxígeno e irradiar las células a una dosis de 2Gy simultáneamente se obtiene la menor captación de glucosa que en condiciones normales. La media se representa con un punto rojo en cada condición de estrés.

Al comparar solamente las variaciones en las concentraciones de oxígeno - Hipoxia y reoxigenación - se observa que la diferencia es significativa pero la variación entre medias es mínima (3.31) con respecto al control, mientras que, al comparar únicamente la exposición a radiación ionizante aumenta la diferencia (55.0) entre medias como se deduce visualmente en la Fig. 4. Debido a esto, se sugiere que la irradiación reduce el consumo de glucosa con respecto a las células en estado de hipoxia y reoxigenación en esta línea celular. Esta disminución en la captación de la sonda es mayor si se unifican los estados de estrés como se observa en la condición de hipoxia y reoxigenación a 2Gy, la cual, presenta la mayor diferencia entre medias (62.1) con respecto al control.

### 3.2 Línea Tumoral HT-29

Para la línea tumoral HT-29 se analizaron  $n= 1424$  células (Ver figura 3A) con una intensidad media de fluorescencia de  $\bar{x} = 55.67$  UAF (SD =60.54 UAF), la intensidad máxima fue 247.45 UAF y la mínima de cero (0) UAF. En base al resultado del test Welch ANOVA, se comprobó que existen diferencias significativas en la intensidad media de fluorescencia de acuerdo a cada condición de estrés celular con un  $p\text{-value} = 9.75e-210$  (\*\*\*\*).



**Fig. 5. Variaciones en las intensidades medias de fluorescencia en la línea tumoral HT-29 en según la condición de estrés celular.** Para todas las condiciones de estrés celular las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto al control. Se evidenció un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de las condiciones expuestas a radiación a una dosis de 2Gy, que sugirió que independientemente de las variaciones de oxígeno la captación de glucosa aumentaba bajo el estado de irradiación. Por el contrario, en la condición de hipoxia-reoxigenación se observa una disminución significativa en la captación de glucosa semejante a la línea control. La media se representa con un punto rojo en cada condición.

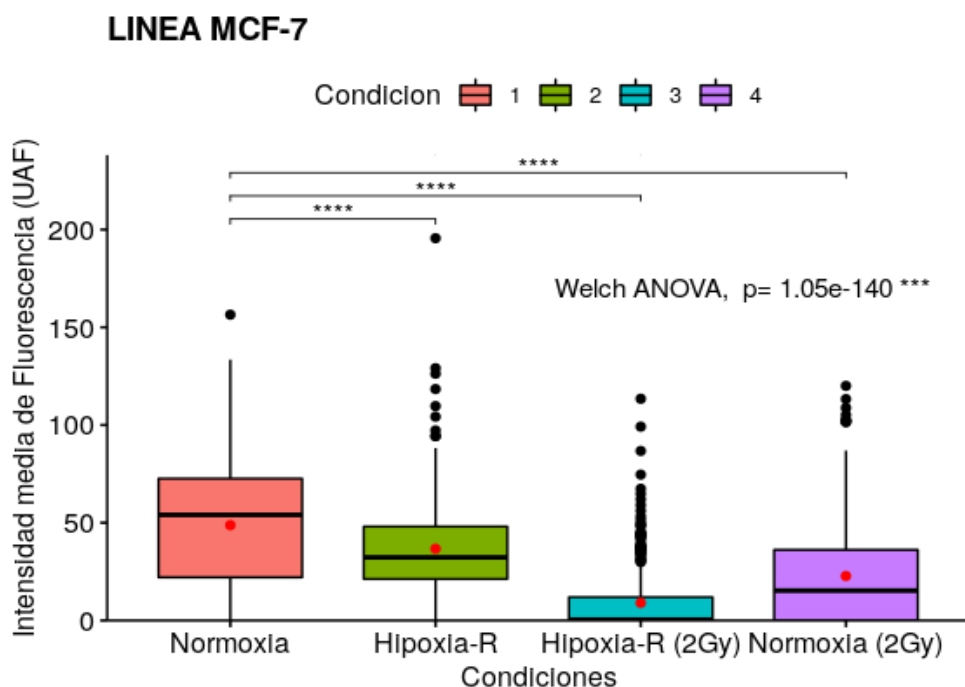
Al ejecutar la comparación por pares de cada estresor con el grupo control, se evidenció un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia en las condiciones de hipoxia y reoxigenación a 2Gy (0 \*\*\*\*) y normoxia a 2Gy (0 \*\*\*\*). Esta tendencia fue inversa con respecto a la línea control EA.hy926, por lo que se observa que independientemente de las variaciones en

las concentraciones de oxígeno en el medio, el estresor de irradiación aumenta significativamente la captación de glucosa en las células tumorales de HT-29 de acuerdo con la figura 5.

