

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Cáncer y sexo.

Influencia de las hormonas sexuales en la implantación y desarrollo tumoral : demostración en un modelo murino de melanoma cutáneo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

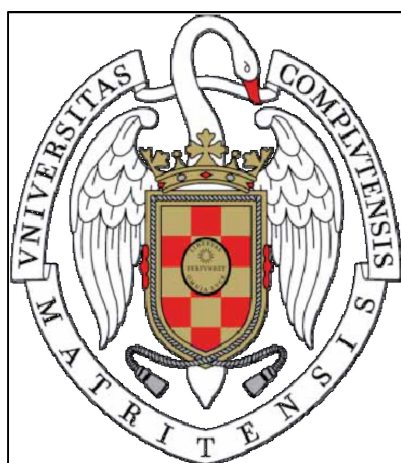
PRESENTADA POR

Enrique Mercader Cidoncha

DIRECTOR

Miguel Relloso Cereceda

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA



CÁNCER Y SEXO.
INFLUENCIA DE LAS HORMONAS SEXUALES EN
LA IMPLANTACIÓN Y DESARROLLO TUMORAL:
DEMOSTRACIÓN EN UN MODELO MURINO DE
MELANOMA CUTÁNEO.

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Enrique Mercader Cidoncha

Director:

Dr. Miguel Relloso Cereceda

Madrid 2020

*A todos aquellos que estuvieron prestando
servicio en primera línea durante la pandemia Covid 19,
especialmente a aquellos que no la superaron.*

A vosotros, los que siempre estáis, ya sabéis quienes sois.

Escribir una tesis doctoral o mejor dicho, llegar a escribir la tesis doctoral es una labor de equipo. De este “pequeño detalle” eres consciente desde el principio pero, su verdadera magnitud queda reflejada al escribir el último capítulo de la misma.....los agradecimientos.

Por dónde empezar....supongo que por el principio...el principio de todo este proyecto debió comenzar en cualquier pie de vía allá por 2013. No sé cómo me dejé “engañar” pero sucedió: doctorando en investigación biomédica. Sobre el papel es muy bonito pero la realidad ha superado cualquier escenario imaginado. Comenzando por el sinfín de cosas nuevas que he tenido que aprender, desde enfocar un microscopio para ver las células (el primer día que lo hice solo tardé más de 25 minutos y todavía no tengo claro si ví las células o las imaginé), pasando por aprender a manejar una campana sin contaminarlo todo, pipetear, cambiar medios, despegar células y entender que es una citometría de flujo, el DAPI, el BrdU, un antimouse-antidonkey y yo que sé cuántas cosas más....jesús!!!!, es más fácil trasplantar un hígado. Si esto ya de por sí era “divertido” añadámosle el hecho de ser clínico y desarrollar una extensa actividad asistencial en un área que me apasiona como es la Cirugía Endocrina. Compaginar ambas cosas era tarea difícil hasta que nació mi primer hijo, Manuel, y después el segundo, Dani.....entonces ya dejó de ser difícil para ser “misión imposible”.....creo que alguna vez, a la hora de dormir, le he contado a Manu el protocolo de citofix-citoperm en lugar del cuento de “la verdadera historia de la bruja piruja”...pero en fin.....nadie imaginaba que, cuando empecé a escribir el manuscrito de la tesis, lo acabaría en el seno de la mayor pandemia que ha sufrido el planeta en las últimas décadas.....que si voy a olvidar esta tesis?????.....creo que la respuesta es obvia. Pero como siempre de todo hay que sacar el lado bueno y yo he sacado un buen “equipo multidisciplinar” y en estos agradecimientos espero que no se me olvide nadie.

Empecemos por el principio, Miguel. Querido amigo, tras haberme engañado para hacer esto te has pasado varios años “lamentándolo”...así es el Karma. Gracias por el entusiasmo, tesón, perseverancia, paciencia, optimismo.....que has depositado en este proyecto durante tooodos estos años, también por entender y aceptar mis complicados horarios. Aunque tú siempre has dicho que ese era nuestro trato, sé que mantenerlo en el día a día no ha sido tarea

sencilla. La labor de director de tesis no está pagada con todo el dinero del mundo, soy consciente de todo el esfuerzo que te ha supuesto y te lo agradezco infinitamente. Por mi parte espero haberte podido enseñar algún que otro “vocablo”, a ver cómo los clínicos analizamos las cosas y espero que algún día te leas ese famoso libro del que tanto hablamos: *Incrédulos al infierno*. Seguro que el futuro nos depara más episodios.

En este “equipo de tesis” han sido piezas fundamentales mi familia quirúrgica.....en realidad ya son familia...José Luis e Iñaki.....qué puedo decirlos a estas alturas.....son tantas y tantas horas las que pasamos juntos que no necesitamos hablar para comunicarnos. Ese despacho en el que debatimos sobre casos clínicos, charlamos, reímos, nos desahogamos, celebramos nuestras victorias....es nuestro refugio frente a “todo lo demás”. José Luis, gracias por haber sido amigo, maestro, guía, padre quirúrgico. Gracias por tu inmensa e infinita generosidad durante todos estos años y sobre todo gracias por haberme dado el teléfono del “call center”. Iñaki, amigo mío.....corría el año 1993 cuando nos hicimos amigos.....nadie imaginaba que 27 años después aquí seguiríamos. No sabría por dónde empezar, gracias por tu apoyo incondicional, por la complicidad, por las risas, por las confianzas, por acompañarme en todas las locuras....por “ser mi contacto con la realidad”, gracias por ser como eres y por lo mucho que me has enseñado, no podría expresarte con palabras lo que eres para mí.

Durante estos años he recibido apoyo de muchos “transeúntes”, digo así porque estuvieron menos tiempo que yo en el laboratorio....entre ellos los Mouser’s originales. Laura con quién muchas horas pase operando ratones hablando de lo divino y de lo humano....mil gracias por haber sido mis manos cuando yo no podía llegar y por enseñarme lo que era una cámara húmeda o un antimouse-antidonkey. Raúl, gracias por tu buen trato, por tu cordialidad por tu buen hacer y ese buen carácter que te llevará lejos. A Carlota, por haber cuidado de “los bichos” y por tus ganas de ayudar en todo lo que podías. Durante estos años los Mouser’s fueron fichando personal a los que también estoy muy agradecido particularmente a Irene. En esta última época, las últimas incorporaciones, María y Carla, han sido dos cracks. Carla, mil gracias por tu buenísima disponibilidad desde el principio, por ser una hormiguita y

AGRADECIMIENTOS

trabajar tan, tan bien....me enorgullece ver lo mucho que has progresado, lo bien que te has adaptado y espero que así siga durante muchos años.

Gracias a Paloma Sánchez-Mateos por brindarse a ser mi tutora y “comerse” todos los Rapi’s estos años, por firmarme tantos papeles y por toda tu colaboración durante este tiempo.

No querría olvidar a ninguna de las personas del Instituto: Ismael, Maribel, Marjorie y algunas personas cuyos nombres no conozco pero que en algún momento me echaron una mano.

Quiero también agradecer profundamente su apoyo a mis compañeros/colegas/amigos del Comité de Melanoma.....son ya muchos años tratando de hacerlo mejor cada día y buscando cómo hacerlo cuando el sistema no nos lo pone fácil. Iván gracias por estar dispuesto a colaborar siempre, por tu buen hacer y por tu confianza (hasta límites insospechados...ja,ja) y José gracias por tu apoyo, comprensión, confianza, generosidad y por ayudarme a crecer. Trabajar con vosotros dos es un honor.

Muchos otros amigos han soportado mis “peripecias” y me han brindado su tiempo y buen humor. Jaime, mi compañero y amigo de las dos ruedas.....hemos recorrido media España en bicicleta y nunca me has dejado atrás. Gracias por ser un ejemplo de buen amigo y colega, por tu buen carácter, por tu generosidad y tu humor negro....más que el mío, eres un tesoro.

Jesús (“toro librán”).....amigo, gracias por hacerme siempre un hueco, por tu inacabable energía que lo contagia todo, por ese buen rollo que emanar, por tus mensajes de voz en el momento más inesperado de la semana. Encontrarte fue un golpe de suerte inimaginable, mil gracias por acompañarme en esto y en muchas otras cosas en la vida, en la paternidad, en el “half”...Ana y tú sois para mí parte de la familia.

Joaquín, en estos años me has brindado oportunidades y abierto puertas que me han permitido disfrutar enormemente de mi profesión, me has ayudado a crecer, pero sobre todo me has dado tu amistad y confianza. Sé que lo mejor está por llegar y espero que lo disfrutemos durante muchísimos años, aunque sea trabajando!!!!!!.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Norber, Basi, Irene, Alberto, Leo y Noelia por su ayuda familiar en estos años, por haberse quedado con los niños tantos ratos para que yo pudiese arañar unas horas al día y hacer un experimento o escribir un rato más, y sobre todo gracias por hacerlo siempre con una sonrisa.

Gracias a Javi, Lorena, Víctor y Esther por tan buenos ratos que hemos pasado, por las risas que nos echamos y lo fácil que es disfrutar de un plan sencillo con vosotros.

Gracias a Sergio, Marian y Oli por esas cenas, piscinas y tantas “gansadas” que hemos hecho para evadirnos un rato.

En último (penúltimo) lugar....pero no por ello menos importante, vosotros los Mercader.....los que me habéis visto crecer. Elena, mi hermana, gracias por tantos consejos, cariño, apoyo...por haber estado ahí cuando lo necesitaba y gracias por seguir haciéndolo....nos quedan muchos años, eres un tesoro.....Vaaaale, tú también Raúl....no creo que pudiese tener mejor cuñaaaaaaaao, ni mejor sobrino, por supuesto!.

Gracias a Pelayo y Toñi, mis padres.....Ser padres no es nada fácil, ahora que yo lo soy lo entiendo perfectamente. No se puede explicar y no hay nada en el mundo que pueda compensar la renuncia que supone a uno mismo para darle a un hijo lo mejor que tienes, y esto lo habéis hecho y lo hacéis con brillantez. Espero poder llegar a ser para mis hijos la mitad de buenos padres y ejemplo que habéis sido vosotros para mí.

Y por último gracias a ti, Elena, tu eres el motor de todo.....la principal “sufridora”.....eres el apoyo incondicional....sin ti, ni esta tesis ni muchísimas otras cosas serían posibles.....decirte gracias es absolutamente insuficiente, pero gracias..... por tu sonrisa, bondad, generosidad, humor, inteligencia, compañía, comprensión, apoyo.....gracias por estar ahí siempre, siempre, siempre. Espero que nuestros dos hijos sean como tú porque entonces serán dos grandes personas.

Seguro que alguien se me queda.....que nadie se sienta ofendido y que me disculpe.

No quisiera acabar sin agradecer formalmente al Fondo de Investigaciones Sanitarias y a la Fundación Mutua Madrileña sus ayudas económicas, sin las

AGRADECIMIENTOS

cuales llevar a cabo esta tesis y los estudios que de ella se derivan, habría sido imposible.

Por último me gustaría tener un reconocimiento a mis compañeros de profesión, los sanitarios. Hemos pasado por un calvario inimaginable en este 2020, espero que no tengamos que volver a pasarlo nunca. Creo que nos hemos comportado con una profesionalidad admirable y hemos sido un ejemplo digno de colectivo bien formado, preparado y humano. Ha sido un orgullo trabajar con muchos de vosotros en situaciones emocionalmente muy complicadas y he sentido profundamente la muerte de algunos.

Madrid Julio 2020.

ÍNDICE

➤ ABREVIATURAS	1
➤ RESUMEN	4
➤ ABSTRACT	7
➤ INTRODUCCIÓN	10
1 CAUSAS DE MORTALIDAD A NIVEL MUNDIAL	11
1.1 Cáncer como causa de mortalidad	11
1.2 Incidencia y frecuencia de los diferentes tipos de cáncer en la población mundial	12
1.3 Factores de riesgo relacionados con el cáncer	13
2 ONCOGÉNESIS	18
2.1 Organización, composición tumoral y progresión local	20
2.1.1 Fibroblastos	21
2.1.2 Adipocitos	21
2.1.3 Matriz extracelular	22
2.1.4 Vascularización sanguínea y linfática.....	22
2.1.5 Células del sistema inmune	23
2.1.6 Mediadores químicos	26
2.2 Enfermedad Metastásica	26
3 IMPACTO DEL SEXO EN LA BIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD Y EN EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER	27
3.1 Posibles hipótesis responsables de la diferencia en pronóstico oncológico entre hombres y mujeres	32
4 MELANOMA CUTÁNEO	38
4.1 Definición	38
4.2. Epidemiología	39
4.3 Factores de riesgo para el desarrollo de melanoma	39
4.4 Tipos de melanoma	40
4.5 Diagnóstico	40
4.6 Tratamiento	41
4.7. Pronóstico	43
➤ JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS	44
JUSTIFICACIÓN	45

HIPÓTESIS.....	46
➤ OBJETIVOS.....	47
➤ MATERIAL Y MÉTODOS	49
1 RATONES.....	50
2 LÍNEAS CELULARES	51
3 ANÁLISIS IN VITRO DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES PARA HORMONAS SEXUALES EN LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES	51
3.1 Procedimientos de detección/evaluación de la expresión	52
3.1.1 Análisis cuantitativo por citometría de flujo.....	52
4 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES EN PRESENCIA DE HORMONAS.....	54
4.1 Contaje por citometría de flujo	54
4.2 Análisis de la incorporación de BrdU	55
5 MODELOS MURINOS DE GENERACIÓN Y SEGUIMIENTO DE TUMORES SIN ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE HORMONAS SEXUALES.....	56
5.1 Modelo natural en ratón adulto	57
5.2 Modelo natural en ratón esterilizado quirúrgicamente	58
5.3 Modelo natural en ratón prepuber	60
6 MODELOS MURINOS DE GENERACIÓN Y SEGUIMIENTO DE TUMORES EN AMBIENTES HORMONALES CONTROLADOS.....	61
6.1 Modelos hormonales controlados	62
6.2 Preparación y administración de hormonas y antagonistas periféricos	65
7 MODELO DE GENERACIÓN DE ENFERMEDAD METASTÁSICA SISTÉMICA	67
7.1 Modelo progresión natural	67
7.2 Modelo intravenoso	69
8 ESTADÍSTICA.....	70
➤ RESULTADOS.....	71
OBJETIVO 1	72
1.1 MODELO NATURAL EN RATÓN NSG ADULTO.....	73
1.2 MODELO ESTERILIZACIÓN QUIRÚRGICA: RATÓN ESTERILIZADO QUIRÚRGICAMENTE ANTES DE ALCANZAR LA MADUREZ SEXUAL/HORMONAL.....	75
1.3 MODELO NATURAL EN RATÓN PREPUBER.....	76
OBJETIVO 2	79

2.1 EXPRESIÓN DE RECEPTORES EN LAS CÉLULAS TUMORALES PARA HORMONAS SEXUALES	81
2.2 IMPACTO DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL CRECIMIENTO CELULAR	82
2.2.1 Contaje por citometría de flujo.....	82
2.2.2 Valoración del crecimiento por incorporación de BdrU por citometría de flujo	83
OBJETIVO 3	85
3.1 MODELO TRATAMIENTO	87
3.2 MODELO PREACONDICIONAMIENTO	88
3.2.1 Modelos sintónicos	89
3.2.2 Modelos inversos.....	95
3.3. MODELO ANTAGONISTA DE RECEPTORES PERIFERICOS HORMONAS SEXUALES (TESTOSTERONA Y PROGESTERONA)	96
OBJETIVO 4	99
4.1 MODELO METÁSTASIS NATURAL	100
4.1.1 Modelo preacondicionamiento	101
4.1.2 Modelo tratamiento	102
4.2 MODELO METÁSTAIS INTRAVENOSO	103
➤ DISCUSIÓN	105
1 LA INVESTIGACIÓN DEL SEXO COMO FACTOR PRONÓSTICO ES ESENCIAL	107
2 HORMONAS SEXUALES	109
3 LA NECESIDAD DE TRABAJAR CON UN BUEN MODELO EXPERIMENTAL	111
4 EFECTOS DE LAS HORMONAS SEXUALES SOBRE LA IMPLANTACIÓN Y DESARROLLO TUMORAL LOCAL.....	112
4.1 Posibles responsables del efecto pro o antitumoral	114
4.2 Posible mecanismos implicados en el efecto pro o antitumoral local de las hormonas sexuales.....	117
4.3 Las hormonas sexuales son condición necesaria pero no suficiente	120
5 EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES SOBRE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA.....	122
6 CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	124
➤ CONCLUSIONES	127
➤ BIBLIOGRAFÍA	129

ACTH	Hormona adenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ANG	Angiogenin
AR	Receptor androgénico
ATLL	Leucemia / linfoma de células T
B RAF	Proto oncogen B-Raf
BrdU	Bromodeoxiuridina
CD40LG	Ligando CD40
CSF1	Factor estimulador de colonias 1
CXCL*	C-X-C motif chemokine ligand *(number)
CXCR*	C-X-C motif chemokine ligand *(number)
CYBB	Cytochrome b-245 beta chain
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
E2	Estradiol
ESR1/ESR2	Receptor de estrógeno 1/2
EUCAN	European cancer
FAC	Fibroblastos asociados a carcinoma
FGF*	Fibroblast growth factor *(number)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLT3	Fms related receptor tyrosine kinase
Fluta	Flutamida
Foxa *	Forkhead box A *(number)
FOXP3	Forkhead box P3
FSH	Hormona foliculo estimulante
GATA1	GATA binding protein 1
GCO	The global cancer observatory
GH	Growth hormone
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GNRH	Hormona liberadora de gonadotropina

GPER/GPER30	Receptor de estrógeno acoplado a proteína G
HTLV-1	Leucemia de células T humanas / virus del linfoma tipo
IFNA1	Interferon alpha 1
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor
IGG	Inmunoglobulina G
IL *	Interleucina (* número)
IL2RG	Interleucina 2, receptor subunidad gamma
IL3RA	Interleucina 3, receptor subunidad alpha
IFNG	Interferon gamma
Inos	Myo-inositol-1-phosphate synthase
IRAK1	Interleucina 1, receptor asociado a kinase 1
LH	Hormona Luteinizante
M	Molar
MALT	Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAT	Macrofagos asociados a tumor
MDSC	Células supresoras de origen mieloide
MEK o MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MHC	Sistema mayor de histocompatibilidad
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
miRNA	Micro RNA
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
NAT	Neutrófilos asociados a tumor
NCI	National cancer institute
NK	Natural Killer
NKG2D	Proteína NKG2D
NLR	Nod-like receptors
NO	Nitric oxide
NR3C3	Receptor estrogénico
NR3C4	Receptor androgénico

OMS	Organización mundial de la salud
PAF	Platelet-activating factor
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFB	Platelet derived growth factor subunit B
PDL1	Programmed Death-ligand 1
PG	Progesterona
PGR	Receptor nuclear de progesterona
PGRMC	Receptor de membrana de progesterona.
PMN-MDSCs	Neutrófilos polimorfonucleares - células supresoras de origen mieloide
PRL	Prolactina
REDECAN	Red española de registros de cáncer
RET	Rearranged during transfection
RLR	RIG-I, retinoic acid-inducible gene-I,-like receptors
RNA	Acido ribonucleico
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SEOM	Sociedad española de oncología médica
SFB	Suero fetal bovino
TGFB1	Transforming growth factor beta 1
TLR*	Toll-like receptor * (number)
TNF	Tumor necrosis factor
TNM	Tumor-Node-Metastases
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TS	Testosterona
UPA	Acetato de Ulipristal
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vh	Vehículo
VIH	Virus inmunodeficiencia humana
VPH	Virus papiloma humano

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo (World Health Organization 2018a) y el impacto económico derivado de los gastos en procedimientos diagnósticos o quirúrgicos y en tratamientos farmacológicos adyuvantes es muy significativo. Adicionalmente, es fundamental una constante inversión en investigación, puesto que constituye la única fuente de nuevos conocimientos que nos ayudan a comprender mejor los mecanismos de progresión y escape tumoral; los factores que condicionan el pronóstico y; sobre todo, nos ayudan a diseñar nuevas estrategias terapéuticas con las que tratar de mejorar la supervivencia. Fruto de las investigaciones clínico-epidemiológicas se ha identificado el sexo como un factor relevante en el pronóstico oncológico.

El sexo es una característica intrínseca a cada paciente, no modificable, y tiene un impacto significativo y reconocido en la fisiopatología de la enfermedad. En lo que se refiere al cáncer, existe un claro dimorfismo sexual oncológico que se traduce en que, independientemente de otros factores particulares que afectan a cada tipo específico de neoplasia, las mujeres tienen mejor pronóstico oncológico que los hombres. Esta ventaja trasciende a la mayoría de los tumores y es independiente de la ubicación geográfica o de la condición socio-económica. Además, es particularmente interesante el hecho de que, en la gran mayoría de los cánceres, la ventaja pronóstica para las mujeres es mucho más acentuada en el subgrupo de edad con menos de 50-55 años y posteriormente tiende a atenuarse, pudiendo incluso desaparecer. Las primeras interpretaciones de esta diferencia pronóstica se centraron en los diferentes comportamientos sociales mostrados frente a la salud por hombres y mujeres, pero los programas de prevención primaria no consiguieron eliminarla. Por tanto, las causas han de residir en factores intrínsecos al sexo que afectan al proceso de génesis y desarrollo tumoral. A pesar de que existen diferentes propuestas en la literatura con objeto de explicar cómo el sexo ejerce su efecto sobre los tumores, las bases de este fenómeno continúan siendo desconocidas en su mayor parte, y es necesario ahondar en ellas para, quizá, poder explotarlas como herramientas terapéuticas. Es esta línea la que se aborda en el presente estudio de investigación.

Nuestro trabajo parte de la hipótesis que las hormonas sexuales juegan un papel determinante en la ventaja oncológica mostrada por las mujeres.