Por el contrario, en hipoxia y reoxigenación (  $9.17e-9$  \*\*\*\*) se observó un efecto opuesto con una disminución significativa en la intensidad con respecto a la normoxia. Lo anterior sugiere que el cambio solamente en las concentraciones de oxígeno disminuye el consumo de glucosa. Lo anterior, se asemeja al comportamiento de la línea control bajo la misma condición de estrés.

### 3.3 Línea Tumoral MCF-7

Para la línea tumoral MCF-7 se evaluaron  $n = 1825$  células (Fig. 3A) con una intensidad media de fluorescencia de  $\bar{x} = 31.448$  UAF (SD = 28.25 UAF), la emisión de fluorescencia mínima fue de cero (0) y la máxima de 195.57 UAF. De acuerdo con el test de Welch ANOVA, se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia media entre las condiciones de estrés celular, este resultado se confirmó con  $p$ -value =  $1.05e-140$  (\*\*\*\*).



**Fig. 6. Variaciones en las intensidades medias de fluorescencia en la línea tumoral MCF-7 según la condición de estrés celular.** Todas las comparaciones con respecto al control (normoxia) fueron estadísticamente significativas para las distintas condiciones. El efecto de hipoxia-reoxigenación e irradiación evaluados simultáneamente redujo mejor la intensidad media de fluorescencia con la mayor diferencia entre medias (43.5) con respecto a normoxia. El patrón

de variación en la intensidad media de fluorescencia en esta línea se asemeja a línea control EA.hy926.

Conforme a la comparación por pares, la intensidad media de fluorescencia disminuyó significativamente en las condiciones de hipoxia y reoxigenación ( $1.35e-13^{****}$ ), hipoxia y reoxigenación a 2Gy ( $3.10e-13^{****}$ ) y normoxia a 2Gy ( $0^{****}$ ) con respecto al control. Al contrastar el estresor de hipoxia y reoxigenación e irradiación por separado con el control, se observó que ambas disminuyen la fluorescencia, pero la diferencia entre medias es mayor para irradiación (26.0). Por ende, la captación de glucosa es menor cuando las células tumorales se exponen a radiación ionizante con una dosis de 2Gy (Ver Figura 6).

Este efecto se refuerza al emplear los estados simultáneamente en la condición de hipoxia y reoxigenación a 2Gy, donde se encontró la mayor diferencia entre medias (43.5), en este caso, tanto las variaciones en la concentración de oxígeno como la exposición a radiación ejecutadas al tiempo presentan una mayor disminución en el consumo de glucosa con respecto al control en las células tumorales. De acuerdo con las observaciones, la línea MCF-7 se asemeja al patrón de captación de la línea control EA.hy926.

En conclusión, al evaluar el efecto de hipoxia y reoxigenación sobre la captación de glucosa, en todas las líneas se evidenció una disminución significativa o un efecto negativo. Mientras que, bajo el estresor de irradiación se observó un aumento significativo o efecto positivo solamente en la línea HT-29 en comparación con normoxia. Al unir simultáneamente los estados de estrés celular en la condición de hipoxia y reoxigenación a 2Gy se observó de nuevo un efecto positivo únicamente en la línea HT-29.

De esta manera, se plantea que la línea tumoral MCF-7 mantuvo un patrón similar en el consumo de glucosa a la línea endotelial EA.hy926, y por lo tanto, se sugiere que las dos líneas mantienen un metabolismo glucolítico análogo en comparación con la línea HT-29, en donde se demostró un aumento en el consumo de glucosa bajo el estrés de radiación a una dosis de 2Gy independientemente de las concentraciones de oxígeno en el medio.

### **3.4 Subpoblaciones celulares**

Al evaluar la captación de glucosa se observó que las células emitían una intensidad de fluorescencia muy heterogénea dentro de cada línea celular, incluso esta variación se mantuvo en

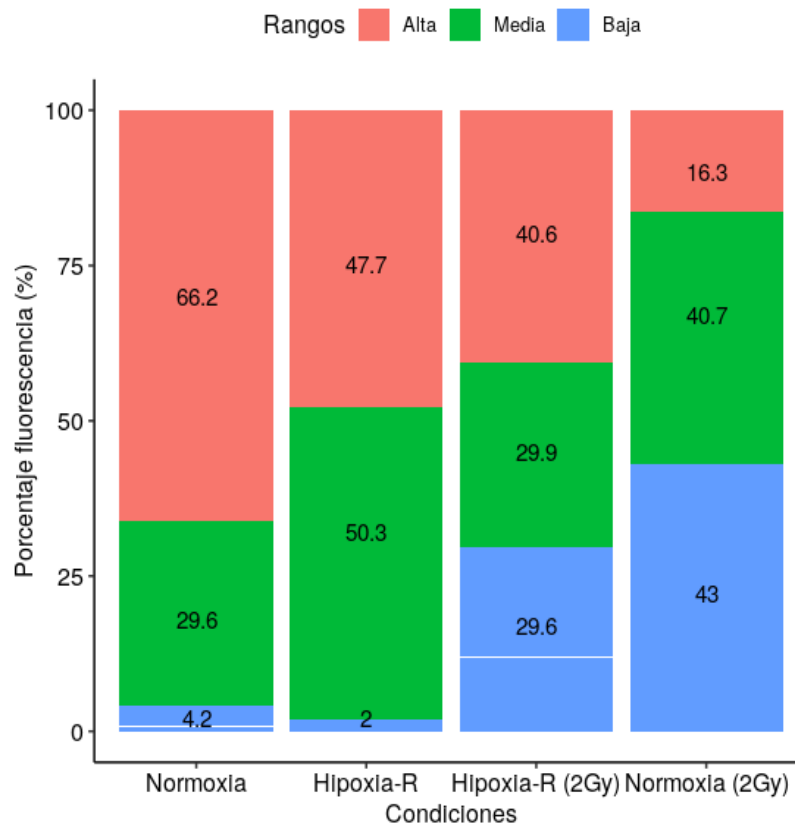
cada imagen o réplica. Por esta razón, se calculó un porcentaje individual de fluorescencia para cada célula detectada en donde el valor máximo de emisión de la imagen se utilizó como el 100% de fluorescencia de acuerdo con la ecuación 1. Las células que obtuvieron un porcentaje entre 0-30% se agruparon como captación baja, de 31-70% como captación media y de 71-100% como captación de glucosa alta, estos rangos se estimaron arbitrariamente y permitieron identificar subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en cada línea celular.

$$\textit{Porcentaje de Fluorescencia Individual} = \frac{\textit{Fluorescencia célula} * 100}{\textit{Fluorescencia máxima del campo}}$$

**Ecuación 1.** Porcentaje individual de fluorescencia, donde el valor máximo de emisión por imagen se usó como el 100% de fluorescencia.

En la figura 7 se presentan los resultados para la línea control endotelial EA.hy926, donde se observa que en condiciones normales predomina la subpoblación con captación de glucosa alta (66.2%). Al someter a las células a variaciones en las concentraciones de oxígeno como se observa en la condición de hipoxia y reoxigenación la subpoblación predominante cambia a captación media con un 50.3%.

Linea EA.hy926



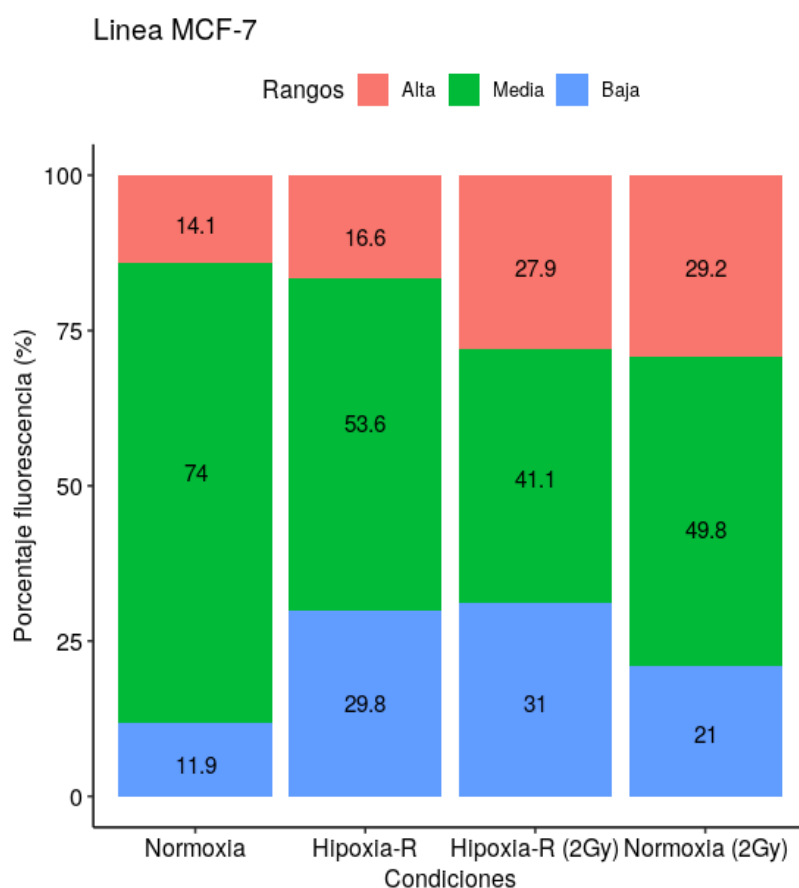
**Figura 7. Subpoblaciones celulares de captación de glucosa según la condición de estrés celular en la línea endotelial EA.hy926.** Se observa que en condiciones de normoxia prevalece la subpoblación celular con captación alta, sin embargo, al someter a las células al estresor de hipoxia e irradiación la subpoblación predominante cambia a media (50.3%) y baja (43%) respectivamente. Mientras que en las células donde los estresores actúan al tiempo predomina la subpoblación alta al igual que normoxia.