Para estudiar esta premisa, seleccionamos un tumor en el que tenemos amplia experiencia clínica: melanoma cutáneo. Hemos empleado líneas tumorales humanas para desarrollar un modelo de experimentación animal reproducible sobre el que hemos podido estudiar las repercusiones de las hormonas sexuales durante la implantación y el desarrollo local, así como sobre la enfermedad metastásica en diferentes escenarios.

Los datos obtenidos demuestran que existe un vínculo entre las hormonas sexuales y el pronóstico oncológico que no necesariamente ha de ser el resultado directo de una influencia positiva o negativa de estas sobre las células tumorales. De hecho, las células tumorales empleadas en nuestro trabajo presentaron una tasa de crecimiento *in vitro* independiente de niveles hormonales fisiológicos a pesar de presentar receptores para las mismas.

Asimismo, nuestros resultados demuestran que la progesterona muestra un perfil antitumoral que se traduce en un retraso en la implantación y desarrollo local. Esta interferencia condiciona igualmente una menor afectación metastásica sistémica, ya sea porque frena la capacidad de invasión local o porque impide un adecuado precondicionamiento de los nichos premetastásicos. Igualmente, hemos constatado que la testosterona ostenta un perfil protumoral bajo el cual las lesiones crecen más rápido.

Sin embargo, estos mecanismos pro y antitumorales son sexo-específicos, de forma que, ni la progesterona es capaz de revertir la predisposición oncológica de los machos al cáncer ni la testosterona puede favorecer la progresión en las hembras. De esta forma, las hormonas sexuales son un factor necesario, pero no suficiente para que el efecto pro o antitumoral pueda observarse y, consecuentemente, son necesarios otros factores intrínsecos al sexo, probablemente ubicados en la carga genética, para observar el cuadro completo.

Nuestro modelo nos va a permitir profundizar en los mecanismos gracias a los cuales las hormonas sexuales logran estos efectos. Quizá puedan ser consecuencia de la modulación de la interrelación tumor-huésped, conocido como microambiente tumoral, promoviendo microambientes favorecedores o

inhibidores del crecimiento tumoral. Asimismo, podrá facilitar la investigación de los “otros” factores moleculares implicados en el proceso.

Cancer is the second leading cause of death globally (World Health Organization 2018a) and the economic impact resulting from diagnostic or surgical procedures and adjuvant pharmacological treatments is very high. Moreover, constant investment in research is essential, since it constitutes the only source of new knowledge that will help us to better understand tumor progression and escape mechanisms. These factors condition prognosis and, most importantly, they'll help us to design new therapeutic strategies that will contribute to improve survival rates.

Clinical-epidemiological research has shown that sex is a relevant factor in cancer prognosis. Sex is an intrinsic feature of each patient, unmodifiable, with significant and recognized impact on the physiopathology of the disease. In cancer, there is clear oncological sexual dimorphism, which means that, irrespective of other particular factors which affect each specific type of cancer, women have better cancer prognosis than men. This advantage concerns most tumors and is independent of the geographic location or socio-economic status of the patient. Furthermore, it is particularly interesting that, in most cancers, this prognostic advantage for women is higher in the subgroup of women under 50-55 years old, while subsequently it tends to diminish, and may even disappear.

The first interpretations of this prognostic difference focused on different social behaviors towards health by men and women, but primary prevention programs did not succeed in suppressing this advantage. Therefore, the causes must reside in sex's intrinsic factors affecting the genesis and tumor development processes. Despite the existence of different approaches in literature aiming at explaining how sex exerts its effect on tumors, the bases of this phenomenon remain unknown for the most part, and it is necessary to delve deeper in order to exploit such bases for therapeutic purposes. This is the line developed in this research study.

Our work starts with the hypothesis that sex hormones play a determining role in oncological advantage observed in women. To study this premise, we selected a well-known tumor: cutaneous melanoma. We used human tumor cell lines to develop a reproducible animal experimentation model in which we were able to study sex hormones' repercussions on local implantation and development, as well as on metastatic disease in different settings.

Data obtained shows that there is a link between sex hormones and cancer prognosis, which is not necessarily a direct result of the positive or negative effect of the former on tumor cells. In fact, tumor cells used in our work presented an *in vitro* growth rate independent of physiological hormone levels, despite having receptors for them.

Furthermore, our results demonstrate that progesterone shows an anti-tumor profile that results in delayed implantation and local development. This interference also results in less systemic metastatic involvement, either by decreasing local invasion capacity or by preventing adequate preconditioning of pre-metastatic niches. We have also found that testosterone has a pro-tumoral profile under which lesions grow faster.

However, these pro and antitumor mechanisms are sex-specific, so neither progesterone is able to reverse oncological predisposition of males to cancer, nor does testosterone favour progression in females. Thus, sex hormones are a necessary factor, but they do not suffice for the observation of a pro or antitumoral effect and, consequently, other sex's intrinsic factors, maybe genetic, are needed to observe the whole picture.

Our model will allow us to delve into the mechanisms used by sex hormones to achieve these effects. They may result from the modulation of the tumor-host interaction, known as "tumor microenvironment", promoting microenvironments that favour tumor growth or, on the contrary, inhibiting it. Our model may also facilitate the research of "other" molecular factors involved in the process.

INTRODUCCIÓN

1 CAUSAS DE MORTALIDAD A NIVEL MUNDIAL

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares y el cáncer son las causas más frecuentes de muerte en el mundo (World Health Organization 2018a). No obstante, el nivel de ingresos de un país es un fuerte factor condicionante de la distribución de las mismas. Así, en países con bajos niveles de ingresos, 4 de cada 10 muertes se producen en menores de 15 años, siendo las causas más frecuentes las enfermedades transmisibles como infecciones de vías respiratorias bajas, infección por el VIH/sida, enfermedades diarreicas, paludismo y tuberculosis. Por el contrario, los programas de salud pública instaurados en los países con rentas altas, han conseguido reducir el impacto de las enfermedades transmisibles y la mortalidad infantil, logrando que 7 de cada 10 muertes se produzcan en individuos mayores 70 años. A consecuencia de este hecho, las principales causas de muerte han pasado a ser enfermedades crónicas como las cardiovasculares, el cáncer, la demencia, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o la diabetes, quedando sólo las infecciones de las vías respiratorias bajas como la única causa infecciosa relevante de defunción (World Health Organization 2018d)

1.1 Cáncer como causa de mortalidad

Las diferentes agencias de vigilancia epidemiológica, mundiales o regionales, como la OMS mediante su plataforma The Global Cancer Observatory (GCO), los grupos cooperativos europeos como EURO CARE o los españoles como la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), desarrollan programas cuya finalidad es identificar la frecuencia de los diferentes tipos de cáncer y sus patrones epidemiológicos. Su objetivo es poder prevenir o limitar los factores predisponentes o favorecer diagnósticos tempranos, de forma que se consiga reducir su incidencia o atenuar su morbimortalidad.

El impacto económico del cáncer es creciente, su abordaje se desarrolla en varios escenarios:

- **Prevención primaria**: Programas enfocados a concienciar a la población de la importancia de evitar los factores de riesgo y por tanto el desarrollo de la enfermedad.

- **Prevención secundaria:** Estrategias de cribado, enfocadas a lograr un diagnóstico en fases muy tempranas de la enfermedad.
- **Prevención terciaria:** Programas que se desarrollan, ya en plena enfermedad, y que van encaminados a evitar que ésta empeore.

El éxito de estos programas es una realidad palpable, habiéndose logrado en Europa entre 2005 y 2015, una reducción en las tasas de mortalidad normalizadas en relación con el cáncer (EU-28), del 11,5 % en el caso de los hombres y del 6,1 % en el caso de las mujeres (Eurostat 2018).

1.2 Incidencia y frecuencia de los diferentes tipos de cáncer en la población mundial

Según las principales agencias, el cáncer sigue constituyendo una de las principales causas de morbilidad del mundo, con aproximadamente 14 millones de casos nuevos en el mundo en el año 2012 (últimos datos disponibles a nivel mundial estimados por los proyectos EUCAN y GLOBOCAN, de la OMS). Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos probablemente aumente en un 70 % en las próximas décadas, alcanzando los 24 millones de casos, aproximadamente, en el año 2035 (SEOM 2018; World Health Organization 2020b).

La incidencia y distribución de los diferentes tipos de cáncer no es homogénea y está influenciada por varios factores:

- **Regionales:** A nivel mundial en 2018, considerados todos los grupos de edad y ambos sexos, los cánceres más letales fueron los originados en el pulmón (1761007 muertes) y en el colon y recto (880792 muertes), seguidos de los originados en mama, estómago, hígado y próstata. Esta distribución se mantiene similar en Europa, Norteamérica y América Latina. Sin embargo en África los tumores originados en cérvix uterino adquieren una especial relevancia, al igual que lo hacen los gastroesofágicos en la población asiática. (World Health Organization 2018b).
- **Edad:** Presenta influencia en la distribución de frecuencia de mortalidad. Así, la mortalidad global por cáncer colo-rectal a nivel mundial, disminuye

considerablemente por debajo de los 65 años (World Health Organization 2018b).

- **Sexo**: Existe una polaridad oncológica sexo específica que condiciona hechos tan evidentes como que el cáncer de mama tiene mayor incidencia y mortalidad global en la población femenina que en la masculina y, de igual forma el cáncer de próstata no afecta al sexo femenino, por tanto no hay mortalidad relacionada. Pero, excluidos estos órganos/tumores sexo específicos, puede observarse que las tasas de mortalidad son mayores en hombres que en mujeres, acrecentándose esta diferencia por debajo de los 65 años y tendiendo a igualarse por encima de éstos. (SEOM 2018; World Health Organization 2018c)

1.3 Factores de riesgo relacionados con el cáncer

Existen factores de riesgo vinculados claramente al desarrollo de cáncer y a su mortalidad. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se debe a la coexistencia de uno o varios de los cinco principales factores de riesgo conductuales y dietéticos (World Health Organization 2020a; Forouzanfar et al. 2016):

- Índice de masa corporal elevado.
- Ingesta reducida de frutas y verduras.
- Falta de actividad física.
- Consumo de tabaco: El tabaquismo es el principal factor de riesgo y ocasiona aproximadamente el 22% de las muertes por cáncer.
- Consumo de alcohol.

Estos son los factores de riesgo más conocidos por su vinculación genérica con casi todos los tipos de cánceres, pero existen múltiples factores de riesgo específicos de cada tipo de cáncer, algunos de ellos son modificables y otros no lo son:

- **Infecciones**: Ciertos agentes infecciosos, incluidos virus, bacterias y parásitos, pueden causar cáncer o aumentar el riesgo de que se forme. Sus mecanismos son variados e incluyen desde la interrupción de las señalizaciones que normalmente mantiene bajo control el crecimiento y la

proliferación celular, hasta infecciones que debilitan el sistema inmunológico. Algunos virus, bacterias y parásitos pueden causar inflamación crónica que, a la larga es una importante causa de cáncer (National Cancer Institute 2019c).

La mayoría de los virus que están vinculados a un mayor riesgo de cáncer pueden transmitirse de una persona a otra a través de la sangre u otros fluidos corporales. Las vacunas o los comportamientos de higiene sexual disminuyen su contagio.

Entre los agentes más relevantes están:

- Virus de Epstein-Barr: Vinculado a ciertos tipos de linfoma y cánceres de la esfera otorrinolaringológica.
- Virus de la hepatitis B y Virus de la hepatitis C: Cáncer de Hígado.
- Virus de inmunodeficiencia humana (VIH): La infección por VIH no genera en si misma un riesgo para el desarrollo de cáncer pero sí causa una debilidad del sistema inmune que provoca que las personas infectadas con VIH tengan un mayor riesgo de contraer varios tipos de cáncer, especialmente sarcoma de Kaposi, linfomas (que incluyen tanto el linfoma no Hodgkin como la enfermedad de Hodgkin) y los cánceres de cuello uterino, ano, pulmón, hígado y laringe.
- Virus del papiloma humano (VHP): La infección con tipos de VPH de alto riesgo está implicada en casi todos los cánceres cervicales. También causan la mayoría de los cánceres anales y muchos cánceres orofaríngeos, vaginales, vulvares y del pene.
- Leucemia de células T humanas / virus del linfoma tipo 1 (HTLV-1): Puede causar un tipo agresivo de linfoma no Hodgkin llamado leucemia / linfoma de células T en adultos (ATLL)
- Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi.
- Poliomavirus de células de Merkel: Vinculada al carcinoma de células de Merkel.
- Helicobacter pylori: Es un tipo de bacteria implicada en los cánceres gástricos no cardiales y en el linfoma MALT gástrico. También puede causar úlceras gástricas.

- *Opisthorchis viverrini*: Parásito muy frecuente en el sudeste asiático implicado en el desarrollo de colangiocarcinoma
- *Schistosoma hematobium*: Implicado en el desarrollo de carcinoma de vesícula biliar.
- **Factores hereditarios**: Determinadas mutaciones genéticas, presentes en nuestras células germinales y con capacidad para transmitirse de padres a hijos pueden ser causantes de algunos tipos de cáncer. Tales alteraciones codifican proteínas anómalas que escapan a los mecanismos de control del organismo pudiendo generar cánceres en distintos órganos. Se conocen al menos 50 síndromes hereditarios que conllevan el desarrollo de algún tipo de cáncer (National Cancer Institute 2019e).
- **Radiación**: La radiación ionizante es capaz de generar lesiones en el ADN y causar cáncer. La radiación ionizante incluye radón, rayos X, rayos gamma y otras formas de radiación de alta energía. No se ha encontrado que las formas de radiación de baja energía, no ionizantes, como la luz visible y la energía de los teléfonos móviles, causen cáncer en la población (National Cancer Institute 2019d).
- **Edad**: La edad es el factor más importante globalmente considerado. De acuerdo con los datos del programa de vigilancia epidemiológica (Surveillance, Epidemiology and End Results, SEER) del National Cancer Institute (NCI) la edad media de diagnóstico de un cáncer es 66 años (National Cancer Institute 2019b) (Figura 1).

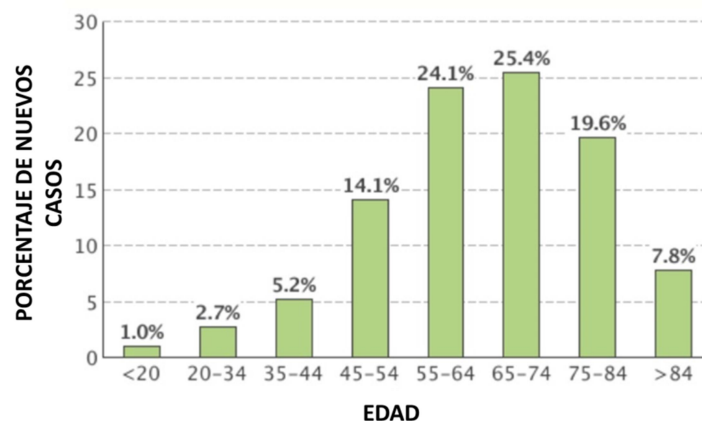


Figura 1: Porcentaje de nuevos casos por grupos de edad, considerando todas las razas, ambos sexos y todos los tipos tumorales (2007-2011)
(Fuente: The National Cancer Institute 2019b)

- Nivel de ingresos económicos: Los países o grupos sociales con menores índices de ingresos pueden ver limitado su acceso a los recursos sanitarios de manera que se reducen las medidas de prevención de desarrollo y diagnóstico precoz del cáncer. El diagnóstico en etapas avanzadas junto con la limitación de acceso reduce las posibilidades de tratamientos de calidad e incrementa la mortalidad. Por otro lado un nivel bajo de ingresos se asocia con mayor frecuencia a perfiles de riesgo, como el consumo de alcohol, tabaco, obesidad etc (National Cancer Institute 2019a).
- Grupo Étnico: Los afroamericanos tienen índices de mortalidad más elevados que la mayor parte de los otros grupos poblacionales para la gran mayoría de tipos de cáncer. Las mujeres afroamericanas tienen más probabilidad que las mujeres caucásicas de morir por cáncer de mama. Los afroamericanos tienen el doble de probabilidad que los caucásicos de morir por cáncer de próstata y casi dos veces la probabilidad de morir por cáncer de estómago. La incidencia de cáncer colorrectal es más alta en los afroamericanos que en los caucásicos (National Cancer Institute 2019a).
- Exposición solar: La exposición a las radiaciones ultravioletas, bien sea de forma aguda en forma de quemadura solar o de forma crónica, es el principal agente implicado en el cáncer cutáneo. Alguno de estos cánceres son de elevada frecuencia y baja mortalidad, como las carcinomas basocelulares, pero otros menos frecuentes pueden presentar altas tasas de mortalidad, como el melanoma cutáneo (National Cancer Institute 2019d).
- Sexo: El sexo es un factor con notable impacto en la incidencia y en la mortalidad por cáncer (World Health Organization 2020b):
 - Considerando la población mundial y su distribución por continentes observamos que tanto la incidencia como la mortalidad es superior en hombres, hecho que se repite en todos los grupos de edad (Figura 2).

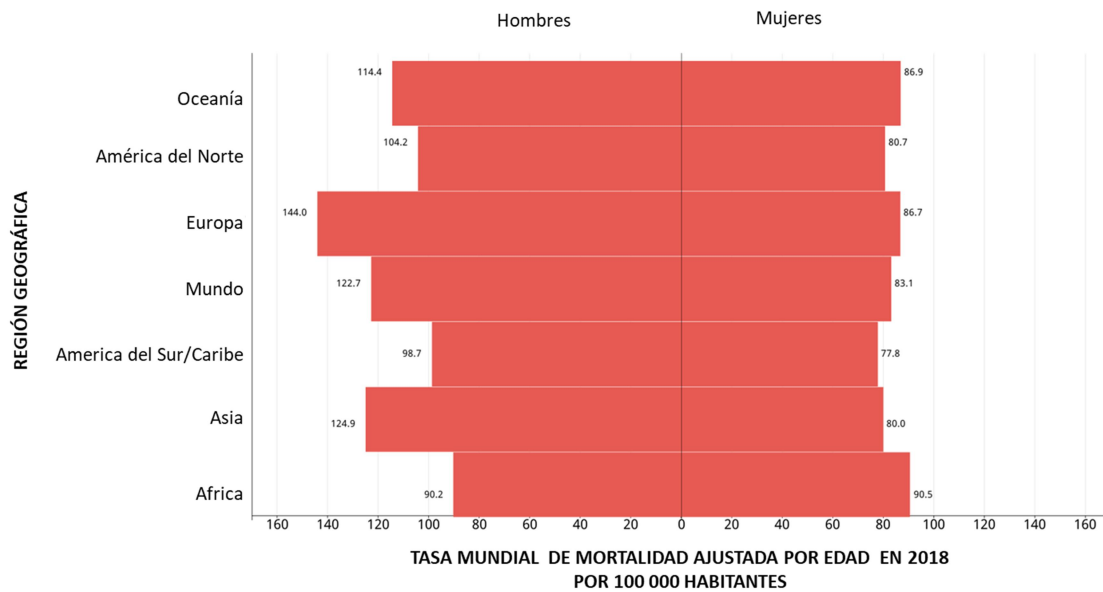


Figura 2: Diferencias por sexo en las de tasa de mortalidad ajustada por edad en el mundo y en las diferentes regiones geográficas en el año 2018.

Fuente: World Health Organization 2020b

- Desglosando incidencias y tasas de mortalidad por tipos de cáncer (datos procedentes del proyecto GLOBOCAN de la OMS, año 2012) llegamos a la misma conclusión, independientemente de la región que estudiemos: la incidencia y mortalidad masculina, supera a la femenina (Figura 3) (Tabla 1).

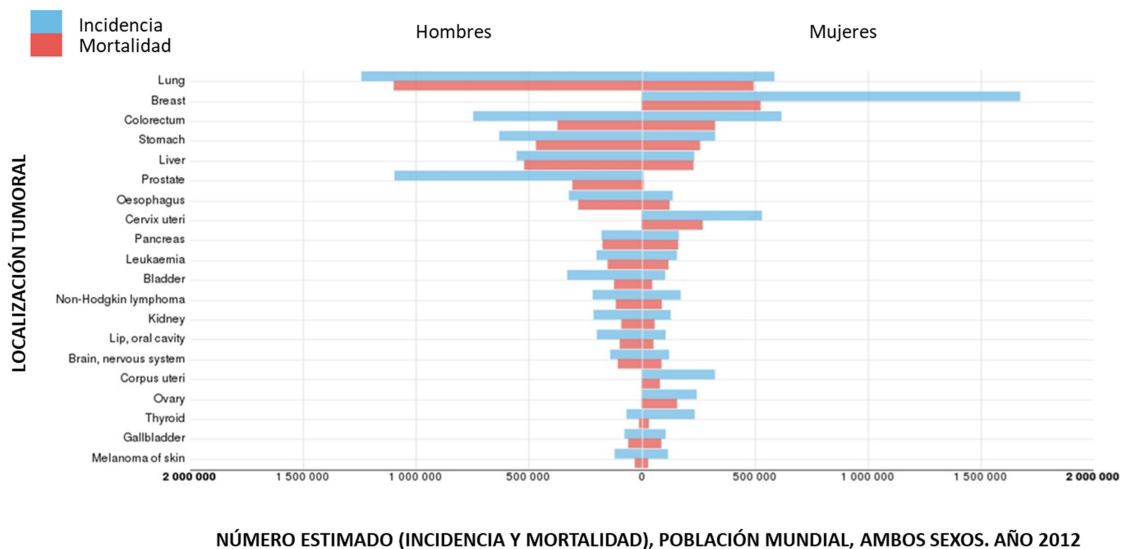


Figura 3: Diferencias por sexo en el número estimado de nuevos casos y mortalidad en el mundo según la localización tumoral en el año 2012 (Datos publicados en 2016).