Este cambio es coherente con la disminución significativa de la figura 4, en donde debido al estrés en la concentración de oxígeno disminuyó la subpoblación de captación alta y aumentó la de captación media con una diferencia del 2.6% que afectó negativamente la captación global de la sonda en la condición. Igualmente, al evaluar el efecto de las células a radiación ionizante en la condición de normoxia 2Gy, se observó que la población predominante fue la de baja captación con un 43%.

Sin embargo, bajo el efecto de los estresores simultáneamente en la condición de hipoxia y reoxigenación a 2Gy se observa una distribución similar de las subpoblaciones de baja y media captación donde en aproximadamente la mitad de las células prevaleció la captación alta con un

40.6%. A pesar de la predominancia de esta subpoblación, en la figura 4, se evidenció una disminución significativa, por lo que se sugiere que la distribución simétrica de las demás poblaciones tuvo un efecto negativo sobre la captación general de la sonda.

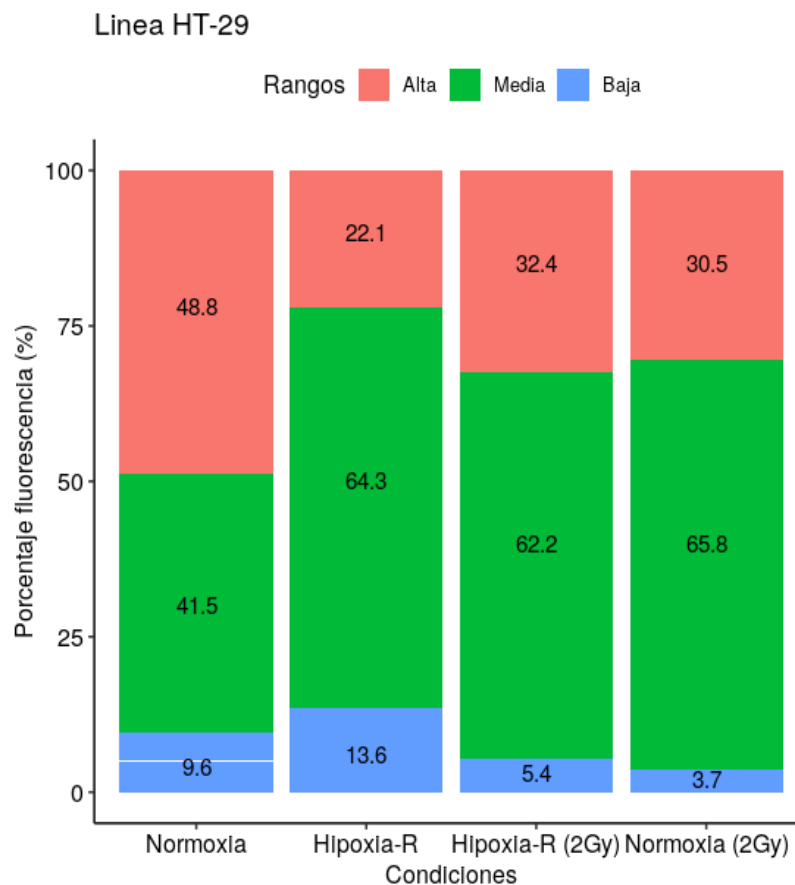
En la figura 8 que corresponde a la línea tumoral MCF-7, se evidenció que la subpoblación con captación media predominó en las distintas condiciones de estrés celular. En condiciones normales, más de la mitad de las células se agruparon en esta subpoblación con un 74%, seguido de hipoxia y reoxigenación con 53.6%, normoxia 2Gy con un 49.8% y finalmente hipoxia y reoxigenación a 2Gy con un 41.1%. Esta disminución en la captación de la sonda en la misma subpoblación con respecto al control puede asemejarse a las diferencias significativas observadas entre medias en la figura 6, donde la exposición simultánea de las células a hipoxia e irradiación tuvo un efecto negativo más pronunciado sobre la captación de la sonda a diferencia de las demás condiciones.