Fuente: Globocan

LOCALIZACIÓN TUMORAL	Males		Females	
	Incidence	Mortality	Incidence	Mortality
	Lung	1241601	1098702	583100
Breast	0	0	1671149	521907
Colorectum	746298	373639	614304	320294
Stomach	631293	468970	320301	254103
Liver	554369	521041	228082	224492
Prostate	1094916	307481	0	0
Oesophagus	323008	281217	132776	118952
Cervix uteri	0	0	527624	265672
Pancreas	178161	173827	159711	156564
Leukaemia	200676	151321	151289	114150
Bladder	330380	123051	99413	42033
Non-Hodgkin lymphoma	217643	115404	168098	84266
Kidney	213924	90802	123936	52604
Lip, oral cavity	198975	97940	101398	47413
Brain, nervous system	139608	106376	116605	83006
Corpus uteri	0	0	319605	76160
Ovary	0	0	238719	151917
Thyroid	68179	12626	229923	27145
Gallbladder	76844	60339	101257	82484
Melanoma of skin	120649	31390	111481	24098

NÚMERO ESTIMADO (INCIDENCIA Y MORTALIDAD), POBLACIÓN MUNDIAL, AMBOS SEXOS. AÑO 2012

Tabla 1: Diferencias por sexo en el número estimado de nuevos casos y mortalidad en el mundo según la localización tumoral en el año 2012 (Datos publicados en 2016)

Fuente: Globocan

En definitiva, sería deseable progresar en el cáncer de la misma forma que se ha progresado en la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares consiguiendo reducir su morbimortalidad. Sin embargo el nivel de complejidad de los procesos oncológicos desde su implantación y desarrollo hasta las fases más avanzadas, es muy elevado y dependiente de múltiples factores. Por ello es necesaria una profunda investigación para conocer todos sus frentes y poder atajarlos.

2 ONCOGÉNESIS

La oncogénesis es un proceso secuencial y complejo, en el que una célula normal sufre una alteración en su carga genómica que le confiere, o nuevos genes con capacidades protumorales o pérdida de material genético con capacidades supresoras tumorales. A diario se producen miles de mutaciones cromosómicas que generan clones celulares con potencial capacidad para generar tumores. Generalmente estos clones tumorales producen neoantígenos que son capturados por las células dendríticas, las cuales, empleando los sistemas mayores de histocompatibilidad, MHC tipo I y II, presentan estas proteínas a las células T, poniéndose en marcha una

respuesta citotóxica que finaliza con la destrucción de la célula tumoral. La muerte de esta célula libera a su vez nuevos antígenos capaces de iniciar y reforzar el ciclo (Chen and Mellman 2013). Este mecanismo es sólo uno de los implicados en la interrelación ciclo del cáncer/inmunidad cuyo fin es mantener un equilibrio entre el reconocimiento y eliminación de lo ajeno o nocivo y la prevención de los fenómenos autoinmunes.

A principios de siglo se descubrieron y definieron los principios de progresión tumoral que, a día de hoy siguen vigentes. Fruto de la ganancia o pérdida de genes protumorales o supresores, las células tumorales desarrollan capacidades para iniciar ciclos de división de forma espontánea, ilimitada y refractaria a los procesos inhibidores del mismo. Asimismo adquieren mecanismos para evitar la apoptosis y capacidades para la angiogénesis. De esta manera se forman los tumores sólidos. En la misma línea, adquieren capacidades para la invasión local, rompiendo las membranas basales de los órganos, para finalmente alcanzar vasos linfáticos y hemáticos y poder metastatizar (Hanahan and Weinberg 2000).

Las causas de la inestabilidad genómica que origina los clones tumorales son múltiples. Existen las que generan daño al material genético directamente como la radiación o algunos agentes químicos. Otros daños se transmiten de forma hereditaria, como es el caso de oncogen RET vinculado a carcinoma medulas de tiroides, entre otros. Pero además existe una implicación importante por parte del sistema inmune que es conocida desde hace tiempo. Virchow en 1863 ya presumía que el cáncer era el fruto de una inflamación no resuelta (Balkwill and Mantovani 2001) y, a día de hoy, se asume que la inflamación crónica es un evento muy significativo, encontrándose relación con ella en casi un 25% de los tumores (Coussens and Werb 2002). Se postulan muchas causas que podrían desembocar en una inflamación crónica: desbalances en la microbiota, infecciones, fenómenos autoinmunes o alteraciones de la regulación del sistema inmune. Así la infección por el virus del papiloma humano induce una inflamación crónica del cuello del cérvix uterino y es responsable del 90-100% de los cánceres de esta localización (Bosch et al. 2002). Hechos similares se observan con la infección por *Helicobacter pylori* y el riesgo incrementado de cáncer gástrico (Hussain et al. 2000). Asimismo existen otros factores que inducen bajos grados de

inflamación, como la obesidad o el consumo de tabaco, que también son conocidos factores de riesgo para el desarrollo de tumores.

Con el tiempo se ha ido conociendo que, además de la inestabilidad genómica, que origina las células tumorales, se produce un reclutamiento de células no tumorales cuya función es formar un microambiente dinámico y complejo que participe activamente en el desarrollo tumoral y mantenga un ambiente protumoral, incentivando la proliferación, los mecanismos supresores, la angiogénesis, las características invasivas, la inhibición de la muerte celular etc (Hanahan and Weinberg 2011). En la actualidad, es reconocido el papel clave y determinante del microambiente tumoral en la progresión e invasión tumoral y por este motivo se ha producido un cambio drástico en las terapias sistémicas ofertadas a pacientes tumorales. Las estrategias basadas en la potenciación del sistema inmune, inmunoterapia, está proporcionando unos resultados superiores a la quimioterapia convencional, cuyo objetivo primario es la célula tumoral (T. Wu and Dai 2017).

2.1 Organización, composición tumoral y progresión local

Como acabamos de señalar, los tumores sólidos no sólo están compuestos por células tumorales. Su estructura se asemeja a la de un órgano en el que, además de las células encargadas de realizar la función órgano específica (células parenquimatosas), existe un soporte adicional encargado de proporcionar la arquitectura y la nutrición, el estroma.

Desde el momento en el que las células tumorales se implantan, empieza a desarrollarse una interrelación tumor-huésped, que sigue las mismas pautas que la organogénesis fisiológica, y en la que el primero tratará de ir modulando el entorno circundante con el objetivo de generar un estroma que le permita crecer y desarrollarse. El estroma tumoral es extremadamente complejo y en los últimos años ha sido objeto de múltiples investigaciones por sus posibles implicaciones terapéuticas (Puré and Lo 2016; Yin et al. 2019; Shin et al. 2019; Roma-Rodriguez et al. 2019; T. Wu and Dai 2017).

Sus principales componentes son:

- **Células estromales:**
 - Células mesenquimales de soporte: Fibroblastos y Adipocitos.
 - Células endoteliales que formaran los vasos sanguíneos y linfáticos.

- Células del sistema inmune que componen un denso infiltrado inflamatorio.
- Matriz extracelular: Compuesta por proteoglicanos, ácido hialurónico y proteínas fibrosas como el colágeno, la fibronectina y la laminina.
- Compuestos químicos y hormonales como péptidos, factores de crecimiento, citoquinas, anticuerpos y diversos metabolitos que se encuentran dispersos en el estroma y que son la forma de comunicación entre los diversos componentes.

Sus aspectos más relevantes son:

2.1.1 Fibroblastos: Los fibroblastos normales se encargan de la síntesis de la matriz extracelular, de la regulación de la diferenciación epitelial y de la regulación de la inflamación y reparación tisular. Se encarga también de la síntesis del colágeno I, III y V, que dá soporte estructural a los órganos, y del colágeno IV que forma parte de la membrana basal. Asimismo secreta proteasas encargadas de mantener el adecuado recambio de la matriz extracelular.

Los fibroblastos de los tejidos tumorales son fibroblastos activados, también llamados miofibroblastos o fibroblastos asociados a carcinoma (FAC). La mayor parte derivan de fibroblastos residentes activados por factores de crecimiento y citoquinas como TGFB1, FGF2 y PDGFB. También pueden originarse de células madre de la médula ósea o de células epiteliales o endoteliales residentes. Desarrollan un potente efecto modulador del ambiente promoviendo la invasión y progresión tumoral, asociándose a mal pronóstico en tumores de mama, páncreas o pulmón entre otros. Se trata de una población muy heterogénea con una elevada plasticidad que hace compleja su identificación y tipificación (Fearon 2014; Nurmik et al. 2020).

2.1.2 Adipocitos: Son unas de las células estromales predominantes en muchos tumores y una potente fuente de señalización para otras células durante la progresión tumoral. Los adipocitos secretan adiponectina, sustancia endocrina con reconocido efecto proangiogénico. Asimismo estimulan la síntesis de colágeno tipo VI que, además de proporcionar soporte estructural a las células tumorales, es rico en factores de crecimiento, citoquinas y factores de señalización. Está demostrado que, este tipo de colágeno, está implicado en

la progresión tumoral y en algunos aspectos en relación con resistencia a quimioterapia (Di Zazzo et al. 2019).

2.1.3 Matriz extracelular: La matriz extracelular forma el componente no celular de los tejidos, aportando soporte bioquímico y estructural al componente celular. Está compuesta fundamentalmente por agua, minerales, proteoglicanos y proteínas fibrosas secretadas por las células epiteliales residentes. Es un elemento muy dinámico sometido constantemente a procesos de remodelación con el fin de mantener una homeostasis adecuada y que el órgano pueda mantener sus propiedades como elasticidad, textura etc. Los fibroblastos son los principales moduladores de la matriz extracelular, y por tanto, los cambios observados en la matriz de un tumor son consecuencia de la acción de los FAC. En general éstos promueven alteraciones en la estructura y disposición de las fibras de colágeno, cambiando el paralelismo fibrilar fisiológico por una disposición perpendicular a la superficie del órgano que causa incremento de la rigidez del tejido y promueve la invasión celular, al permitir que las células migren a lo largo de los haces de colágeno (Walker, Mojares, and Del Río Hernández 2018).

Asimismo en la matriz extracelular tumoral encontraremos otras macromoléculas y proteínas, como la tenascina C, implicada en la angiogénesis, pero a la que también se le han atribuido funciones protumorales favoreciendo la proliferación, migración y supervivencia de células neoplásicas en determinados tumores como el osteosarcoma o los gliomas (T. Yoshida, Akatsuka, and Imanaka-Yoshida 2015).

2.1.4 Vascularización sanguínea y linfática: El reclutamiento vascular es un paso crítico en el desarrollo tumoral. Los factores proangiogénicos son secretados tanto por células tumorales como por el infiltrado inmune presente en el microambiente tumoral. Dado que la angiogénesis tumoral es aberrante, los vasos sanguíneos generados son irregulares, tortuosos y presentan un exceso de permeabilidad, que condiciona una mayor permeación de fluidos y proteínas. Tales productos son captados por los vasos linfáticos tumorales y retransportados al torrente sanguíneo o a los ganglios linfáticos. De igual manera las células tumorales pueden acceder a los vasos linfáticos para

progresar hasta los ganglios linfáticos generando metástasis (Egeblad, Nakasone, and Werb 2010).

2.1.5 Células del sistema inmune: Las células del sistema inmune están presentes en el microambiente de todos los órganos, estando implicadas en tareas de defensa y remodelación. Desde el momento en que se produce la implantación, las células tumorales interactúan con los componentes del sistema inmune innato y adaptativo tratando de generar un microambiente propicio para su progresión. La interrelación entre ambos es dinámica, de forma que existe una composición cambiante del infiltrado inmune en la medida que el tumor progresa. Además de esta interrelación natural, las alteraciones genéticas que pueden originar un cáncer, también pueden generar reacciones inmunes, por ejemplo, las mutaciones de RET, implicadas en la génesis de muchos cánceres, disparan las reacciones inflamatorias (Mulligan 2014).

Las **células de origen mieloide** constituyentes de la inmunidad innata, como neutrófilos, macrófagos, mastocitos, etc, son una población muy heterogénea implicada, no sólo en la regulación local de la respuesta contra el tumor, sino en la angiogénesis y en la diseminación a distancia.

Los macrófagos son uno de los componentes más importantes del infiltrado tumoral. Se distinguen varios tipos de macrófagos:

- Los clásicos, inflamatorios o M1, tienen actividad citotóxica y parecen tener actividad antitumoral. Acceden al tejido en caso de inflamación debido a citoquinas y quimioquinas secretadas por los macrófagos M2.
- Los M2, antiinflamatorios o alternativos, son residentes en los tejidos, están implicados en labores de remodelado tisular y son centinelas en caso de infección o agresión estéril para iniciar la respuesta inflamatoria (Schiwon et al. 2014).
- Los macrófagos tumorales (MAT), tienen un fenotipo intermedio y sus características no les permiten encuadrarse en M1 o M2. La liberación de citoquinas, factores de crecimiento, enzimas degradadoras de matriz extracelular y factores proangiogénicos, generados por los MAT, favorecen el crecimiento e invasión local, así como la actividad metastásica y proangiogénica. La acumulación de MAT en el tejido tumoral se ha

relacionado con un peor pronóstico. Sin embargo, la biología de los MAT es extremadamente compleja, y está descrita una actividad dual en el entorno tumoral, pudiendo mostrar estrategias pro o antitumorales. A día de hoy, las terapias antitumorales basada en los macrófagos son prometedoras y, entre muchas otras, podrían pasar por evitar el reclutamiento y su supervivencia en los tumores o reprogramarlos hacia una forma M1, que se ha relacionado con una disminución del tamaño tumoral (Mantovani et al. 2018).

Los neutrófilos muestran una elevada plasticidad, pudiendo adaptar sus funciones dependiendo del contexto inflamatorio en que se encuentren. En el microambiente tumoral los neutrófilos pueden desarrollar multitud de funciones y se han empleado diferentes términos y clasificaciones para denominarlos: neutrófilos N1/N2, neutrófilos asociados a tumores (NATs) o neutrófilos polimorfonucleares-células supresoras de origen mieloide (PMN-MDSCs). La identificación de estas poblaciones queda condicionada por su fenotipo funcional dado que no se han encontrado marcadores de superficie específicos que puedan identificarlos. Generalmente se ha descrito a los NATs N1 como una población con actividad antitumoral, promoviendo citotoxicidad directa o indirecta. Por el contrario los NATs N2 estimulan la inmunosupresión, el crecimiento tumoral, la angiogénesis y las metástasis. Las estrategias tumorales actuales frente a neutrófilos se centran en dos frentes: (1) el bloqueo de los NATs actuando sobre el eje CXCL8/CXCR1/CXCR2 o (2) influyendo sobre sustancias producidas por éstos con capacidad para promover el crecimiento tumoral, como las que suprimen la activación de las células T (Giese, Hind, and Huttenlocher 2019; Masucci, Minopoli, and Carriero 2019).

Las células supresoras de origen mieloide (MDSCs) son una población poco definida con propiedades en común con macrófagos (M-MDSCs) y neutrófilos (PMN-MDSCs). Aparecen en escenarios oncológicos así como en situaciones patológicas asociadas a inflamación crónica o estrés. Las MDSCs contribuyen de forma significativa a la progresión tumoral, gracias tanto a su papel inmunosupresor como a su implicación en la angiogénesis, quimiorresistencia y promoción de la capacidad metastásica (Gabrilovich 2017).

Las células dendríticas están altamente especializadas en la presentación de antígenos, de forma que inducen la activación y diferenciación específica de los linfocitos T vírgenes. Son responsables tanto del inicio de la respuesta adaptativa como del mantenimiento de una adecuada inmunotolerancia que permita la homeostasis del organismo. Recientemente se han descrito poblaciones de células dendríticas deficientes en el microambiente tumoral que muestran capacidades mermadas para la presentación de antígenos a las células citotóxicas y presentan, por tanto, capacidad inmunosupresora (Veglia and Gabrilovich 2017; Patente et al. 2019).

El infiltrado tumoral por mastocitos o células cebadas se ha observado en múltiples tumores, particularmente en mama, colon-recto y melanoma. Su papel en el microambiente tumoral no está claro a día de hoy, pudiendo tener una implicación pronóstica favorable o desfavorable en función del sitio anatómico. Los mastocitos se de granulan, cerca de los capilares, liberando gran cantidad de mediadores químicos específicos e inespecíficos que estimulan la proliferación de los fibroblastos o la angiogénesis.

Las **células de origen linfoide**, se distribuyen entre la inmunidad innata (células Natural Killer) y la adquirida (células T y B).

Las células natural killer o NK están implicadas en la inmunidad innata de origen linfoide. Presentan una potente actividad antitumoral citolítica. Su actividad está regulada por una gran cantidad de receptores de superficie, de ellos, el más estudiado es el NKG2D, por su capacidad activadora. Al contrario que otras células del sistema inmune, que requieren un intervalo para activarse e iniciar actividades citotóxicas, las células NK están preparadas, de forma natural, para identificar y matar células tumorales, bien porque éstas hayan perdido de las moléculas del MHC I o bien porque sobreexpresen en su superficie ligandos activadores que superen los estímulos inhibitorios (Morvan and Lanier 2016).

Las células T y B son el principal componente de la inmunidad adquirida. Así como las células del sistema inmune innato presentan una plasticidad elevada, pudiendo mostrar muchas facetas protumorales, los linfocitos T CD8 se encargan de la vigilancia activa, identificando y eliminando clones tumorales.

Las células tumorales necesitan desarrollar estrategias de mimetización o escape para poder sobrevivir, progresar y desarrollarse. Es en este punto donde la terapia antineoplásica más ha progresado en los últimos años, habiendo supuesto una auténtica revolución en algunos tumores, donde la quimioterapia convencional llevaba tiempo atascada, tal es el caso del melanoma. Si bien es cierto que la inmunidad adquirida es principalmente antineoplásica, también se han descrito algunos comportamientos favorecedores. Así las células B originan la inflamación crónica, que es necesaria para el desarrollo de muchos tumores epiteliales. De igual forma se ha descrito que alguna de las citoquinas liberadas por los linfocitos Th2 polarizarían a los macrófagos en un fenotipo M2 (Lee, Al-Shamkhani, and Mirnezami 2019).

2.1.6 Mediadores químicos: Las citoquinas y mediadores químicos en el microambiente tumoral, son generados tanto por las células tumorales como por los diversos elementos que componen el estroma. Son tanto la vía de comunicación que emplean las células tumorales para reclutar elementos celulares y generar un microambiente protumoral como el mecanismo que utiliza el sistema inmune para para frenar su progresión. La lista de compuestos es extensa y cada día aumenta: IL1, IL2, IL3, IL4, IL6, IL7, IL10, IL12, IL13, IL15, IL18, IFNG, CSF1 ,CSF2, TNF- α , MIF, TGF1B, IFNA1, TRAIL, FLT3. Sus funciones pueden ser promotoras o inhibitoras en función del medio o la célula diana y en la actualidad muchas de ellas se emplean como terapia por su capacidad de reprogramar o activar componentes del sistema inmune con capacidad citolítica, como es el caso de la IL2 que estimula la capacidad citolítica de las células NK o el IL12 que promueve la actividad citotóxica dependiente de linfocitos th1 (Dranoff 2004; Waldmann 2018).

2.2 Enfermedad Metastásica

El desarrollo local es una de las facetas de progresión del cáncer, pero la diseminación metastásica y la disfunción orgánica progresiva es la causa más frecuente de muerte. Habitualmente los tumores primarios de una estirpe determinada tienden a generar metástasis en los mismos órganos, fenómeno denominado tropismo. Existen diversas teorías respecto a la formación de

metástasis. La primera fue emitida por Ewing y se basa en el atrapamiento mecánico, de forma que, una vez que las células acceden al torrente sanguíneo, quedan atrapadas en los pequeños capilares de los órganos que encuentran a su paso, generando en éste una metástasis (Ewing 1941). Posteriormente se desarrolló la teoría “seed and soil”, enunciada por Paget, en la que el tumor, en la medida que adquiere capacidades invasivas, realiza suelta de células al torrente sanguíneo. Éstas asientan en aquellos lugares donde son capaces de establecer una interacción (microambiente) favorable (Paget 1889). Finalmente, teorías más actuales, y la evidencia acumulada, sugieren que el desarrollo de capacidades invasivas y metástasis se produciría en etapas muy precoces, pudiendo ser incluso antes de la formación completa del tumor primario (Sánchez-García 2009; Kang and Pantel 2013). La supervivencia de estas células tumorales estaría condicionada por la formación de un nicho premetastásico que sería organizado por las citoquinas segregadas por las células tumorales en una primera fase y, posteriormente por los componentes del microambiente tumoral, que lo alimentaría y colaborarían en la adquisición de nuevas capacidades metastásicas (Murgai et al. 2017; Hill et al. 2020).

3 IMPACTO DEL SEXO EN LA BIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD Y EN EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER

Previamente hemos descrito los factores de riesgo relacionados con el cáncer (ver apartado 1.3 Factores de riesgo relacionados con el cáncer). La investigación de la influencia del sexo sobre el desarrollo del cáncer es el tema sobre el que se centrará este estudio de tesis doctoral, por ello en el presente apartado profundizaremos en el sexo como factor de riesgo y la evidencia científica publicada.

Hombres y mujeres presentan notables diferencias que afectan a la biología de las enfermedades que padecen. Este hecho se manifiesta tanto en el tipo de enfermedades que sufre cada uno como en los patrones epidemiológicos. Es un dato conocido desde hace años que “las mujeres enferman más, pero los hombres mueren antes”. En una visión general observamos que las mujeres tienen mayor incidencia de enfermedades agudas y muestran mayor preocupación por su salud, de forma que consultan de forma temprana y

restringen sus actividades para recuperar la salud de forma precoz. La consecuencia inmediata de este patrón de comportamiento es, un número de consultas médicas significativamente mayor en mujeres que en hombres. Por el contrario los hombres son más proclives a padecer enfermedades de tipo crónico y, por encima de los 50 años, muestran mayores tasas de hospitalización. Visto así sería fácil concluir que el origen de la ventaja radica en el estilo de vida del sexo femenino, que parece más saludable que el que del sexo masculino, y por tanto los programas de prevención primaria, encaminados a generar hábitos de vida saludables y reducir la exposición a factores de riesgo, habrían conseguido equiparar o reducir las diferencias observadas, pero esto no ha sucedido (Verbrugge 1982).

Por otro lado los patrones de enfermedades que afectan a cada sexo son diferentes: Las mujeres tienen una susceptibilidad incrementada a enfermedades de origen autoinmune como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, diabetes tipo 1, etc., mientras que los hombres la tienen a procesos oncológicos. La susceptibilidad a enfermedades infecciosas no se encuentra muy definida pero sí muestra algunas polaridades sexo específicas como el caso de la toxoplasmosis, malaria o Zika en el caso de las mujeres y los virus de la hepatitis en el caso del hombre (Klein and Flanagan 2016).

Estas observaciones evidencian que el factor sexo tiene una relevancia considerable en la biología de la enfermedad y su influencia trasciende al terreno de la oncología, concretamente al pronóstico oncológico: *las mujeres presentan mejor supervivencia que los hombres, tanto a nivel global como en tasas ajustadas por grupos de edad* (World Health Organization 2020b; Clocchiatti et al. 2016). Este postulado ha sido respaldado por múltiples publicaciones, una de las más notables fue el proyecto Eurocare que comenzó su andadura en 1989 con el objetivo de analizar la supervivencia oncológica en Europa empleando los datos de los registros de la mayor parte de los países europeos. En 2009 se publicaron los datos del informe Eurocare 4 que aunaba más de 21 millones de pacientes procedentes de 116 registros de 30 países europeos. En dicho trabajo se proporcionaban datos actualizados de supervivencia oncológica en Europa enfatizando sobre la influencia del factor sexo sobre la edad al diagnóstico, el sitio anatómico y el lugar geográfico. Tras analizar 15 regiones anatómicas y realizar los correspondientes ajustes por

edad y región geográfica, el estudio concluyó que la supervivencia en el sexo femenino era claramente superior al sexo masculino. En el análisis multivariante, el factor sexo “mujer” se asoció a una reducción del riesgo relativo de muerte en cánceres de cerebro, cabeza y cuello, glándulas salivares, esófago, estómago, colon y recto, páncreas, pulmón, pleura, hueso, tiroides, riñón, melanoma cutáneo, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin así como en mieloma múltiple. Considerados todos los tumores de forma global, ser mujer se asoció a una reducción del 5% en el riesgo relativo de muerte, siendo la edad al diagnóstico el factor con mayor relevancia, dado que a medida que se incrementa la edad de diagnóstico la diferencia se redujo paulatinamente hasta desaparecer casi completamente en la población anciana (Figura 4). Los autores señalan un posible papel hormonal como causa subyacente de estas diferencias (Micheli, Ciampichini, Oberaigner, Ciccolallo, de Vries, Izarzugaza, Zambon, Gatta, De Angelis, et al. 2009; Clocchiatti et al. 2016).

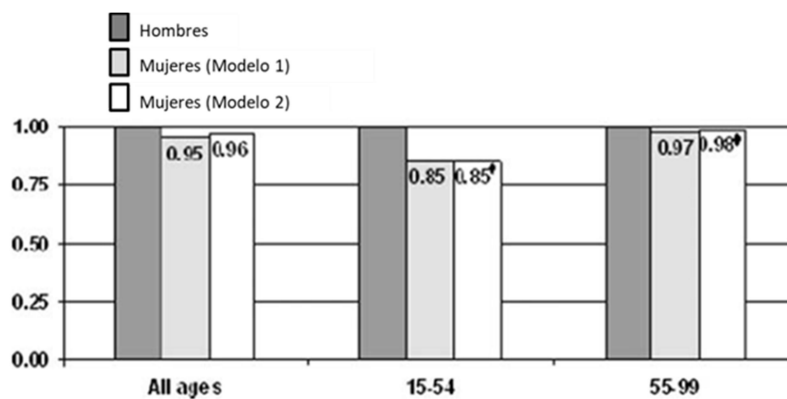


Figura 4: Exceso relativo de riesgo de muerte en mujeres en comparación con hombres para todas las edades, 15–54 años y 55–99 años, para todos los cánceres.

Fuente: Micheli et al. 2009

Adicionalmente, la diferencia oncológica entre sexos se mantiene estable al margen de los niveles de ingresos y renta per cápita. Así en Austria con un PIB per cápita de 43700 euros se evidenció una disminución del exceso de riesgo relativo de muerte en mujeres (edad ajustada) para todos los tumores sólidos estudiados, incluido melanoma cutáneo. En un periodo similar de tiempo, en Estonia, con la mitad de PIB per cápita, se encontraron los mismos resultados, pero además la ventaja específica del sexo femenino se incrementa a lo largo

del tiempo, siendo más patente al final del periodo de estudio que en sus inicios (Innos et al. 2015; Oberaigner and Siebert 2011). Tales diferencias observadas en Europa son extensible a otros países en diferentes continentes. En Estados Unidos los datos obtenidos tras el análisis de la base de datos del centro de vigilancia epidemiológica SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results Database) evidenciaron una mayor supervivencia en mujeres que en hombres. En Canadá, las mujeres presentaron una disminución de exceso de riesgo de muerte por cáncer del 13%, que se incrementó a un 23% en el grupo de menos de 55 años, postulándose nuevamente un factor etiológico hormonal sexual (Ellison 2016; Cook et al. 2011). En Corea se obtuvieron los mismos resultados que en Canadá, siendo la diferencia más marcada en el grupo de edad inferior a 55 años (Jung et al. 2012). La solidez de éste principio se extiende progresivamente en la medida que se pormenoriza en la investigación, de forma que, en los últimos años se han ido sumando los datos derivados de registros nacionales e internacionales enfocados a órganos específicos. Un reciente metaanálisis, que incluye 13 estudios retrospectivos y un estudio aleatorizado y controlado (185967 pacientes), demostró que el sexo del paciente es un factor independiente que influye en la supervivencia de los pacientes con cáncer colo-rectal, favoreciendo a las mujeres. Este trabajo sugiere que el sexo debería ser incluido en los factores pronósticos clínicos, con repercusión en la estadificación tumoral postoperatoria (Schmuck et al. 2020). De hecho en algunos tumores y órganos, como el carcinoma papilar de tiroides, el sexo del paciente es ya un factor de peso en la confección de la estrategia terapéutica (Haugen et al. 2015).

Las diferencias específicas respecto al sexo están, también, documentadas en los estudios epidemiológicos de melanoma cutáneo: La probabilidad de desarrollar un melanoma durante la vida es de 1,72% en hombres y de 1.22% en mujeres. El trabajo retrospectivo holandés sobre más de 10000 pacientes, evidenció un exceso de riesgo de muerte (*hazard ratio*) de 2.70 en hombres comparado con mujeres, esta diferencia se mantuvo tras ajustar todas las variables tumorales (espesor de Breslow, histología, localización anatómica y metástasis sistémicas o ganglionares)(Buoncervello et al. 2017). Igualmente, en uno de los estudios desarrollado en Estados Unidos de América, sobre la base de datos del programa del Instituto Nacional del Cáncer (US National

Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results registry), se evidenció que los hombres, entre 15 y 39 años, tenían un 55% más de probabilidades de morir por melanoma que sus controles respectivos en mujeres tras el adecuado ajuste de edad (Gamba et al. 2013). Estas diferencias en supervivencia, observadas en estadios precoces, también se mantienen en estadios avanzados (Joosse et al. 2012, 2013).

En el caso específico de nuestra población, en el Hospital Universitario Gregorio Marañón, se reproducen estos mismos resultados. El Servicio de Dermatología mantiene un registro prospectivo de la casuística de melanoma cutáneo desde 1997. En los diferentes análisis realizados sobre esta población, se puede observar la marcada influencia del factor sexo, de forma que en el grupo de pacientes con melanoma grueso (> 4mm), el ser hombre repercute en una probabilidad de muerte cuatro veces mayor respecto mujeres en esta misma situación (*hazard ratio* 4.3, $p=0.036$) (Figura 5) (Rodríguez-Lomba et al. 2017).

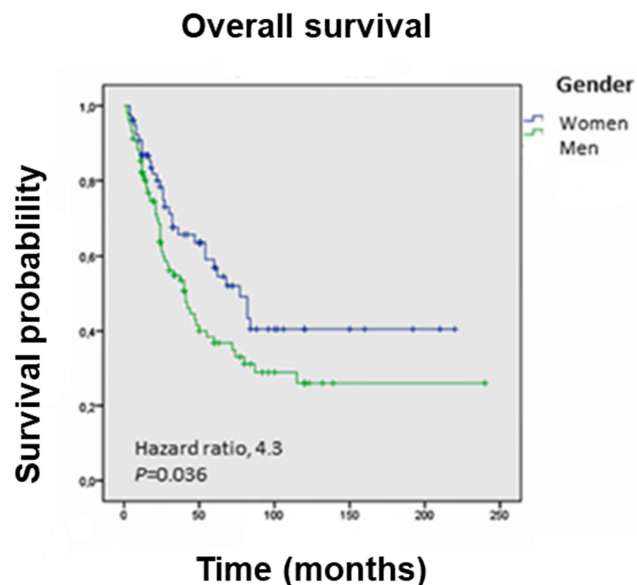


Figura 5: Probabilidad de supervivencia global, por sexo, en pacientes con melanoma de grosor > 4 mm

Fuente: (Rodríguez-Lomba 2017).

Igualmente, en el grupo de pacientes sometidos a biopsia selectiva de ganglio centinela, no se observaron diferencias entre hombres y mujeres en lo respectivo a grosor tumoral, ulceración, subtipo histológico o positividad del

ganglio centinela. Sin embargo, los hombres mostraron una supervivencia global y libre de enfermedad menor que las mujeres, encontrándose una tasa de mortalidad del 57% en hombres frente al 14.7% en mujeres al final del estudio.

En resumen, el sexo es un factor con influencia clara y constante sobre el cáncer, independientemente del periodo de tiempo estudiado, el estrato sociodemográfico o la región geográfica.

3.1 Posibles hipótesis responsables de la diferencia en pronóstico oncológico entre hombres y mujeres

El conocimiento, así como la comprensión completa, de los mecanismos responsables de las diferencias oncológicas entre hombres y mujeres es un tema complejo del cual desconocemos gran parte. Inicialmente se propuso como factor de capital importancia los diferentes estilos de vida mostrados por hombre y mujeres. La realidad es que estos comportamientos obedecen más a una cuestión de género que de sexo, y la teoría quedo descartada cuando los programas de prevención primaria instaurados en las últimas dos décadas del siglo XX no consiguieron igualar las tasas de supervivencia.

En la actualidad los estudios de investigación trabajan en dos líneas con el objetivo de encontrar la causa en la que asienta la diferencia oncológica entre sexos.

3.1.1 Teorías genéticas

En la información diferencial codificada en los cromosomas X e Y podemos encontrar algunos mecanismos por los que los hombres tienen un pronóstico más desfavorable. Así, la pérdida completa del cromosoma Y ha sido descrita con mayor o menor frecuencia en algunos cánceres como el de próstata, páncreas, colorrectal y el vejiga, todos ellos con mayor prevalencia en hombres (Clocchiatti et al. 2016). Recientemente también se ha descubierto que la pérdida extrema de genes ubicados en el cromosoma Y también haría más proclive a los hombres al desarrollo de algunos cánceres (Cáceres et al. 2020). En el caso de las mujeres, la duplicidad del cromosoma X obliga a una inactivación aleatoria para lograr una expresión equilibrada de los genes vinculados al mismo. Un error en la inactivación del cromosoma X en las

mujeres, con el consiguiente exceso de expresión génica, ha sido descrito como uno de los mecanismos implicados en la génesis tumoral. Pero además en el cromosoma X reside un 10% de los miRNA, implicados en el control de la expresión génica mediante la supresión de la traslación de RNAm o la estimulación de la degradación del mismo (Schurz et al. 2019a). Son muchos y complejos los mecanismos descritos, su la descripción escapa al objetivo de este trabajo.

3.1.2 Teorías hormonales (hormonas sexuales)

La carga genética diferencia a hombres y mujeres desde el momento del nacimiento, sin embargo es llamativo que la ventaja oncológica de las mujeres tienda a atenuarse e incluso desaparecer, en algunos cánceres, entorno a los 60 años, momento en el que la mayor parte de las mujeres han entrado en la menopausia y las hormonas sexuales han desaparecido. Por este motivo la etiología hormonal es muy atractiva. En relación con nuestro estudio y la etiología hormonal, dos aspectos pueden ser cruciales en las diferencias observadas: (1) La presencia de receptores para hormonas sexuales en la célula tumoral y su influencia en el crecimiento/ desarrollo y (2) la diferente interrelación tumor/huésped condicionada por la presencia de hormonas sexuales.

3.1.2.1 Receptores para hormonas sexuales en la célula tumoral

Las células expresan diversos tipos de receptores que regulan su actividad. La pérdida de genes reguladores o la ganancia de promotores, producidas a consecuencia de las alteraciones genómicas de las células tumorales, pueden conducir a alteraciones de los receptores en varios sentidos: (1) expresión de nuevos receptores, que responden a las señales proliferativas presentes en el entorno, (2) desarrollo de mutaciones en los receptores ya existentes. La consecuencia es la alteración de las vías de señalización intracelulares asociadas cuya repercusión final es el mantenimiento de la célula activada o la inhibición de la apoptosis. Este es el caso de la vía de señalización dependiente de la proteincinasa, mitogen-activated protein kinase (MAPK) cuya desregulación se ha visto implicada en la carcinogénesis de numerosos tumores humanos en los últimos años. De esta forma, la activación aberrante de la vía MAPK es un hallazgo frecuente en células malignizadas,

constituyendo un elemento precoz y necesario, en el desarrollo del carcinoma papilar de tiroides, por ejemplo (Zafon and Obiols 2009; Hanahan and Weinberg 2011). De igual manera sucede con el receptor del factor de crecimiento 1 (IGF1R), presente en multitud de células del organismo. La activación del mismo pone en marcha múltiples vías intracelulares, casi todas mediadas por MAPK, que estimula el crecimiento y promueve la supervivencia. En las células tumorales IGF1R juega un papel aún más crítico, puesto que promueve el crecimiento tumoral de forma directa e indirecta, inhibiendo la apoptosis, promoviendo la invasividad y capacidad metastásica así como induciendo la angiogénesis mediada por el factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Chaves and Saif 2011).

La influencia de los esteroides sexuales en estas vías de señalización es un hecho bien documentado. Hormonas relacionadas con los ejes sexuales, tales como PRL, LH, FSH o GNRH están muy implicadas en los tumores que afectan a los órganos reproductivos como ovario, próstata o mama (Y. Wang et al. 2015; Jacobson et al. 2011; Mertens-Walker, Baxter, and Marsh 2012). Sin embargo alguna de estas hormonas, están directamente implicadas en el desarrollo de otros tumores no reproductivos como es el caso de la PRL en el cáncer de hígado o la GH en el colon, piel, cerebro o hígado (Lea et al. 2015). También está demostrada la participación de los esteroides sexuales propiamente dichos, en el desarrollo y progresión de tumores en órganos reproductivos y no reproductivos, afectando directamente a las células parenquimatosas. Tales son los casos de la implicación de estrógenos y progesterona en el cáncer de mama (Brisken, Hess, and Jeitziner 2015; Yongshu Zhang et al. 2012) o los andrógenos en la próstata (Ramaraj and Cox 2014a), pero también sobre el cáncer de pulmón, de colon o cutáneo (Horng et al. 2017; Wada-Hiraike et al. 2006; Skjefstad et al. 2015).

De forma fisiológica las hormonas sexuales, dada su liposolubilidad, atraviesan la membrana plasmática y se unen a sus receptores específicos. Esta unión induce cambios conformacionales en su estructura terciaria que facilitan la unión al ADN y su actuación como factores de transcripción, regulando la activación o la inhibición de la expresión de genes (Scarpin et al. 2009; S. Lasarte et al. 2013). En situaciones patológicas, la interacción genera alteraciones de diversa índole en el ADN celular (metilación, conformación

cromatínica etc), que en el caso de la mama, por ejemplo, puede conducir a una hiperestimulación que induce metaplasia y posteriormente displasia, dando origen a las alteraciones tumorales (Nugent et al. 2015; Matsumoto et al. 2013). Los receptores de hormonas sexuales tienen una amplia distribución entre las células del organismo pudiendo encontrarse en células de la piel, del parénquima de la mayor parte de los órganos y, por supuesto, en las células del sistema inmune. El receptor nuclear de progesterona (PGR), también conocido como NR3C3 (receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, miembro 3), tiene dos isotipos que provienen del mismo gen pero se diferencian en su secuencia N-terminal. En 2003 se describió el receptor de membrana (PGRMC) en humano y ratón del cual hoy se conocen hasta cinco subtipos (Fujii and Kagechika 2019). El receptor de estrógeno hace referencia a un grupo de receptores celulares que son activados por 17β -estradiol y se han descrito dos tipos de receptores de estrógeno: (1) ESR, que es un miembro de la familia de los receptores nucleares y (2) el receptor de estrógeno acoplado a proteínas G, GPR30 (GPER), que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G. De forma general, cuando se habla de "receptor de estrógenos" se hace referencia a los del primer tipo, es decir, a los pertenecientes a la familia de los receptores nucleares. Existen dos formas diferentes del receptor de estrógeno, normalmente referidas como las formas α y β , ambas codificadas por genes diferentes e independientes (ESR1 y ESR2 respectivamente). El receptor GPER, fue descrito 1997 en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y realiza su acción a través de procesos no transcripcionales, por tanto es capaz de llevar a cabo efectos más rápidos (Carmeci et al. 1997; Eyster 2016). El receptor androgénico (también llamado NR3C4) es un receptor intracelular, por lo general ubicado en el citoplasma en su forma inactiva, de la subfamilia 3, grupo C, miembro 4. Se activa tras la unión de cualquiera de las hormonas androgénicas, testosterona o dihidrotestosterona, trasladándose, entonces, al núcleo, donde sufre un proceso de desdimerización y se une a regiones específicas del ADN para realizar sus funciones. Presenta alta densidad de distribución en la próstata, músculo esquelético, sistema nervioso central e hígado, aunque también puede encontrarse en otros múltiples tejidos (Fujii and Kagechika 2019). A modo de ejemplo, en el cáncer epidermoide esofágico la estimulación de los AR por sus ligandos hormonales, limita el crecimiento

(Palethorpe, Drew, and Smith 2017), mientras que las señales vehiculizadas a través de los ESR1 y ESR2, estimulan el crecimiento (Z. Zhang et al. 2017). De igual manera se ha observado en las células del carcinoma renal, en las que la estimulación del AR estimula el crecimiento (Zhai et al. 2017). Respecto a melanoma los hallazgos son algo más confusos porque, aunque ESR1 es el receptor más abundante en la piel sana, algunos trabajos han encontrado una disminución de su densidad en lesiones melánicas, mientras que otros han encontrado una fuerte positividad citoplasmática de ESR1 y PR en melanomas (Dika et al. 2019, 2017).

3.1.2.2 Diferente interrelación tumor/huésped condicionada por la presencia de hormonas sexuales

Como vimos durante la organogénesis el tumor recluta células de diversa índole durante su desarrollo, éstas conforman el microambiente tumoral, ente de capital importancia en el proceso de expansión tumoral y foco actual de extrema importancia por sus posibilidades terapéuticas (T. Wu and Dai 2017). Los principales componentes del microambiente (fibroblastos, sistema vascular y células del sistema inmune) pueden responder de diferentes maneras a las hormonas sexuales. Así la influencia de las hormonas sexuales sobre los FAC es un tema todavía confuso y la mayor parte de la experiencia de la que disponemos procede de tumores de mama o próstata en donde se han podido observar hechos contradictorios. De esta forma se ha observado que los estrógenos promueven la movilización de precursores de la médula ósea al tumor en el cáncer de mama incrementando la densidad del estroma (Zhuo et al. 2018). En la próstata, sin embargo, la expresión de ESR1 en los FAC se asocia a un comportamiento menos agresivo redundando en mejor supervivencia y menor tamaño tumoral (Yeh et al. 2016). Con respecto al receptor de andrógeno los datos también son contradictorios. En modelos animales, la presencia de AR en los FAC se ha asociado a promoción de las funciones protumorales, mientras que en estudios clínicos se ha relacionado con un comportamiento menos agresivo (Wen et al. 2015). Pocos estudios hay sobre el papel de la progesterona sobre los FAC así como sobre el papel de los receptores de hormonas sexuales en los FAC de tumores de órganos no reproductivos.

La influencia de las hormonas sexuales y sus receptores sobre la angiogénesis también ha sido estudiada. Los estrógenos promueven la angiogénesis, el crecimiento, proliferación y migración de células endoteliales a través del factor activador de las plaquetas y el factor de crecimiento endotelial A (Zhuo et al. 2018). De igual forma actúan los andrógenos, siendo los antagonistas de los receptores de andrógenos un potencial antiangiogénico (S. Yoshida, Ikeda, and Aihara 2016b).