**Figura 8. Subpoblaciones celulares de captación de glucosa según la condición de estrés celular en la línea endotelial MCF-7.** Se observa que en cada condición de estrés predominó la subpoblación de captación media. En normoxia, la mayoría de las células se agruparon en esta

subpoblación con un 74%, seguido de hipoxia y reoxigenación con 53.6%, normoxia 2Gy con un 49.8% y finalmente hipoxia y reoxigenación a 2Gy con un 41.1%

Por otro lado, en la figura 9 se muestran los resultados para la línea HT-29, donde en condiciones normales, aproximadamente la mitad de las células, se agruparon en la subpoblación de captación alta (48.8%), mientras que en las demás condiciones de estrés - normoxia a 2Gy con un 65.8%, seguido de hipoxia y reoxigenación con un 64.3% e hipoxia y reoxigenación a 2Gy con 62.2% - predominó la subpoblación de captación media.



**Figura 9. Subpoblaciones celulares de captación de glucosa según la condición de estrés celular en la línea endotelial HT-29.** Se observa que las células bajo las distintas condiciones de estrés se agruparon en la subpoblación de captación media con un 62.2% para hipoxia y reoxigenación 2Gy, 64.3% para hipoxia y reoxigenación y 65.8% para normoxia a 2Gy con respecto al control que obtuvo en su mayoría una alta captación.

Al observar el patrón de captación sub poblacional en cada condición de estrés, se evidenció que bajo el estado de hipoxia y reoxigenación las células independientemente de la línea celular se

agruparon en la subpoblación de captación media, sin embargo, esto no se demostró en las demás condiciones de estrés. Por lo tanto, la variación en los porcentajes subpoblaciones dentro de cada estrés nos muestra que cada línea celular cuenta con una respuesta diferente en el consumo de glucosa para asimilar las condiciones desafiantes del medio, por ende, se sugiere que las células expresan una adaptación metabólica que varía de acuerdo con la línea tumoral y el tipo de estrés.

#### **4. DISCUSIÓN**

La heterogeneidad celular, la falta de nutrientes y regiones de hipoxia junto con agentes externos como las radiaciones ionizantes establecen distintas interacciones metabólicas de las células tumorales con su medio creando el microambiente tumoral (León, J. D., 2019). Se ha demostrado que variaciones en estos factores de estrés celular inhiben y favorecen la respuesta del tumor frente a potenciales blancos terapéuticos (Brahimi-Horn C., 2007). Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la hipoxia - reoxigenación y la irradiación como factores de estrés celular asociados al microambiente sobre la captación de glucosa (o metabolismo glucolítico) en tres líneas tumorales MCF-7, HT29 y EA.hy926.

Los resultados descritos con anterioridad sugieren que en ambientes con variaciones en las concentraciones de O<sub>2</sub>, es decir bajo los efectos de hipoxia y reoxigenación, las células tumorales de seno MCF 7, colon HT29 y endoteliales EA.hy926 disminuyen significativamente el consumo de glucosa, ver figura 4,5,6 y tabla 1. Este comportamiento puede ser contradictorio para las células tumorales, debido a que, para efectuar sus actividades biosintéticas asociadas a la proliferación deben aumentar la captación de nutrientes como la glucosa (Sánchez, C., 2017).

Regularmente el déficit de oxígeno en la tumorigénesis, a causa de la falta de vasos sanguíneos estimula a la célula tumoral a aumentar el flujo glucolítico para generar ATP y prolongar la supervivencia (DeBerardinis et al., 2008; Weber, 2016). La preferencia de las células por el metabolismo de la glucosa que conduce a la formación de ácido láctico les confiere ciertas ventajas que les permiten, por ejemplo, superar la producción de ATP de la fosforilación oxidativa por medio de un fenómeno conocido como “efecto Warburg” o acidificar el medio extracelular para evadir la respuesta inmunológica con la producción de lactato (Roudier, E., 2009).

**Tabla 1.** Resumen de los efectos significativos de las diferentes condiciones de estrés en las líneas tumorales de HT-29 y MCF-7 y endotelial EA.hy926 con respecto al control.

	EA.hy926	MCF-7	HT-29	
<b>Normoxia (Control)</b>	Hipoxia y reoxigenación	⇓	⇓	⇓
	Hipoxia y reoxigenación e irradiación (2Gy)	⇓⇓	⇓⇓	⇓⇓
	Normoxia e irradiación (2Gy)	⇓	⇓	⇓

\* Las flechas hacia arriba (⇓) indican un aumento significativo en la captación de glucosa y hacia abajo (⇓) una disminución significativa en la captación. En azul se señala el efecto de hipoxia y reoxigenación y en rojo el efecto de irradiación.

Dado que no se observó un consumo de glucosa elevado, se sugiere que en células hipóxicas el periodo de reoxigenación juega un papel importante al disminuir las consecuencias del fenotipo potencialmente agresivo y metastásico (Rajendran, J. G., 2004). La combinación de fases de reoxigenación crea un mecanismo conocido como “Hipoxia cíclica” que contribuye al desarrollo y la alternancia de metabolismos en las células tumorales (Michiels, C., 2016 & Tonissi, F., 2016). Debido a que la alternancia no se expresa de manera uniforme en la población, se crea una heterogeneidad metabólica donde algunas células dentro de un mismo tumor pueden ser predominantemente glucolíticas, mientras que otras, preferir un metabolismo principalmente OXPHOS (Rajendran, J. G., 2004).

Como vemos en las figuras 4, 5 y 6, las células sí captan glucosa pero no en la proporción esperada con respecto al control. Por lo tanto, se sugiere que aparte del metabolismo glucolítico, las células emplean otro metabolismo o rutas metabólicas alternas que no requieren glucosa como sustrato pero que contribuyen a la producción general de energía como por ejemplo, el metabolismo de la glutamina como fuente principal de citrato (Lizcano M., 2019).

Las diferencias en el consumo del sustrato de glucosa nos permitió establecer subpoblaciones de captación en las líneas EA.hy926, MCF-7 y HT29 como se observa en las figuras 7, 8, y 9 respectivamente. Teniendo en cuenta que no se establecieron similitudes entre las diferentes

condiciones de estrés en cada línea, es decir, no hubo un patrón específico en los porcentajes de captación, se plantea que cada línea presenta una adaptación metabólica diferente para el consumo de este sustrato. Claramente, esta adaptación puede alternar varios tipos de metabolismos, sin embargo, la manera en que se alternan depende de las características histológicas del tumor y del microambiente tumoral al que estén expuestos. En este caso, contar con una heterogeneidad metabólica permite que las células tumorales mantengan procesos biológicos importantes como el estado redox, la señalización celular y la biosíntesis entre otros (Cluntun, A. A., 2017).

Además, en un microambiente tumoral también pueden existir relaciones de sinergismo o acoplamiento metabólico entre células normales, generalmente asociadas al estroma y células tumorales. En esta relación aparentemente simbiótica, las células asociadas al tumor suministran nutrientes y fuentes de energía como lactato, glutamina y cuerpos cetónicos necesarios para el metabolismo y la supervivencia tumoral (Costa Ó., 2015). Esta asociación denominada “Efecto de Warburg inverso” (Pavlidis, S., 200), generalmente se asocia con una mayor agresividad tumoral y en ensayos acoplados con células del estroma podrían disminuir la señal de glucosa.

En tumores sólidos como MCF-7 y HT-29 esta reprogramación metabólica suele estar regulada por procesos moleculares conservadores mediante los factores inducibles de hipoxia (HIFs) y autofagia entre otros. En condiciones hipóxicas, los HIFs inducen la transcripción de múltiples genes que le confiere a las células tumorales funciones adaptativas (Xie, H., 2017). Por ejemplo, en el metabolismo glicolítico los HIFs, específicamente la subunidad alfa (HIF1 $\alpha$ ), promueve la expresión de genes en casi todos los pasos de la ruta para moléculas como las hexoquinas (HK1 y HK2) y los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 entre otros. Esto con el fin de garantizar una adecuada y rápida producción de energía. Así mismo, en el metabolismo glutamínico, que utiliza glutamina como fuente de nitrógeno para reacciones biosintéticas y como fuente de carbono en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la activación constitutiva de los HIFs suele modificar la actividad de las vías metabólicas reductoras para apoyar la proliferación y viabilidad tumoral (Xie, H., 2017 & Martinez-Outschoorn, U. E., 2017).