Por último hay que considerar la respuesta de las células del sistema inmune a las hormonas o, más adecuado, la respuesta inmune diferente observada entre mujeres y hombres. La mayor parte de esta experiencia proviene del campo de las infecciones, en el que se ha evidenciado que las mujeres desarrollan una inmunidad innata y adquirida más potente que la de los hombres, condicionando que, los hombres tengan una mayor susceptibilidad a infecciones y a patología oncológica mientras que las mujeres muestran mayor susceptibilidad a enfermedades de origen autoinmune. Esta susceptibilidad a infecciones, trasciende más allá de los mamíferos y, parece extenderse desde el nacimiento hasta la edad adulta (Chamekh et al. 2017; Klein and Flanagan 2016). En la búsqueda de los condicionantes de esta diferencia hay que tomar en cuenta nuevamente factores hormonales y genéticos. Los hombres sólo disponen de un cromosoma X que, codifica unos 1100 genes, siendo la mayor parte de ellos diferentes del centenar codificado por el cromosoma Y. El cromosoma X contiene una elevada densidad de genes involucrados en la respuesta inmune innata y adquirida. Así, los encontramos relacionados con el proceso de diferenciación y polarización de los macrófagos (IL3RA, GATA1), con los patrones de reconocimiento de patógenos, producción de citoquinas y vías de señalización intracelular (TLR7, TLR8, IRAK1), con la capacidad fagocítica (CYBB) o con la proliferación de células T (IL2RG) o la activación de células B (CD40LG) por poner algunos ejemplos, incluso el receptor de andrógenos está codificado en el cromosoma X (Randall 2008; Schurz et al. 2019b). Respecto a las hormonas sexuales, en líneas generales se ha publicado que los estrógenos tienen un papel estimulante de la respuesta inmune en infecciones mientras que los andrógenos son inmunosupresores. Los efectos de la progesterona se asocian a un perfil antiinflamatorio, aunque gran parte de esta experiencia proviene del periodo del embarazo (Klein and

Flanagan 2016). En detalle, la repercusión de las hormonas sexuales sobre la respuesta inmunitaria es más compleja y está sometida a múltiples variables como, la concentración de hormonas sexuales existente en cada momento del ciclo fisiológico de la vida (especialmente en mujeres secundariamente al ciclo hormonal, embarazo y menopausia), de la densidad de receptores en las células y del tipo de receptor estimulado. Así, dosis bajas de 17β -estradiol estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias como IL1, IL6 o TNF, mientras que altas concentraciones reducen la producción de las mismas (Klein and Flanagan 2016). Los ESR1 se expresa en niveles elevados en las células T, mientras que ERSR2 lo hace en las células B y, el estímulo sobre ESR1 en los macrófagos, reduce la actividad proinflamatoria y las propiedades protumorales de los macrófagos mientras que el estímulo AR es liberador de citoquinas proinflamatorias (Clocchiatti et al. 2016). Por otro lado, el papel de la testosterona parece menos variable, teniendo mayoritariamente un papel inmunosupresor. De forma representativa, reduce la actividad de las células NK, la expresión de TLR4 en macrófagos y la síntesis de TNF, iNOS y NO (Klein and Flanagan 2016). Finalmente la progesterona tiene un papel controvertido siendo, incluso obviada en algunos trabajos. Fundamentalmente se le adjudica un papel antiinflamatorio y por tanto inmunosupresor, disminuyendo el número de NK, la secreción de INF γ y TNF etc pero, por otro lado, niveles altos de progesterona se asocian a un incremento del número de neutrófilos, elementos fundamentales en la activación, orientación y regulación de la inmunidad innata y adquirida, reflejando que probablemente el nivel hormonal en sangre tenga un papel decisivo. A estos datos hay que añadir que, en otros ambientes ha demostrado ser fundamental para mantener una respuesta inmune adecuada contra patógenos y proteínas alogénias (Klein and Flanagan 2016).

4 MELANOMA CUTÁNEO

4.1 Definición

El melanoma es una neoformación originada a partir de los melanocitos. Generalmente se asienta en la piel aunque también puede verse en mucosas y globo ocular. De forma menos frecuente puede afectar al aparato digestivo y al

sistema nervioso. Aunque el melanoma cutáneo no es el cáncer más frecuente de piel, sí es el responsable de la mayor parte de las muertes (Ward and Farma 2017).

4.2. Epidemiología

La incidencia de melanoma asciende anualmente y, a pesar de la implementación de los programas de prevención primaria y secundaria y los avances terapéuticos en los últimos años, las cifras de mortalidad continúan en aumento. Las cifras de incidencia varían en función de la región geográfica, que suele condicionar el fototipo cutáneo y el grado de exposición solar. Así en Australia se observa una incidencia de 40 casos/100000 habitantes/año, mientras que Asia o África es de 0.2-0.4/100000 habitantes/año. En España la incidencia se ubica en unos 6-8 casos/100000 habitantes/año con una mortalidad de 1.4 casos/habitantes/año (Ward and Farma 2017; SEOM).

4.3 Factores de riesgo para el desarrollo de melanoma

El factor de riesgo más importante es la exposición solar aguda, sobre todo durante la infancia y juventud. Además de otros factores ambientales como la inmunosupresión o la exposición a radiación electromagnética o UV artificial, existen factores constitucionales propios de cada individuo, tales como: la edad superior a 60 años, un fototipo cutáneo I-II, pelo rojo o rubio, ojos azules, elevado número de nevus melanocíticos, antecedentes familiares y el sexo masculino. Respecto a este último, se estima que la probabilidad de un hombre de desarrollar un melanoma es 1.5 veces mayor que una mujer, si viene es cierto que este dato hay que referenciarlo a la edad: Las mujeres tienen mayor incidencia que los hombres hasta los 40 años. Sin embargo a los 75 años, la incidencia en hombres es tres veces mayor que en mujeres. El antecedente de un melanoma en la historia personal de un individuo es muy importante: Aproximadamente entre un 1-8 % de los pacientes con historia previa de melanoma, desarrollarán otros (Ward and Farma 2017).

4.4 Tipos de melanoma

Pueden distinguirse distintas variedades:

- Melanoma de extensión superficial: el más común.
- Melanoma nodular: menos común (10-15%). Es más frecuente en hombres a partir de los 50-60 años y presenta mayor tasa de metástasis.
- Melanoma lentigo maligno (4-10%): Asociado a la exposición prolongada a la luz.
- Melanoma lentiginoso acral: poco común, 5%. Se desarrolla a una temprana edad, predominantemente en mujeres y localizado en dedos, palmas y plantas.

Existen otros melanomas menos frecuentes como el melanoma de mucosas o el melanoma desmoplásico. Este último más habitual en pacientes mayores, normalmente hombres, ubicado en cabeza y cuello y generalmente con gran crecimiento infiltrante y, por ello, altas tasas de recurrencia, o (Ward and Farma 2017).

4.5 Diagnóstico

El principal y primer escalón diagnóstico es la exploración física. Este método es altamente sensible para detectar lesiones cutáneas sospechosas, sobre todo en especialistas entrenados, pero puede ser poco específico para melanoma. Disponemos, además, de la dermatoscopia, que es un método diagnóstico no invasivo muy empleado. La biopsia, escisional con margen estrecho (2 mm) o tipo "punch", es el medio diagnóstico definitivo.

El patólogo evaluará la muestra y, en caso de ser un melanoma, aportará información importante para saber cuáles son los siguientes pasos: Espesor tumoral máximo en mm (índice de Breslow), presencia de ulceración, nivel de Clark (I-V), tasa mitótica en mm², microsatelitosis/ metástasis en tránsito, invasión vascular y/o perineural, infiltrado linfocitario intratumoral, presencia de regresión, fase de crecimiento radial, tipo histológico, nevus asociado, situación de los márgenes laterales y/profundos y distancia mínima en mm al tumor (Ward and Farma 2017).

4.6 Tratamiento

Tras el diagnóstico, el siguiente paso habitual suele ser indicar la ampliación de los márgenes de resección y valorar la necesidad de evaluar la posible diseminación a los ganglios.

El melanoma cutáneo tiene un marcado tropismo por la afectación linfática y, a día de hoy conocemos cuáles son las situaciones en las que puede ser más probable la afectación ganglionar. Para valorar las cadenas ganglionares y puesto que los patrones de migración ganglionar desde la piel son muy variables, se realiza una linfogammagrafía dinámica con objeto de identificar el ganglio centinela y biopsiarlo selectivamente. Este paso se realiza siempre y cuando la exploración de los territorios ganglionares no revele adenopatías macroscópicamente patológicas. La indicación de realizar este procedimiento, actualmente, se centra sobre melanomas de más de 0.8 mm de espesor, o melanomas de menos de 0.8 mm de espesor con presencia de ulceración, en ausencia de datos clínicos o radiológicos sugestivos de afectación ganglionar. Mediante la inyección cutánea perilesional de Tc⁹⁹ y la realización de la linfogammagrafía dinámica, podremos observar a qué cadena ganglionar drena la región cutánea en la que estaba ubicado el melanoma. De esta forma identificamos el primer ganglio de drenaje de esa región ganglionar, denominado ganglio centinela y que, en teoría, predice el estado de su cadena ganglionar. La resección de ese ganglio se denomina biopsia selectiva del ganglio centinela y su análisis aporta una información decisiva, tanto pronostica como para determinar estrategias terapéuticas (Avilés-Izquierdo et al. 2020).

Tras la realización del ganglio centinela y su análisis puede ser necesario, o no, la realización de una nueva cirugía para retirar el resto de los ganglios linfáticos, procedimiento denominado linfadenectomía y cuya indicación es foco de una intensa controversia a día de hoy por su implicación en la supervivencia (Faries et al. 2017).

Tras completar el tratamiento quirúrgico, en caso de ser necesario, el melanoma se estadifica mediante la clasificación diseñada por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) y denominada TNM (Tumor/Node/Metastasis). En ella se clasifica el tumor mediante sus

características locales (Tumor), ganglionares (Node) y la presencia de metástasis (M) (Amin et al. 2017).

Los pacientes, adecuadamente estadificados, son evaluados por un Comité Multidisciplinar de expertos. En él se evalúa la posibilidad de recaída, en ausencia de enfermedad visible en otras partes del organismo, y se decide la mejor estrategia. Ésta puede ir desde observación y control clínico/radiológico hasta la administración de tratamientos adyuvantes, bien farmacológicos o radioterápicos. Las alternativas farmacológicas han sufrido una revolución en los últimos años de la mano de la inmunoterapia.

La decisión de cuál es la mejor elección de fármaco o combinación de los mismos es compleja y obedece a la consideración de múltiples factores y debe ser realizada por un oncólogo experto. Aparte de la quimioterapia sistémica convencional con fármacos clásicos como el interferón o la dacarbacina, actualmente muy poco utilizadas, disponemos de otros dos grandes grupos de fármacos: (1) Las terapias dirigidas, que están centradas en los inhibidores de las vías proliferativas de las map kinasas y (2) la inmunoterapia, cuya base es la inhibición de los puntos de control del sistema inmune, llamados “check points”. El primer grupo de fármacos basa su efecto en la conocida influencia que tienen algunas mutaciones observadas en los tumores, mutaciones de B RAF o de MEK, sobre la proliferación tumoral. Al inhibirlas, se puede frenar el crecimiento tumoral. El segundo grupo se centra en revertir los mecanismos tumorales de escape empleados por las células tumorales. Los check point son puntos de control para el sistema inmune, moléculas de superficie que al ser activadas, activan o inhiben a las células del sistema inmune para desencadenar o frenar una respuesta inmune. Es el sistema de control empleado para regular su actuación y no eliminar células propias. Las células tumorales emplean los check points a su favor, evitando ser reconocidas y destruidas. La activación de estos check points de los linfocitos T inhibe su respuesta inmune y permiten crecer al tumor, por tanto al reactivarlos con terapia, las células citotóxicas vuelven a ser efectivas (Lee, Al-Shamkhani, and Mirnezami 2019).

4.7. Pronóstico

El pronóstico del melanoma queda condicionado por el estadio postoperatorio (Figuras 6A y 6B) y está fuertemente influenciado por el sexo como hemos expuesto en el apartado 2, existiendo una ventaja en supervivencia vinculada al sexo femenino. Además los melanomas en estadios localizados en mujeres mostraron un menor riesgo de metástasis. El melanoma localizado en los hombres muestra peores características en el momento del diagnóstico: mayor tasa de ulceración, mayor grosor, localización más frecuente en cabeza, cuello e incluso en caso de recaer, las mujeres lo hacen más tarde y con mayor tasa de curación que los hombres (Roh et al. 2015).

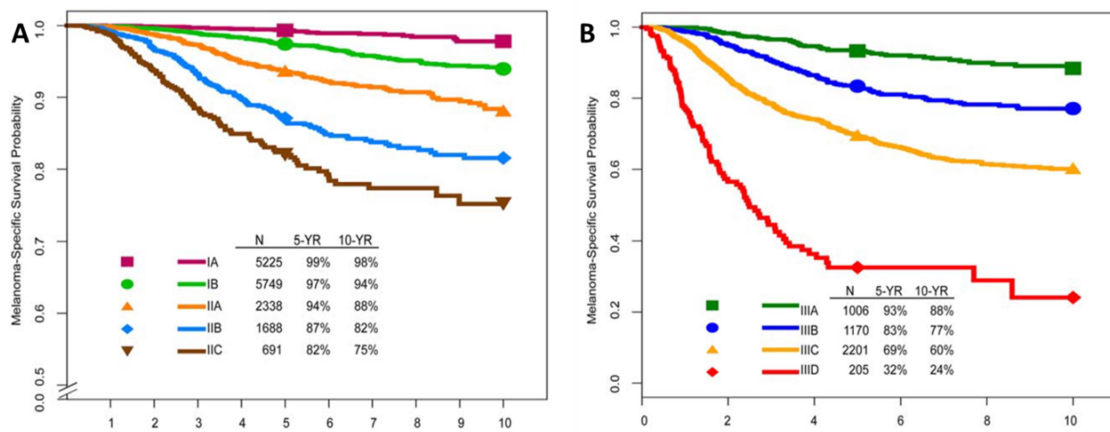


Figura 6: Probabilidad de supervivencia por melanoma a 10 años. Cancer Staging Manual, 8th edition (2016).

A: Estadios I y II de la American Joint Cancer Comitte.

B: Estadio III de la american Joint Cancer Comitte.

Fuente: Amin et al. 2017

***JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E
HIPÓTESIS***

JUSTIFICACIÓN

El sexo femenino presenta mejor pronóstico oncológico que el sexo masculino. Esta observación clínica es constante para la gran mayoría de los tumores no sexo específicos y es independiente de la región geográfica estudiada o el nivel socio-económico del país. Es muy interesante el hecho de que, en la gran mayoría de los cánceres, la ventaja pronóstica para las mujeres es mucho más acentuada en el subgrupo de edad con menos de 50-55 años y posteriormente tiende a atenuarse pudiendo incluso llegar a desaparecer. Las primeras interpretaciones de esta diferencia pronóstica se centraron sobre los diferentes comportamientos sociales mostrados frente a la salud por hombres y mujeres, pero los programas de prevención primaria no consiguieron eliminarla. Por tanto, la causa debe residir en factores intrínsecos al sexo que afectan al proceso de génesis y desarrollo tumoral.

La oncogénesis es un proceso complejo que guarda cierta similitud con la organogénesis. En su implantación y desarrollo, las células tumorales establecen relaciones con los elementos de su entorno con el objetivo de generar una estructura propicia para el desarrollo de un soporte estructural y vascular que le permita crecer y expandirse. Estas relaciones son las que podrían ser moduladas por factores intrínsecos al sexo y que acabasen generando ambientes más o menos propicios para el desarrollo y progresión tumoral. Son dos los factores intrínsecos con mayor relevancia en la diferencian entre sexos, la carga genética albergada en los cromosomas sexuales y las hormonas sexuales. Estas últimas ejercen influencia sobre múltiples funciones orgánicas y se responsabilizan de la organización y coordinación de situaciones fisiológicas de extrema complejidad pero, al mismo tiempo, su desregulación también tiene importantes consecuencias patológicas.

Considerando que las hormonas sexuales son un factor claramente diferenciador entre sexos, su reconocida influencia sobre el funcionamiento y coordinación de órganos y sistemas y la atenuación de la ventaja pronóstica oncológica en relación con la edad observada en los estudios clínico-epidemiológicos, es necesario investigar la influencia de las hormonas sexuales

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS

sobre el desarrollo tumoral, sus mecanismos de actuación, y si estos mecanismos son potencialmente utilizables en clínica.

Melanoma cutáneo es un tumor de gran relevancia clínica en el que tenemos extensa experiencia clínica y que, además, muestra un patrón de comportamiento acorde a lo que hemos expuesto.

HIPÓTESIS

La diferencia en pronóstico oncológico evidenciada entre sexos puede deberse al efecto de las hormonas sexuales sobre el desarrollo tumoral. Postulamos que las hormonas sexuales afectan a la implantación y desarrollo tumoral condicionando sus posibilidades de crecimiento y expansión y que esto, podría demostrarse empleando un modelo tumoral basado en melanoma cutáneo.

OBJETIVOS

El **objetivo global** de la línea de investigación es determinar la influencia de las hormonas sexuales en la implantación y desarrollo tumoral.

Para ello se desarrollaran varios **objetivos específicos**:

1. Evaluar el efecto del sexo sobre el desarrollo del melanoma cutáneo humano en un modelo de ratón.
2. Evaluar el efecto de las hormonas sexuales sobre las células tumorales de melanoma cutáneo humano.
3. Evaluar el efecto de las hormonas sexuales sobre el desarrollo tumoral local, sometiendo al modelo creado a diferentes estímulos hormonales.
4. Evaluar el impacto macroscópico que generan las hormonas sexuales en la diseminación a distancia (enfermedad metastásica)

MATERIAL Y MÉTODOS

1 RATONES

Este proyecto se ha realizado de acuerdo con el RD53/2013 y la Ley 32/2007, con respecto a las reglas básicas para la protección y el cuidado de animales en experimentación. El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a la Directiva 2010/63/UE, Ley 9/2003 y RD178/2004. El personal encargado de todas las manipulaciones y procedimientos quirúrgicos o intervencionistas sobre los animales dispone de la acreditación necesaria, según establecen las disposiciones vigentes. Todos los procedimientos fueron aprobados por la Comunidad de Madrid (PROEX 147/14, 256/16, 261/16, 017/17). Las instalaciones empleadas fueron las de la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental (Registro ES280790000087) pertenecientes al Hospital General Universitario Gregorio Marañón y al Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM).

Para el desarrollo del modelo animal con xenoinplante se emplearon ratones machos y hembras NSGTM de los laboratorios Jackson: NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (005557). Se trata de ratones modificados, que no expresan el gen Prkdc ni el gen IL2rg ligado al cromosoma X, lo que les confiere importante deterioro en su sistema inmune, por este motivo son un modelo muy favorable para la realización de xenotransplantes. Así, estructuralmente no presentan ganglios linfáticos y sólo algunos rudimentos quísticos en el timo. A nivel celular, la ausencia de expresión de Prkdc genera deficiencia completa de linfocitos T y B maduros y la mutación concerniente a IL2rg impide la señalización a través determinadas citoquinas, causando una actividad citotóxica extremadamente baja en las células NK. Tampoco disponen de sistema de complemento y, adicionalmente, presentan algún deterioro en el funcionamiento de macrófagos y células dendríticas. Externamente no muestran ninguna anomalía física ni conductual, son de tamaños normales, viables y fértiles. Su evolución cronológica es similar a la del resto de los ratones empleados en experimentación. Al nacer, pesan uno o dos gramos, no tienen capacidad visual ni auditiva, no tienen pelo y son muy activos. El desarrollo del pelaje comienza al tercer día y se ha completado en torno a séptimo/décimo día. A los doce días comienzan a tener capacidad visual/auditiva y, en torno al día 13 o 14 comienzan a ingerir alimento sólido y

agua del bebedero, pudiendo ser destetados a los 21 días aproximadamente, momento en que pesan entre 11 y 14 gramos. La madurez sexual de la hembra se produce entorno a la 7^a-8^a semana y la del macho entre a 6^a y la 8^a semana, desde este momento son considerados adultos (Behringer et al., “005557 - NOD.Cg-Prkdc<scid> Il2rg<tm1Wjl>/SzJ”). Dadas sus especiales condiciones, los ratones se mantuvieron estabulados bajo condiciones libres de patógenos específicos, en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y en condiciones controladas de temperatura/humedad. Asimismo dispusieron de acceso libre a agua/comida y de un enriquecimiento ambiental adecuado.

2 LÍNEAS CELULARES

Se seleccionaron dos líneas celulares derivadas de melanoma cutáneo humano que, en el ratón, generan melanomas nodulares amelanóticos:

- BLM (RRID: CVCL_7035).
- SK-MEL-103 (RRID: CVCL_6069).

Las líneas celulares se almacenaron en condiciones estériles de criopreservación en nitrógeno líquido, siguiendo las recomendaciones del suministrador. Tras su descongelación fueron mantenidas y cultivadas en medio RPMI (RPMI-1640 Medium.Fisher Scientific.UK) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5% y L-glutamina. Las condiciones de cultivo fueron: Temperatura 37⁰ y atmósfera con un 95% de humedad y un porcentaje de CO₂ del 5%. Los cultivos se realizaron sobre placas (Cultek: 15430591. 100x20 mm con superficie de 55 cm²) y flask (Cultek: 45353136. 75 cm²). Durante el crecimiento no se utilizó antibiótico y se realizó análisis por PCR para descartar la presencia de micoplasma en los cultivos. Se realizaron los cambios de medio y placa de acuerdo a las condiciones de coalescencia recomendadas por el suministrador.

3 ANÁLISIS IN VITRO DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE RECEPTORES PARA HORMONAS SEXUALES EN LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES

El análisis de la expresión de receptores para hormonas sexuales, se valoró mediante la expresión de las proteínas: ESR1 (el receptor de estrógenos α o

ER α), PGR (el receptor de progesterona) y AR (el receptor de andrógenos o de testosterona). Se optó por analizar estas proteínas por ser las más comunes y las más referenciadas en la literatura.

3.1 Procedimientos de detección/evaluación de la expresión

Para determinar la expresión y localización de receptores de hormonas sexuales en las líneas celulares de melanoma, se realizó marcaje por inmunofluorescencia indirecta y análisis posterior por dos métodos diferentes:

3.1.1 Análisis cuantitativo por citometría de flujo.

3.1.2 Análisis de localización por microscopía confocal.

3.1.1 Análisis cuantitativo por citometría de flujo

Para el marcaje de receptores de hormonas sexuales en las líneas celulares tumorales y su posterior análisis por citometría de flujo se emplearon anticuerpos específicos (Tabla 2). Las líneas celulares seleccionadas, BLM y SK-MEL-103, se marcaron con el kit comercial eBioscience™ Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (código de catálogo 00-5523-00, ThermoFisher Scientific, EEUU), que está diseñado para el estudio de la expresión de proteínas nucleares. Se siguieron los protocolos recomendados por el suministrador y se usaron los anticuerpos primarios de la Tabla 2. La solución de bloqueo se complementó con inmunoglobulinas humanas IGG (50 μ g/mL) con el fin de bloquear los receptores Fc presentes en la superficie celular y evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos de interés. La incubación con anticuerpos se realizó a 4°C en cámara húmeda y oscuridad. Las células muertas se excluyeron mediante marcaje con 7-amino-actinomicina D (Sigma, EEUU). Como controles negativos se utilizaron anticuerpos de los mismos isotipos, y el marcaje con el anticuerpo secundario sin el primario. Las células se analizaron en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, EEUU) y el análisis de datos se realizó con el software FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, Oregón, EEUU).

Anticuerpo	Clon	Especie	Referencia	Casa	Concentración
PGR (C-19)	Policlonal	Rabbit IgG	SC 538	Santa Cruz Biotechnology	1:50
AR (Ab-94)	Policlonal	Rabbit IgG	B0767	Assay Biotechnology	1:50
ESR1 (H-184)	Policlonal	Rabbit IgG	SC 7207	Santa Cruz Biotechnology	1:50

Tabla 2: Anticuerpos empleados para la detección de receptores hormonas sexuales.
PGR: Receptor progesterona; AR: receptor de andrógenos; ESR1: Receptor estradiol alfa

3.1.2 Análisis de localización por microscopia confocal

El crecimiento de las líneas celulares, se realizó en placas multiwell de 24 pocillos (15.5 mm, 2 cm²), equipadas con cubreobjetos circulares Nunc™ Glass Bottom Dishes 12 mm (ThermoFisher Scientific, EEUU). Los cubreobjetos se incubaron con fibronectina (Merk, EEUU) y sobre ellos se depositó una cantidad de 2.5x10⁵ células/pocillo. Posteriormente se realizó una incubación durante cuatro horas en medio RPMI con SFB 5%, de esta forma se consiguió la adherencia sobre el cristal. Tras esta incubación se fijaron con paraformaldehído al 2% (Sigma Aldrich, EEUU) en buffer fosfato salino (PBS) y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% (Sigma Aldrich, EEUU). Para prevenir la unión inespecífica, las muestras se bloquearon con SFB 5% y, para evitar la unión de los anticuerpos a los receptores de Fc, se añadió inmunoglobulinas humanas IGG (50 µg/mL). La incubación de los anticuerpos primarios y el secundario se realizó a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad. Después, las muestras se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Dihydrochloride (Calbiochem, Merk, EEUU) para resaltar los núcleos celulares y se procedió al montaje de las muestras en medio fluorescente (Dako Cytomation). Los controles se obtuvieron incubando las células sólo con los anticuerpos secundarios. Las preparaciones resultantes se analizaron en microscopio confocal de fluorescencia (SPE, Leica Microsystems, Germany). Las imágenes se capturaron empleando el objetivo de inmersión en glicerol ACS-APO 20x, apertura numérica 0.60.

4 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN IN VITRO DE LAS LÍNEAS CELULARES TUMORALES EN PRESENCIA DE HORMONAS

El impacto de la presencia de hormonas sexuales en la tasa de proliferación *in vitro* de las líneas celulares tumorales (BLM y SK-MEL-103), se analizó empleando, métodos cuantitativos basados en citometría de flujo y métodos de procesamiento de imágenes por microscopía confocal:

4.1 Contaje por citometría de flujo.

4.2 Análisis de la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU):

4.2.1 Citometría de Flujo.

4.2.2 Microscopía Confocal.

4.1 Contaje por citometría de flujo

La incubación *in vitro* se realizó en placas de 24 pocillos (Corning, EEUU) en los que se depositaron 1×10^5 células/pocillo en RPMI + SFB 1%, y a los que se añadieron las hormonas (estradiol, progesterona y testosterona) a diferentes concentraciones. Para la preparación de las hormonas se empleó solución en polvo de Estradiol (Merck, EEUU), Progesterona (Merck, EEUU) y Testosterona (Merck, EEUU) que se disolvió en etanol absoluto para generar una solución stock 0.01 M. Con dichas soluciones stock se realizaron diluciones en medio de cultivo para lograr concentraciones fisiológicas: estradiol 1×10^{-10} M, progesterona 1×10^{-8} M y testosterona 1×10^{-8} M. Además se titularon las hormonas en sus concentraciones infra fisiológicas y supra fisiológicas, que se añadieron a los diferentes pocillos para cubrir un mayor rango. Como control se utilizó un pocillo al que sólo se le añadió la cantidad correspondiente de etanol. Tras 72 horas de incubación se lavaron los pocillos, se despegaron las células con tripsina y, después de lavarlas, se realizó el contaje por citometría de flujo Gallios (Beckman Coulter, Brea, California, EEUU) usando como patrón las Flow-Count fluorospheres (Beckman, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de los datos se realizó con el software FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, Oregón, EEUU).

4.2 Análisis de la incorporación de BrdU

La segunda forma por la que se evaluó el efecto de las hormonas en la proliferación celular, fue por la incorporación de la bromodeoxiuridina (BrdU). Dado que este compuesto es un análogo sintético muy similar a la timidina, puede incorporarse al ADN de las células en fase de síntesis (fase S), sustituyéndola entre un 99.8 y 100%. Una vez recogidas las células, y fijadas, se reveló la presencia de BrdU gracias al marcaje del mismo con un anticuerpo que lleva acoplado el fluorocromo Alexa 488 (ThermoFisher, EEUU). De esta forma se pudo realizar una medición de la repercusión de la presencia de hormonas en el medio de cultivo durante la proliferación *in vitro*. La lectura de la fluorescencia se realizó por citometría de flujo y por microscopía confocal.

4.2.1 Análisis mediante citometría de flujo

Para el análisis de la proliferación celular por citometría de flujo empleando BrdU, se empleó el Kit de tinción Foxp3/Transcription Factor (Ref: 00-5523-00. Thermo Fisher. EEUU). Se requirió la adecuada preparación de las células tumorales y su sembrado en placas M6, a una concentración de 3×10^5 células/pocillo en medio RPMI + SFB al 1%. Tras 24 horas de incubación se administró un pulso de BrdU a concentración final en el cultivo de 10 μ M y se incubó durante 4 horas para valorar el número de células en división en cada tratamiento. La fijación de las células y la permeabilización de las membranas plasmáticas y nucleares se realizaron con la solución de tampón incluida en el Kit descrito. La desnaturalización del ADN para exponer y poder marcar el BrdU con el anticuerpo primario se realizó con ácido clorhídrico, neutralizado posteriormente con tetraborato de sodio (bórax). Las células se resuspendieron en solución de bloqueo con IGG humana 2mg/ml y, a continuación, se incubó con el anticuerpo anti-BrdU (Dako, EEUU). Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario (antidonkey antimouse 488) marcado con el fluorocromo (FITC) y se prepararon las muestras para ser leídas en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, EEUU). Como controles negativos se utilizaron anticuerpos con los mismos isotipos acoplados, Alexa 488 (ThermoFisher, EEUU). El análisis de los datos se realizó con el software FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, Oregón, EEUU).

4.2.2 Análisis mediante microscopia confocal

Para la obtención de imágenes en microscopia confocal se incubaron 25000 células con RPMI + SFB 1% sobre placas de 24 pocillos en los que se depositaron cubres redondos Nunc™ Glass Bottom Dishes 12 mm (ThermoFisher Scientific, EEUU). Después del pulso de BrdU, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton X-100. Tras la desnaturalización con ácido clorhídrico y la neutralización con Bórax, se procedió al bloqueo con RPMI + SFB 5% e IGG humana. En el último paso, tras la incubación con el anticuerpo anti-BrdU marcado con Alexa 488 (ThermoFisher, EEUU) se añadió DAPI Dihydrochloride (Calbiochem, EEUU) para teñir los núcleos celulares y se procedió al montaje de las muestras en medio de fluorescencia (Dako Cytomation, EEUU). Como controles negativos se utilizaron anticuerpos con los mismos isotipos acoplados Alexa 488 (ThermoFisher, EEUU). Las preparaciones resultantes se analizaron en microscopio confocal de fluorescencia (SPE, Leica Microsystems, Germany). Las imágenes se capturaron empleando el objetivo de inmersión en glicerol ACS-APO 20x, apertura numérica 0.60.

5 MODELOS MURINOS DE GENERACIÓN Y SEGUIMIENTO DE TUMORES SIN ADMINISTRACIÓN EXÓGENA DE HORMONAS SEXUALES

Se desarrollaron varios modelos de generación de tumores en ratones, machos y hembras, en diferentes escenarios hormonales, pero sin recibir en ningún caso aporte exógeno de hormonas sexuales (Figura 7).

5.1 Modelo NATURAL en ratón ADULTO.

5.2 Modelo NATURAL en ratón PREPUBER.

5.3 Modelo NATURAL en ratón ESTERILIZADO.

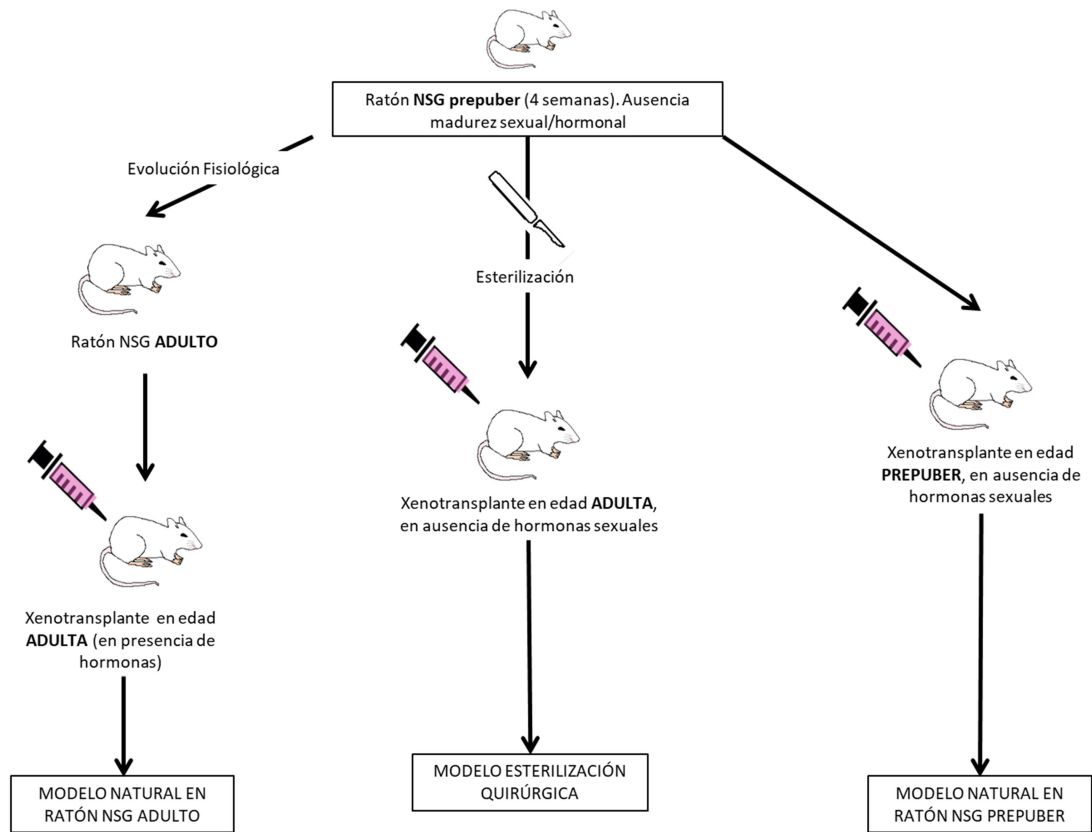


Figura 7. Modelos murinos naturales de generación y seguimiento de tumores sin administración exógena de hormonas sexuales

5.1 Modelo natural en ratón adulto

Se emplearon ratones machos y hembras adultos (8 semanas). Tras la descongelación de las líneas celulares se procedió al cultivo y expansión de la población, hasta lograr el establecimiento en fase de exponencial. El xenotransplante se realizó con un inóculo de 0.7×10^6 células por animal suspendidas en 100µl en PBS. La cuantificación del inóculo se determinó por cámara de Neubauer conforme a los métodos rutinarios de cultivos celulares. El xenotransplante se realizó mediante punción subdérmica en la zona dorsocaudal, empleando una aguja 21G, bajo adecuadas condiciones de asepsia y antisepsia, en cabinas biológicas de seguridad tipo II y con los animales sedados empleando la anestesia inhalatoria Sevoflurano (Abbott, EEUU). En el octavo día post xenotrasplante se rasuró la zona dorsal del animal con el objetivo de detectar, por palpación, el comienzo de la lesión nodular. Una vez detectado se realizó seguimiento, a intervalos de 48 horas, hasta que la lesión fue accesible a medición mediante calibrador, tipo cartabón

de corredera. Se realizaron mediciones, cada 48 horas, entre las mordazas externas del calibrador, registrándose dos diámetros y calculando la superficie en cm^2 . No se realizó medición de la profundidad debido a la dificultad técnica y la consiguiente subjetividad del dato. Los criterios de punto final del experimento se establecieron acorde con los procedimientos aprobados por la Comunidad de Madrid, y fueron los siguientes: 1) En torno al día 20 por criterio humanitario, 2) Tamaño tumoral mayor a $1/1.5 \text{ cm}^2$ y 3) Ulceración de la lesión nodular (Figura 8).

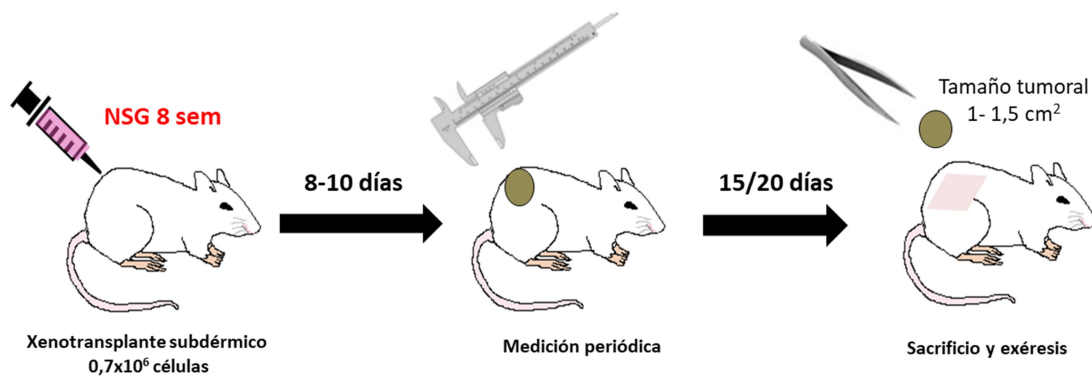


Figura 8: Modelo natural en ratón NSG adulto, madurez sexual.

Secuencia temporal en ratón NSG adulto desde el xenotransplante subdérmico hasta el sacrificio y extracción tumoral (criterio de finalización: Superar los 20 días o tamaño superior a $1/1.5 \text{ cm}^2$)

Los animales se sacrificaron en cámara de CO_2 o por dislocación cervical, acorde con los procedimientos aprobados por la Comunidad de Madrid. Posteriormente se realizó a la extracción de la lesión nodular, disecándola de las estructuras circundantes (piel y tejidos blandos). Finalmente se procedió al pesado (expresado en gramos), a la toma de iconografía y a la toma de muestras para congelación y posterior análisis histopatológico.

5.2 Modelo natural en ratón esterilizado quirúrgicamente

La esterilización de los machos y hembras pretende generar un modelo lo más independiente posible de las hormonas sexuales endógenas. No obstante la corteza suprarrenal genera diferentes tipos de hormonas esteroideas, siendo un lugar secundario de una pequeña producción de hormonas sexuales en hembras. Una vez esterilizado el animal, se dejó un periodo de recuperación de 14 días, tras el cual se realizó el xenotrasplante subdérmico. La secuencia de

seguimiento y finalización del este modelo fue igual a la descrita para el modelo natural en ratón adulto (Figura 9).

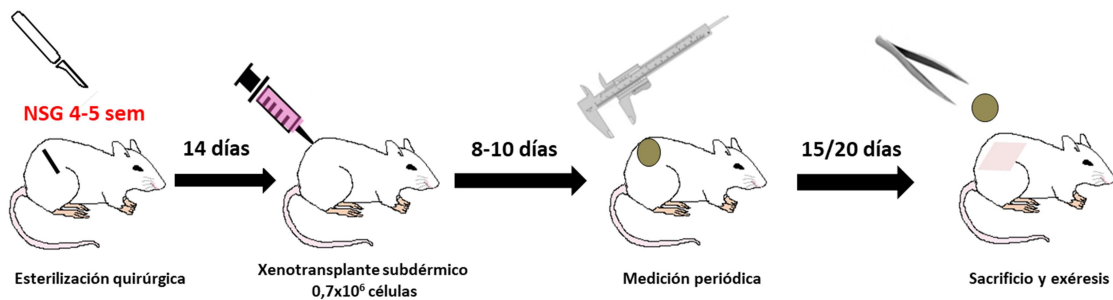


Figura 9: Modelo esterilización quirúrgica: Ratón esterilizado quirúrgicamente antes de alcanzar la madurez sexual/hormonal.

Secuencia temporal, en ratón esterilizado quirúrgicamente antes de alcanzar madurez sexual/hormonal, que comprende el xenotransplante subdérmico realizado durante la edad adulta, el control evolutivo y el sacrificio/extracción tumoral (Criterio finalización: Superar los 20 días o tamaño superior a $1/1.5\text{cm}^2$).

5.2.1 Procedimientos quirúrgicos de esterilización

Los procedimientos quirúrgicos de esterilización se realizaron en cabinas biológicas de seguridad tipo II respetando las normas y protocolos para una adecuada asepsia y antisepsia quirúrgica, acorde con los procedimientos aprobados por la Comunidad de Madrid.

5.2.1.1 Anexectomía

El procedimiento se realizó en ratones de 4/5 semanas de vida, antes de alcanzar la madurez sexual, bajo anestesia general inhalatoria con Sevoflurano (Abbott, EEUU). Tras la desinfección de la piel y, administración de una pequeña dosis (aproximadamente $50\mu\text{l}$) de lidocaína subcutánea sin vasoconstrictor (Ampollas 10 ml al 1%, B Braun) se procedió a la realización de dos pequeñas incisiones cutáneas en la zona dorso-lumbar, para posteriormente proceder a la apertura del plano muscular y peritoneal y acceder a la cavidad localizando el anejo. Una vez eviscerado se procedió a ligar vascularización y oviducto, caudal a su inserción en el útero, logrando así la separación definitiva del ovario. El cierre se realizó por planos con seda de 6/0. Los animales se recuperaron en placas de calor y recibieron analgesia postoperatoria con una dosis de $0.05\text{-}0.1\text{mg/kg}$ e buprenorfina (Indivior, EEUU)

y 30-40mg/kg de ibuprofeno (Fardi, España) disuelta en el agua durante 3 días mínimo, acorde con los procedimientos aprobados por la Comunidad de Madrid.

5.2.1.2 Orquiectomía

El procedimiento se realizó igualmente en ratones de 4/5 semanas de vida, antes de alcanzar la madurez sexual, bajo anestesia general inhalatoria con Sevoflurano (Abbott, EEUU). Tras la correspondiente desinfección de la piel y, administración de una pequeña dosis (aproximadamente 50µl) de lidocaína subcutánea sin vasoconstrictor (ampollas 10 ml al 1%, B Braun), se procedió a la realización de una incisión ventral y transversal que permite acceder a la cavidad peritoneal. Tras rechazar la vejiga, se exteriorizaron las gónadas y se seccionaron, entre ligaduras, los pedículos vasculares y el conducto deferente. Se procedió al cierre por planos con sutura de seda 6/0. Los animales se recuperaron en placas de calor y recibieron analgesia postoperatoria con una dosis 0.05-0.1mg/kg de buprenorfina (Indivior, EEUU) y 30-40mg/kg de ibuprofeno (Fardi, España) disuelta en el agua durante 3 días mínimo, acorde con los procedimientos aprobados por la Comunidad de Madrid.

5.3 Modelo natural en ratón prepuber

Para el desarrollo de este modelo se emplearon ratones, machos y hembras prepúberes (4 semanas), por tanto este modelo estuvo exento de una influencia hormonal significativa puesto que no existe producción de hormonas sexuales en las gónadas. Puede existir una pequeña síntesis de esteroides con actividad sexual en la corteza suprarrenal. La secuencia de xenotransplante de este modelo, así como el seguimiento y finalización del modelo fue igual a la descrita para el modelo natural en ratón adulto (Figura 10).