Al agregar el efecto de las radiaciones ionizantes, también se observó una disminución significativa en la captación de glucosa en el estado de hipoxia y reoxigenación con una diferencia entre medias más acentuada con respecto al control. Este resultado solamente se evidenció en las células tumorales de MCF-7 y las endoteliales EA.hy926 (Ver figura 4 y 6). Por el contrario, en

la línea HT-29 el patrón fue inverso con un aumento significativo en el consumo de glucosa (Ver figura 5).

De acuerdo con Pires, I. M., 2012, las células hipóxicas al presentar un fenotipo más agresivo fomentan la progresión metastásica y expresan un elevado flujo glicolítico y alta resistencia a las radiaciones ionizantes. Debido a que el consumo de glucosa disminuyó considerablemente bajo esta condición para las células tumorales de seno y endoteliales, se plantea que el periodo de reoxigenación nuevamente suprimió los potenciales efectos de las células hipóxicas. Algunos estudios plantean que durante la exposición a radiación las células generan estrés oxidativo por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que tras interactuar con el agua intracelular disminuyen la eficiencia en la reparación del DNA después del periodo de reoxigenación (Tonissi, F., 2016).

Aunque esta respuesta es un sello distintivo en muchos tipos de tumores (Sullivan, L.B., 2014) probablemente la combinación de la reoxigenación antes de la irradiación aumentó la radiosensibilidad de las células tumorales de MCF-7 y EA.hy926 generando inestabilidad genética y mutaciones difíciles de reparar. Se sugiere que estas alteraciones en algunas células indujeron apoptosis y senescencia celular disminuyendo el consumo de glucosa global de la población. Debido a lo anterior, aumentar la oxigenación en células cancerosas de seno antes de la radioterapia podría ser una estrategia factible y útil para mejorar los resultados. Pero, se debe tener en cuenta que el resultado final depende de una combinación de interacciones moleculares específicas que varían incluso de un organismo a otro.

Por otro lado y como se describió anteriormente, en la línea tumoral HT-29, independientemente de las concentraciones de oxígeno en el medio, ante la irradiación (Ver figura 5), las células aumentaron significativamente el consumo de glucosa. Este resultado se asocia principalmente a una adaptación ocasionada por una reprogramación metabólica que les permitió a las células adaptarse a las exigencias del microambiente tumoral y también a una alta modulación de las vías de respuesta al daño del DNA (DDR) a alteraciones provocadas por las radiaciones ionizantes (Begg, K., 2020). Evidentemente, implementar la reoxigenación no constituye ningún beneficio significativo para este tipo de células y por el contrario, el resultado puede atribuirse como un indicio de radioresistencia ante la presencia de radiaciones ionizantes en esta línea.

En conclusión, las adaptaciones metabólicas de las células cancerosas al microambiente tumoral frecuentemente constituyen un desafío a la hora de implementar y evaluar cualquier diana terapéutica. A esto se suma, que en tumores sólidos la oxigenación puede variar desde regiones altamente perfundidas hasta áreas gravemente hipóxicas dentro de un mismo tumor, por lo que es importante extrapolar los resultados en pacientes para evaluar su verdadera efectividad.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo cuenta con el apoyo del docente Oscar Julián Perdomo del programa de Ingeniería Biomédica de la escuela de medicina y ciencias de la salud que nos ayudó a implementar el código para la segmentación de las imágenes de fluorescencia.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudelo Ramírez, A. (2012). *Efecto de la hipoxia-reoxigenación y las radiaciones ionizantes en la captación de glucosa en líneas tumorales de seno y colon co cultivadas con células endoteliales* (Doctoral dissertation, Universidad del Rosario).

Annibaldi, A., & Widmann, C. (2010). Glucose metabolism in cancer cells. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 13(4), 466-470.

Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J., & Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine*, 85(12), 1301-1307.

Begg, K., & Tavassoli, M. (2020). Inside the hypoxic tumour: reprogramming of the DDR and radioresistance. *Cell death discovery*, 6(1), 1-15.

Chen, Z., Lu, W., Garcia-Prieto, C., & Huang, P. (2007). The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39(3), 267-274.

Costa, Ó. H. M. (2015). Glicolisis, efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral. *Encuentros en la Biología*, 8(154), 37-40.

Cluntun, A. A., Lukey, M. J., Cerione, R. A., & Locasale, J. W. (2017). Glutamine metabolism in cancer: understanding the heterogeneity. *Trends in cancer*, 3(3), 169-180.

DeBerardinis, R.J. et al. (2008) The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. CellPress, 7(1), 11-20.

De la Salud, O. M. (2019). OMS. *Cáncer*. Disponible en: [Cáncer \(who.int\)](#).