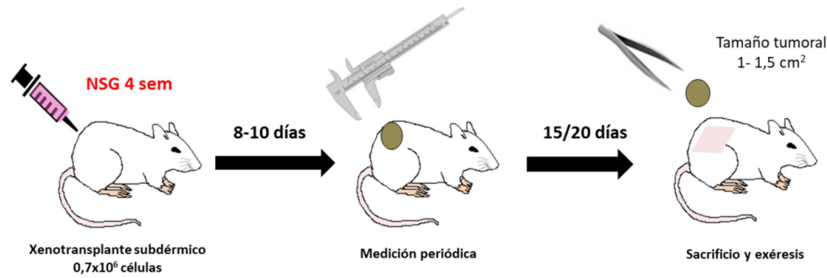


Figura 10: Modelo natural en ratón prepuber (previo a alcanzar madurez sexual: Ausencia hormonas sexuales).

Secuencia temporal, en ratón prepuber (inmadurez hormonal), que comprende el xenotransplante subdérmico, el control evolutivo, el sacrificio/extracción tumoral (criterio de punto final: Superar los 20 días o tamaño superior a $1/1,5\text{cm}^2$)

6 MODELOS MURINOS DE GENERACIÓN Y SEGUIMIENTO DE TUMORES EN AMBIENTES HORMONALES CONTROLADOS

Para poder controlar el ambiente hormonal en el que se implantaba y desarrollaba la lesión tumoral diseñamos diferente modelos naturales y de esterilización quirúrgica. Estos procedimientos se realizaron en la 4/5 semana de vida del animal. Antes de comenzar con la administración hormonal o el xenotransplante subdérmico, se dejó un periodo de recuperación de 14-15 días. Los xenotransplantes se realizaron con las líneas celulares tumorales BLM y SK-MEL-103 (Figura 11).

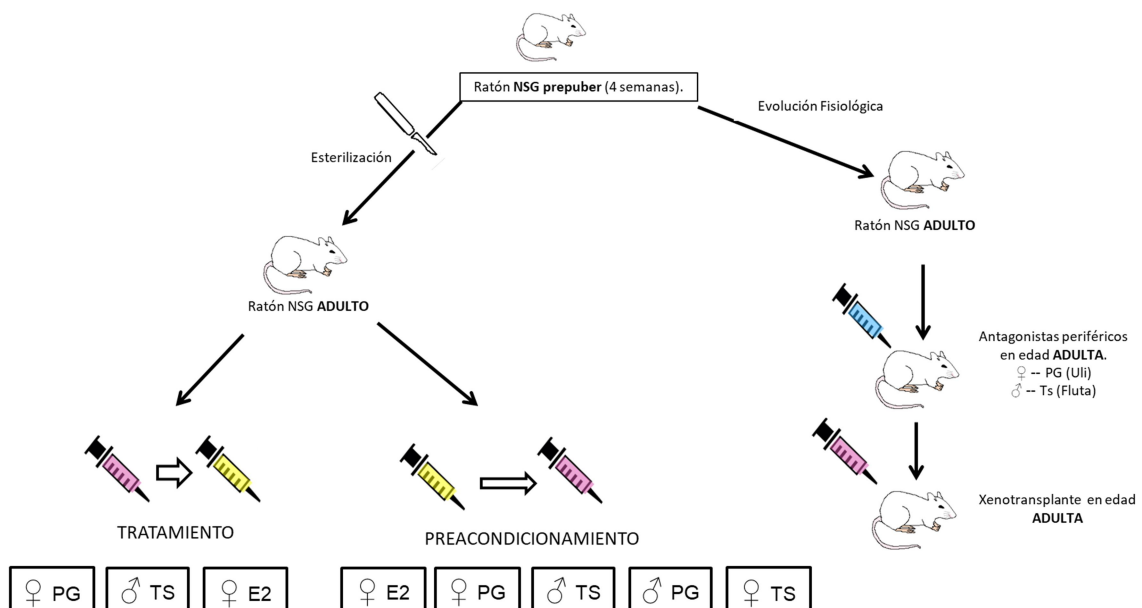


Figura 11. Modelos murinos de generación y seguimiento de tumores en ambientes hormonales controlados.

PG: Progesterona, Uli: Acetato Ulipristal, Ts: Testosterona, Fluta: Flutamida. E2: Estradiol

6.1 Modelos hormonales controlados

6.1.1 Modelo tratamiento

El modelo **tratamiento** se caracteriza por la esterilización quirúrgica del animal y la administración de la hormona seleccionada *después* del xenotransplante subdérmico.

Se realizó la esterilización quirúrgica en la 4/5 semana de vida, como se ha descrito previamente y pasado el tiempo de recuperación, se procedió al xenotransplante subdérmico con 0.7×10^6 células/ratón. 48 horas después se inició la administración subcutánea del compuesto hormonal seleccionado (estradiol, testosterona o progesterona), que se repitió cada 4 días. La secuencia de seguimiento y finalización del este modelo fue igual a la descrita para el modelo natural en ratón adulto. El criterio finalización fue superar los 20 días o un tamaño tumoral superior a $1/1,5\text{cm}^2$ (Figura 12).

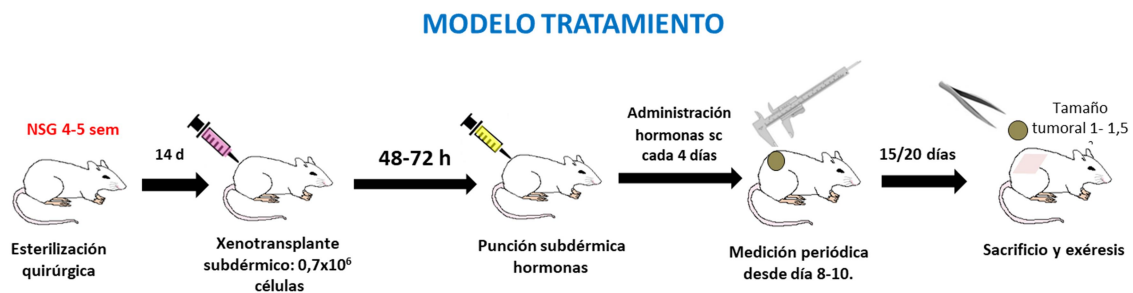


Figura 12: Modelo esterilización quirúrgica y tratamiento hormonal: Ratón esterilizado quirúrgicamente antes de alcanzar la madurez sexual/hormonal, administrando el compuesto hormonal tras el xenotransplante subdérmico.

Secuencia temporal en ratón esterilizado quirúrgicamente antes de alcanzar madurez sexual/hormonal. Tras 14 días de recuperación se realiza el xenotransplante subdermico y 72 h después se administró, por vía subcutánea, del compuesto hormonal elegido, que se realizará cada 4 días hasta finalizar el experimento. El seguimiento se realiza según protocolo hasta el sacrificio y extracción tumoral (Criterio finalización: Superar los 20 días o tamaño superior a $1/1,5\text{cm}^2$)

Éste modelo presenta tres escenarios diferentes:

6.1.1.1 Machos recibieron testosterona

6.1.1.2 Hembras recibieron estradiol

6.1.1.3 Hembras recibieron progesterona.

6.1.2 Modelo precondicionamiento

El modelo **preacondicionamiento** se caracteriza por la esterilización quirúrgica del animal y la administración de la hormona seleccionada *antes* del xenotransplante subdérmico.

Se realizó la esterilización quirúrgica en la 4/5 semana de vida, como se ha descrito previamente y, pasado el tiempo de recuperación post esterilización quirúrgica (14/15 días) se inició la administración subcutánea del compuesto hormonal elegido. 48 horas más tarde se realizó el xenotransplante subdérmico con 0.7×10^6 células/ratón. La administración hormonal se realizó cada 4 días. La secuencia de seguimiento y finalización del este modelo fue igual a la descrita para el modelo natural en ratón adulto. El criterio finalización fue superar los 20 días o un tamaño tumoral superior a $1/1,5\text{cm}^2$ (Figura 13).

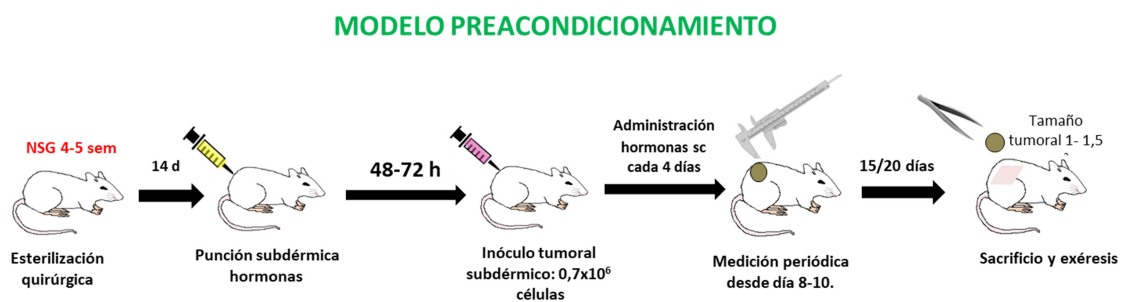


Figura 13: Modelo esterilización quirúrgica y preacondicionamiento hormonal: Ratón esterilizado quirúrgicamente antes de alcanzar la madurez sexual/hormonal, administrando el compuesto hormonal antes del xenotransplante subdérmico.

Secuencia temporal en ratón esterilizado quirúrgicamente antes de alcanzar madurez sexual/hormonal. Tras 14 días de recuperación se inicia la administración, por vía subcutánea, el compuesto hormonal elegido. 72h después se realizó el xenotransplante subdermico. La administración del compuesto hormonal se realizará cada 4 días hasta finalizar el experimento. El seguimiento se realiza según protocolo hasta el sacrificio y extracción tumoral (Criterio finalización: Superar los 20 días o tamaño superior a $1/1,5\text{cm}^2$)

Las combinaciones de sexo y compuestos hormonales dió lugar a dos ESCENARIOS:

6.1.2.1 Combinación de sexos/hormonas **sintónica**

Los animales recibieron preacondicionamiento hormonal con las hormonas dominantes en su sexo.

a. Hembras recibieron progesterona

b. Hembras recibieron estradiol

c. Machos recibieron testosterona

6.1.2.2 Combinación de sexos/hormonas **inversa**

Los animales recibieron precondicionamiento con las hormonas no dominantes en su sexo.

a. Machos recibieron progesterona

b. Hembras recibieron testosterona

6.1.3 Modelo natural en presencia de bloqueo periférico de receptores de hormonas sexuales

Se caracteriza por la administración subdérmica de un antagonista periférico de los receptores de progesterona y testosterona, *antes* del xenotransplante subdérmico. No se realiza esterilización quirúrgica.

Para el desarrollo de este modelo se emplearon ratones machos y hembras adultos (8 semanas), a los que se les administró, por vía subdérmica, un antagonista de los receptores periféricos de las hormonas sexuales según su sexo:

- Machos: Flutamida (Sigma, EEUU): La flutamida es un antiandrógeno puro no esteroideo, sin actividad progestagénica, androgénica intrínseca, estrogénica o glucocorticoide. Desplaza al andrógeno de su receptor impidiendo su acción. Adicionalmente, la flutamida disminuye la secreción de andrógenos suprarrenales (dehidroepiandrosterona sulfato y androstenodiona) por inhibición secundaria del eje regulador dependiente de ACTH.
- Hembras: Acetato de Ulipristal (Sigma, EEUU): Se trata de un compuesto con estructura tipo esteroide que actúa como modulador selectivo de los receptores de progesterona con efectos inhibitorios. Presenta escasa actividad sobre los receptores de andrógenos o de otros esteroides y su paso por el hígado genera metabolitos hepáticos activos.

El antagonista periférico fue administrado 72 horas antes del xenotransplante y se continuó administrando cada 4 días. El protocolo que involucra el

xenotransplante, seguimiento y finalización del experimento es el mismo que se ha descrito para el modelo natural en ratón adulto (Figura 14).

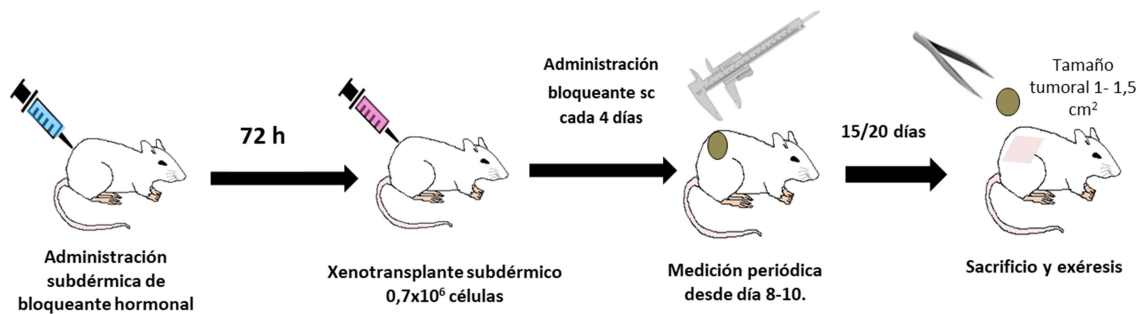


Figura 14: Modelo natural en ratón adulto en presencia de bloqueo farmacológico.

Secuencia temporal, en ratón adulto, que comprende la administración de un antagonista periférico de los receptores de testosterona (flutamida) en machos y de progesterona (acetato de ulipristal) en hembras, 72 horas antes del xenotransplante subdérmico. No se realiza esterilización quirúrgica. Los antagonistas se administran por vía subcutánea cada 4 días hasta el sacrificio/extracción tumoral (criterio de punto final: Superar los 20 días o tamaño superior a 1/1, cm²).

6.2 Preparación y administración de hormonas y antagonistas periféricos

La administración de estradiol, progesterona, testosterona, flutamida y acetato de ulipristal se realizó disolviéndolas en 200µL de aceite de sésamo (Sigma Aldrich, EEUU) por vía subcutánea con una aguja de 25G (0,5x16mm).

6.2.1 Hormonas sexuales

La elección de la dosis hormonal administrada se realizó atendiendo a la experiencia previa del grupo investigador y tuvo como marco de referencia los trabajos realizados sobre las equivalencias: dosis subcutánea administrada, concentración plasmática obtenida y efectos fisiológicos observados. Se buscó alcanzar concentraciones en el umbral fisiológico en plasma:

- La dosis subcutánea 0,04 mg de estradiol (Merck, EEUU), produjo una concentración en suero (~250pg/ml) en torno al valor del pico fisiológico propio de la fase folicular o estro en ratones (100-200pg/ml) (Paharkova-Vatchkova, Maldonado, and Kovats 2004; Mao et al. 2005) y se observó en las ratonas las características histológicas propias de la fase folicular en la vagina: células epiteliales poligonales, ausencia de neutrófilos,

queratinización y del epitelio vaginal, etc. (Sandra Lasarte et al. 2016; Salinas-Muñoz et al. 2018; Relloso et al. 2012).

- La dosis subcutánea 0,4mg de progesterona (Merck, EEUU), produjo una concentración en suero (~5pg/ml) entorno a al valor pico fisiológico 5-20 ng/ml (Mao et al. 2005; Sandra Lasarte et al. 2016) de la fase lútea o metaestro. Además, observamos que esta dosis también producía los efecto propios del metaestro en la vagina de las ratonas, células epiteliales redondas, neutrófilos, epitelio sin queratinizar, etc (Relloso et al. 2012; Sandra Lasarte et al. 2016; Salinas-Muñoz et al. 2018).
- La dosis subcutánea 0,4mg de testosterona (Merck, EEUU) produjo una concentración de testosterona en suero entorno a al valor pico fisiológico 5-15ng/ml (Mao et al. 2005; Paharkova-Vatchkova, Maldonado, and Kovats 2004).

6.2.2 Antagonistas periféricos de las hormonas sexuales

La dosis de flutamida y acetato de ulipristal se seleccionó en concordancia con las dosis de hormonas sexuales descritas previamente. Considerando la dificultad técnica que entraña la medición de los niveles plasmático en el ratón, se optó por emplear una dosis elevada y realizar un estudio de toxicidad celular *in vitro*.

6.2.2.1 Estudio toxicidad *in vitro* sobre células tumorales.

En placa P12 se depositó una concentración de 1×10^5 células/ pocillo y se incubaron *in vitro* durante 72 horas a 37°C en medio RPMI + FBS 1% con las concentraciones seleccionadas de antagonistas. El compuesto, acetato de ulipristal (Sigma Aldrich), y flutamida (Sigma Aldrich), se dispensa en forma de polvo que se disolvió en etanol absoluto para generar una solución stock 0.01M. A partir de dicha solución se realizaron las diluciones apropiadas para obtener tanto una concentración estimada fisiológicas (1×10^{-8} M) como unas infra (10^{-9} M y 10^{-10} M) y suprafisiológicas (10^{-7} M). Los pocillos control sólo llevaron la cantidad correspondiente de etanol. Tras 72 horas de incubación se procedió al lavado, despegado y centrifugado, para posteriormente realizar el conteo en el citómetro Gallios (Beckman Coulter, Brea, EEUU) usando como patrón las Flow-Count fluorospheres (Beckman, EEUU) acorde con las

instrucciones del proveedor. El análisis de los datos se realizó con el software FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, Oregón, EEUU).

7 MODELO DE GENERACIÓN DE ENFERMEDAD METASTÁSICA SISTÉMICA

7.1 Modelo progresión natural

El procedimiento de generación de metástasis sistémicas atendiendo a *progresión natural* simula el curso habitual de una situación clínica: El tumor comienza su desarrollo y durante el mismo adquiere capacidad invasiva y alcanza otros órganos por vía sanguínea, en el caso de melanoma, pulmón, hígado y cerebro.

Se emplearon ratones a los que les realizó el xenotransplante subdérmico en condiciones hormonales controladas (modelo tratamiento o preacondicionamiento sintónico). Se usó la línea celular BLM (Figura 15).

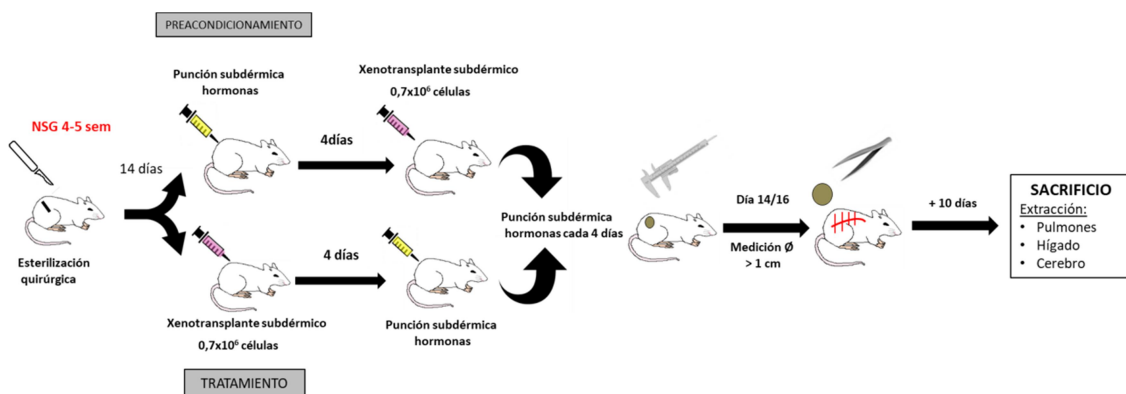


Figura 15: Modelo generación metástasis sistémicas por vía natural.

Ratones machos y hembras esterilizados quirúrgicamente en edad prepuber. Tras 14 días recuperación se les incorpora a un modelo de generación de tumores en ambientes hormonales controlados: xenotransplante subdérmico en modelo tratamiento o preacondicionamiento. Cuando la lesión tumoral adquiere un diámetro entorno a 1cm^2 , se procede la exéresis R0. 10 días después se finaliza el experimento.

Se realizó seguimiento evolutivo periódico del crecimiento de la lesión nodular tumoral. Aproximadamente en día 14/16 post xenotransplante, y con un tamaño de la lesión en torno a 1cm^2 (Figura 16A), se procedió a realizar la exéresis del tumor primario sin dejar residuo tumoral macroscópico, resección R0.

La intervención se realizó de manera muy similar a las descritas previamente: Anestesia general inhalatoria con Sevoflurano (Abbott, EEUU), anestesia local con Lidocaina (Braun, EEUU) y en adecuadas condiciones de asepsia y antisepsia en cabinas de bioseguridad tipo II. La exéresis del tumor primario requirió la extirpación de la piel suprayacente y los tejidos profundos que hubiesen sufrido infiltración macroscópica, procediéndose a su reparación o cierre con suturas de seda de 6/0 (Figura 16B y 16C). Los animales se recuperaron en placas de calor y recibieron analgesia postoperatoria con una dosis de 0.05-0.1mg/kg buprenorfina (Indivior, EEUU) y 30-40mg/kg de ibuprofeno (Fardi, España) disuelta en el agua, durante 3 días mínimo acorde con los procedimientos aprobados por la Comunidad de Madrid.

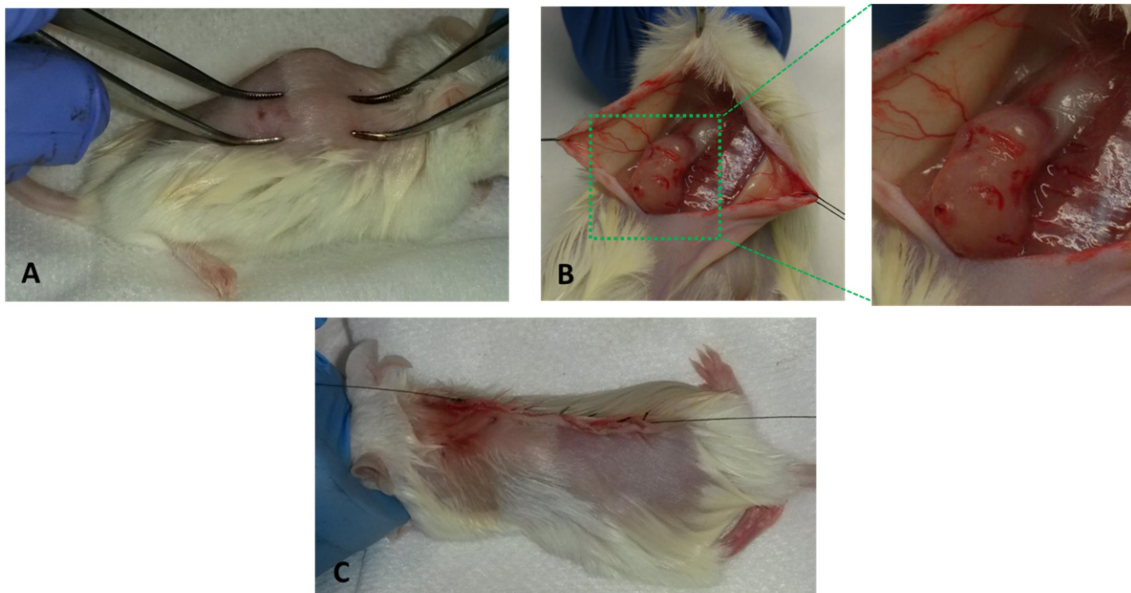


Figura 16: Procedimiento quirúrgico de exéresis del tumor primario y reconstrucción.