Fadaka, A., Ajiboye, B., Ojo, O., Adewale, O., Olayide, I., & Emuowhochere, R. (2017). Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences*, 3(2), 45-51.

Garcia M., Richter J. A. (2002). Tomografía por emisión de positrones en el estudio del cáncer digestivo. Clinica Universitaria de Navarra. Medicina nuclear. Disponible en: <http://aeeh.es/wp-content/uploads/2012/05/v1n5a58pdf001.pdf>

Gillies, R. J., Robey, I., & Gatenby, R. A. (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(Suppl 2), 24S-42S.

Hu, M., & Polyak, K. (2008). Microenvironmental regulation of cancer development. *Current opinion in genetics & development*, 18(1), 27-34.

Kubota, K. (2001). From tumor biology to clinical PET: a review of positron emission tomography (PET) in oncology. *Annals of nuclear medicine*, 15(6), 471-486.

León, J. D., & Pareja, A. (2019). Inmunología del cáncer II: bases moleculares y celulares de la carcinogénesis. *Horizonte Médico (Lima)*, 19(2), 84-92.

Leroi, N., Lallemand, F., Coucke, P., Noel, A., & Martinive, P. (2016). Impacts of ionizing radiation on the different compartments of the tumor microenvironment. *Frontiers in pharmacology*, 7, 78.

Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218.

Lizcano, M. M. (2019). *Papel del metabolismo de la glutamina en el control de la sensibilidad a TRAIL de células tumorales de mama* (Doctoral dissertation, Universidad de Sevilla).

Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2017). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature reviews Clinical oncology*, *14*(1), 11-31.

Michiels, C., Tellier, C., & Feron, O. (2016). Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1866*(1), 76-86.

Nakazawa, M. S., Keith, B., & Simon, M. C. (2016). Oxygen availability and metabolic adaptations. *Nature Reviews Cancer*, *16*(10), 663-673.

Pavrides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., ... & Lisanti, M. P. (2009). The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell cycle*, *8*(23), 3984-4001.

Pires, I. M., Olcina, M. M., Anbalagan, S., Pollard, J. R., Reaper, P. M., Charlton, P. A., ... & Hammond, E. M. (2012). Targeting radiation-resistant hypoxic tumour cells through ATR inhibition. *British journal of cancer*, *107*(2), 291-299.

Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, *19*(11), 1423-1437.

Rajendran, J. G., Mankoff, D. A., O'Sullivan, F., Peterson, L. M., Schwartz, D. L., Conrad, E. U., ... & Krohn, K. A. (2004). Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F] fluoromisonidazole and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clinical cancer research*, *10*(7), 2245-2252.

Roudier, E., & Perrin, A. (2009). Considering the role of pyruvate in tumor cells during hypoxia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1796*(2), 55-62.

Sánchez Pascua, C. (2017). Reprogramación metabólica de células tumorales y terapias dirigidas contra el fenotipo metabólico de estas células.

Semenza, G. L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of clinical investigation*, *118*(12), 3835-3837.

Stapleton, S., Jaffray, D., & Milosevic, M. (2017). Radiation effects on the tumor microenvironment: Implications for nanomedicine delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 109, 119-130.

Sullivan, L.B., Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* 2, 17 (2014). <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-17>.

Tonissi, F., Lattanzio, L., Astesana, V., Cavicchioli, F., Ghiglia, A., Monteverde, M., ... & Nigro, C. L. (2016). Reoxygenation reverses hypoxia-related radioresistance in head and neck cancer cell lines. *Anticancer research*, 36(5), 2211-2215.

Weber, G. F. (2016) Time and Circumstances: Cancer Cell Metabolism at Various Stages of Disease Progression. *Front Oncol*, 6, 257.

Weber, W. A. (2005). Use of PET for monitoring cancer therapy and for predicting outcome. *Journal of Nuclear Medicine*, 46(6), 983-995.

Weinberg, F., Ramnath, N., & Nagrath, D. (2019). Reactive oxygen species in the tumor microenvironment: an overview. *Cancers*, 11(8), 1191.

Xie, H., & Simon, M. C. (2017). Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 292(41), 16825-16832.

## 7. ANEXOS

El código empleado para la segmentación en el presente estudio puede verificarse en el siguiente link con el output “Binarilized saliency map” y “salient region: [https://drive.google.com/file/d/11rxDPo2A\\_iFIFTfYYKAKfvqa6jrsbv6E/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/11rxDPo2A_iFIFTfYYKAKfvqa6jrsbv6E/view?usp=sharing)