Línea celular: BLM.

A: Lesión tumoral en día 14/16 (0.5x1cm) ubicada sobre dorso del animal.

B: Tras la exéresis de piel suprayacente se observa la lesión nodular que será extirpada completamente (resección R0).

C: Reconstrucción de la pared tras exéresis de la lesión tumoral.

Cuando la lesión tumoral adquiere un diámetro en torno a 1 cm, se procede la exéresis R0. 10 días después se finaliza el experimento.

La administración hormonal continuó con la misma periodicidad y, en día 20º postxenotransplante tumoral se decidió finalizar el experimento. Los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂ o por dislocación cervical, acorde con los procedimientos aprobados por la Comunidad de Madrid. Los animales que

presentaron recidivas macroscópicas fueron desechados del experimento. Posteriormente se realizó la extracción de los órganos diana: pulmón, cerebro e hígado y se realizó contaje manual de las metástasis (Figura 17). Los órganos fueron fijados con líquido de Bouin (Panreac® 254102.1611, España). Se seleccionaron muestras para congelación y se realizó la toma de iconografía.

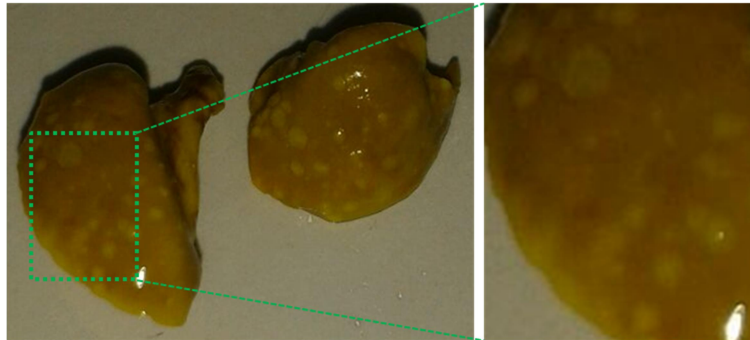


Figura 17: Pieza de neumonectomía tras finalización del experimento.
Punteado blanco: metástasis.
Línea celular de melanoma humano: BLM

7.2 Modelo intravenoso

Para estudiar la implantación tumoral a distancia usamos el modelo de inducción de tumores intravenoso. Se introducen las células tumorales directamente en el torrente sanguíneo, reduciendo así el tiempo respuesta que le otorga al sistema inmune, el modelo natural y pudiendo investigar el efecto hormonal sobre el futuro lecho tumoral metastásico (Figura 18).

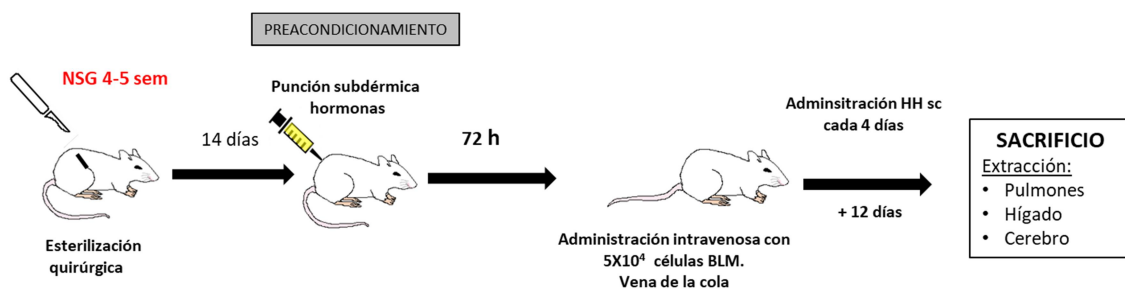


Figura 18: Modelo generación metástasis sistémicas por vía intavenosa.

Ratones machos y hembras esterilizados quirúrgicamente en edad prepuber. Tras 14 días recuperación se les incorpora al modelo de generación de tumores en ambientes hormonales controlados: xenotransplante subdérmico en preacondicionamiento.

A las 72 horas de la administración subcutánea de los compuestos hormonales, se inyectan por vía intravenosa 5×10^4 células tumorales.

Se empleó el mismo protocolo de esterilización quirúrgica descrito y, tras las dos semanas de recuperación se realizó la administración hormonal subcutánea atendiendo al modelo de precondicionamiento (modelo precondicionamiento sintónico). Se inyectó a los ratones la línea celular BLM en dos dosis 25.000 y 100.000 células por ratón, en la vena de la cola, empleando una aguja de 25G bajo sedación del animal. La administración hormonal subcutánea continuó cada 4 días, según protocolo y se detuvo el experimento en día 14 postpunción. Se procedió a la extracción de hígado, pulmones y cerebro, realizándose conteo manual de las metástasis macroscópicas visibles en la superficie de los órganos. Los órganos fueron fijados con líquido de Bouin (Panreac® 254102.1611, España) Se seleccionan muestras para congelación y se realiza la toma de iconografía.

8 ESTADÍSTICA

El test utilizado para determinar la significación entre grupos en cada experimento se describe en la leyenda de cada figura. Los cálculos para obtener la significación de los resultados se realizaron con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, USA). ANOVA (tratamiento contra tiempo) se hizo con el IBM SPSS Statistics para Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp. Se consideró estadísticamente significativo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

RESULTADOS

OBJETIVO 1: *Evaluar el efecto del sexo sobre el desarrollo del melanoma cutáneo en un modelo de ratón*

1.1 MODELO NATURAL EN RATÓN NSG ADULTO

Los estudios epidemiológicos y clínicos han constatado en repetidas ocasiones que las mujeres, a igualdad de estadio tumoral, tienen mejor pronóstico oncológico que los hombres. La implicación clínica de este dato es de suma importancia pues, los mecanismos implicados, podrían tener rentabilidad terapéutica. A lo largo del tiempo se han elaborado múltiples teorías para tratar de explicar este fenómeno (ver Introducción: 3.1 Posibles hipótesis responsables de la diferencia en pronóstico oncológico entre hombres y mujeres) pero hay escasas demostraciones experimentales que aborden este problema.

Con el fin de poder investigar sobre sus causas y pormenorizar en nuestra hipótesis de trabajo, el primer paso fue diseñar un modelo de trabajo en animal de experimentación y seleccionar una línea celular tumoral humana, de cara a buscar la máxima traslacionalidad de los resultados obtenidos. Seleccionamos melanoma humano por la experiencia clínica y experimental del grupo investigador y su interés en el desarrollo de nuevos conocimientos y terapias. El animal de experimentación seleccionado fue el ratón NSG como candidato óptimo para el fructífero desarrollo de un xenotransplante (ver Material y Métodos: 1 Ratones).

El primer objetivo fue evaluar si el modelo, en condiciones naturales, reproduciría los datos clínico/epidemiológicos. Para ello usamos ratones machos y hembras adultos (8 semanas, madurez hormonal sexual) a los que realizamos un xenotransplante con células humanas de melanoma, de la línea BLM. Se realizó un seguimiento cronológico del desarrollo tumoral y un registro de las medidas de la lesión tumoral, con una periodicidad de 48 horas, desde el momento en el que la lesión nodular fue accesible a ello, lo que suele suceder entorno a 10^o día postxenotransplante. Precozmente, en 12^o día postxenotransplante, se observó que las lesiones tumorales de los machos eran significativamente mayores que las de las hembras. Tales diferencias se mantuvieron estables durante la parte central del experimento, tendiendo a atenuarse en torno al día 18 (~50% en día 12, ~40% en día 14, ~30% en día 17 y ~10% en día 18) momento en el cual finalizó el experimento (Figura 19A).

Con vistas a pormenorizar en la diferencia observada en el tamaño y, a la obtención de muestras, se realizó un análisis ponderal de los tumores en diferentes momentos del desarrollo. En 12º día postxenotransplante, en el que la diferencia en tamaño tumoral rondaba el 50%, se observó que el peso del tumor de los machos era significativamente superior (~90%) al de las hembras (Figura 19B). Sin embargo, en 18º día postxenotransplante, en el que las diferencias en tamaño prácticamente habían desaparecido, los tumores de los machos continuaban siendo, aproximadamente, un 30% más voluminosos que los de las hembras (Figura 19C y D).

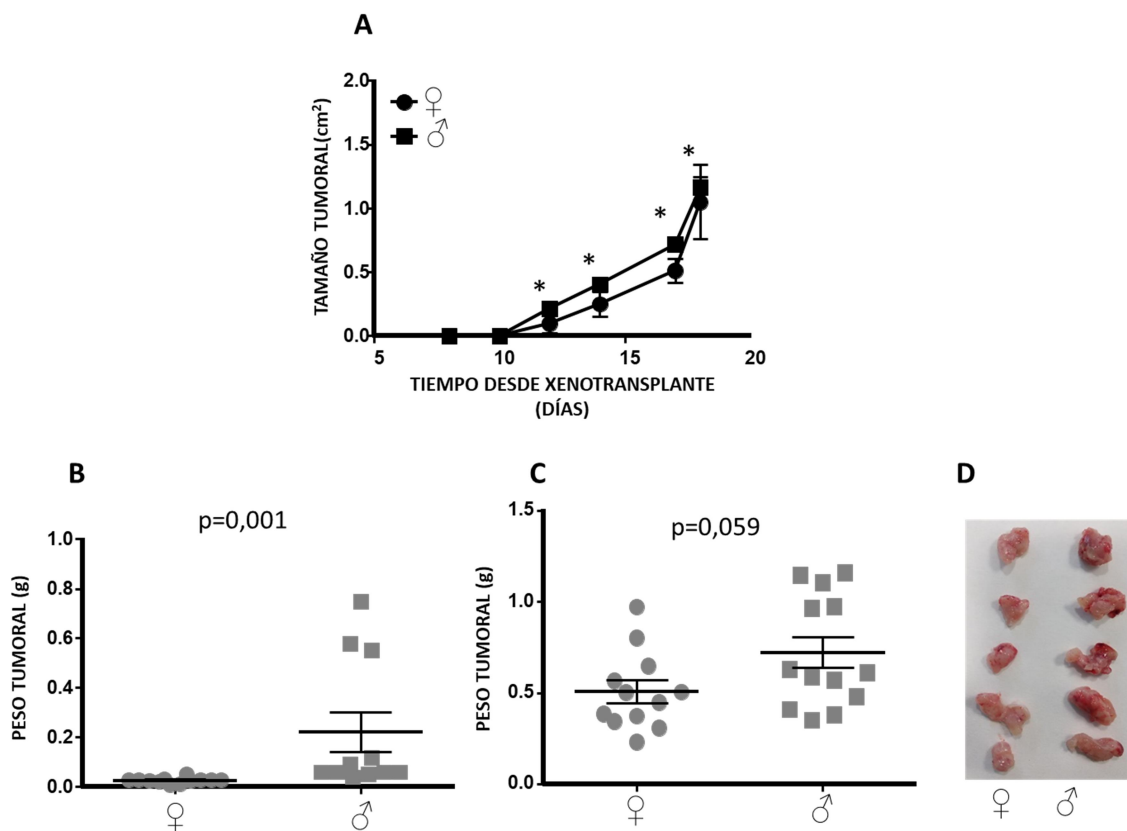


Figura 19: Modelo natural en ratón adulto.

Xenotransplante subdérmico con la línea celular de melanoma humano **BLM**.

A: Seguimiento cronológico de la evolución del tamaño tumoral desde la detección de una lesión nodular (aprox. día 8-10), hasta la finalización del experimento. *= $p < 0,05$ por regresión lineal.

B: Diferencia en peso tumoral a día 12 postxenotransplante. p test de Mann Whitney.

C: Diferencia en peso tumoral a día 20 postxenotransplante. p test de Mann Whitney.

D: Imagen morfológica de las lesiones tumorales a día 20.

Así pues, el modelo murino con células de melanoma humano, reprodujo unas diferencias en desarrollo tumoral que se podrían ser correlacionar con las

observadas en pronóstico oncológico entre hombres y mujeres, haciéndolo, por tanto, un modelo apto para el continuar con el estudio de investigación.

1.2 MODELO ESTERILIZACIÓN QUIRÚRGICA: RATÓN ESTERILIZADO QUIRÚRGICAMENTE ANTES DE ALCANZAR LA MADUREZ SEXUAL/HORMONAL

El origen de la diferencia en el pronóstico tumoral, y su mecanismo, no está definido. El impacto de los modos de vida y formas de afrontar la salud entre sexos ha sido descartado como causa y se postulan determinantes hormonales y/o genéticos. Las hormonas sexuales son un factor diferenciador entre sexos y existe constancia del condicionamiento que éstas implican en la fisiopatología de múltiples enfermedades, incluido el cáncer (Clocchiatti et al. 2016).

Por este motivo decidimos estudiar la repercusión de las hormonas sexuales sobre la progresión de la enfermedad tumoral y si éstas podrían ser uno de los factores implicados en la disparidad observada entre los sexos.

Para desarrollar este objetivo planificamos un escenario en el que su efecto hormonal estuviese excluido de forma artificial. Se realizó la esterilización quirúrgica de los machos y hembras en edad prepuber (4-5 semanas) y se realizó el xenotransplante durante la edad adulta (8 semanas). El protocolo de seguimiento y medición fue idéntico al descrito previamente.

Observamos que, en ratones esterilizados, la diferencia en tamaño, quedó amortiguada durante toda la secuencia. De igual forma que antes se realizó un análisis ponderal en un punto intermedio (día 14 postxenotransplante) y, asimismo, se constató la ausencia de diferencia estadísticamente significativa (figura 20A y B). Sin embargo, es notorio reseñar que, las hembras muestran cierta tendencia a presentar tumores ligeramente más grandes en el tercio medio del experimento, así como un peso ligeramente mayor, pero ambos datos carecen de significación estadística.

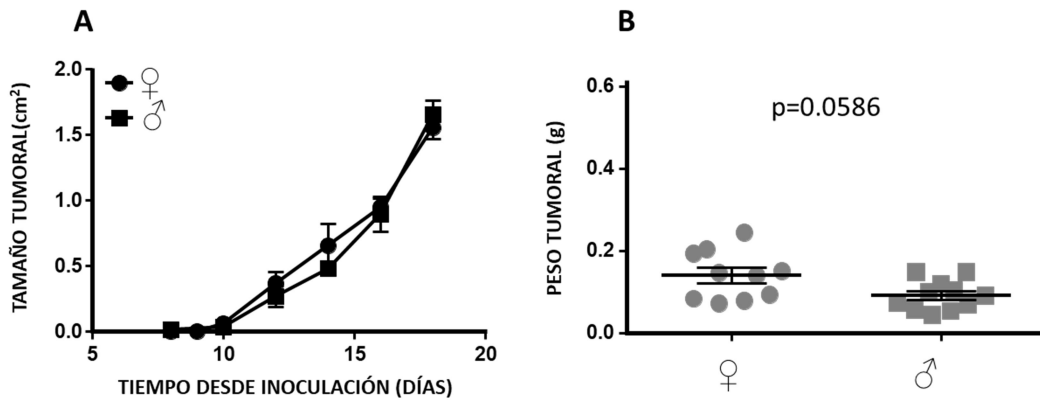


Figura 20: Modelo esterilización quirúrgica.

Xenotransplante subdérmico, en ratón esterilizado quirúrgicamente antes de alcanzar la madurez sexual/hormonal, con la línea celular de melanoma humano **BLM**.

A: Seguimiento evolutivo del tamaño tumoral, desde la detección de una lesión nodular (aprox. día 8-10), hasta la finalización del experimento. $*=p<0,05$ por regresión lineal respecto al tiempo.

B: Diferencia en peso tumoral a día 14 post inóculo. p test de Mann Whitney.

La desaparición de las diferencias en las curvas evolutivas y en el peso tumoral tras dejar a los animales en cuasi ausencia de hormonas sexuales, sugirió fuertemente un nexo causal.

1.3 MODELO NATURAL EN RATÓN PREPUBER

El experimento previó evidencio un nexo causal entre la diferente progresión tumoral entre sexos y las hormonas sexuales. La interrelación tumor-huésped es extremadamente compleja y algunos trabajos han señalado que ésta podría estar determinada, en parte, por factores no modificables atribuibles a la carga genética. De hecho, y a modo de ejemplo, varios trabajos han señalado que las diferencias en la respuesta inmune entre hombre y mujeres están presentes desde el momento del nacimiento hasta la muerte y que está condicionada por la diferente carga genética (Klein and Flanagan 2016).

Con objetivo de explorar el grado de participación de este condicionante genético sobre la diferencia observada previamente y, adicionalmente, incrementar la consistencia de nuestra hipótesis hormonal en el ámbito oncológico, planteamos un escenario en el que la implantación tumoral se produjese en un ratón prepuber. De esta forma sería posible observar la implantación y desarrollo tumoral en un modelo que fisiológicamente carece de hormonas, con lo que los determinantes genéticos adquirirían un mayor

protagonismo y podríamos evaluar si generarían un sesgo importante sobre experimentos venideros.

El xenotransplante se realizó en la cuarta semana de vida, unos días después del destete, y finalizó en 12º día postxenotransplante con el fin de evitar el efecto de las hormonas sexuales. Como puede observarse en la figura 21, no se detectaron diferencias en el peso tumoral entre machos y hembras.

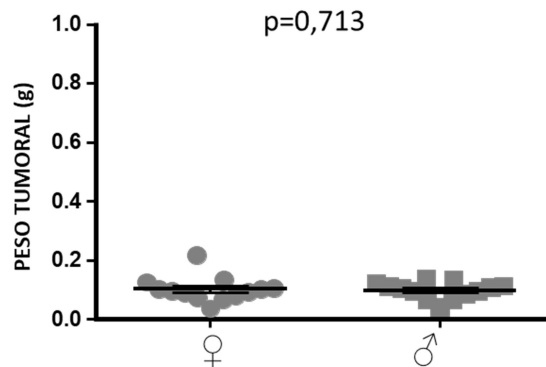


Figura 21: Modelo natural en ratón prepuber.

Xenotransplante subdérmico, en ratón no esterilizado y en ausencia de hormonas sexuales por inmadurez sexual, con la línea celular de melanoma humano **BLM**.

Diferencia en **peso tumoral a día 12** post inóculo.

p test de Mann Whitney.

Este resultado, sumado al observado con animales esterilizados, permitió reafirmar la importancia de hipótesis hormonal. Sin embargo, también es cierto que resulta difícil excluir completamente otros factores dado que, el corto lapso de tiempo en el que se desarrolla este experimento (evitar que los ratones entren en la pubertad) puede no ser suficiente para la complejidad que supone la interrelación tumor/huésped.

En resumen, considerando esta secuencia de experimentos y, el cambio observado tras eliminar las hormonas sexuales, sería coherente postular que las hormonas sexuales participan de forma determinante en la diferencia observada en desarrollo tumoral entre sexos y podrían ser las responsables del mejor pronóstico mostrado por el sexo femenino en melanoma (Figura 22).

OBJETIVO 2: *Evaluar el efecto de las hormonas sexuales sobre las células tumorales*

Los trabajos realizados sobre el objetivo previo nos dejaron en la siguiente situación: Las hembras presentan un desarrollo tumoral más lento y sus tumores son más pequeños respecto a los machos. Esta diferencia parece estar condicionada, en gran medida, por las hormonas sexuales.

La influencia directa de las hormonas sexuales, a través de sus receptores celulares específicos, sobre el crecimiento de las células tumorales no es un hecho novedoso. Es conocida la dependencia hormonal ejercida sobre las células tumorales de lesiones que afectan a órganos reproductores: glándula mamaria, ovario, endometrio o próstata por ejemplo (Folkerd and Dowsett 2010). De hecho, los fármacos que bloquean los receptores para estrógenos, progesterona o testosterona, se emplean como terapia adyuvante o definitiva en múltiples situaciones (Bui et al. 2020; Zhu et al. 2012). Pero también se ha observado en las células tumorales de órganos no reproductores. Por ejemplo los estrógenos promueven el crecimiento de algunas líneas celulares de carcinoma epidermoide de esofago a través de GPER1 o de ESR1-36, mientras que el estímulo de ESR2, es supresor (Z. Zhang et al. 2017).

Melanoma cutáneo ha sido considerado clásicamente un tumor independiente de hormonas sexuales aunque es conocido que, al menos algunas líneas celulares, pueden expresar receptores para estrógenos, progesterona y testosterona. Por otro lado existen, de forma dispersa, una significativa cantidad de estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales, publicados a lo largo de una considerable horquilla de tiempo y con resultados dispares, que podrían sugerir que melanoma cutáneo siendo hormono independiente, sí podría ser hormono sensible (Ramaraj 2018).

Considerando estos hechos, hipotetizamos que el efecto de las hormonas sobre el tumor pudiera ser debido a que éstas afectasen directamente al crecimiento de la célula tumoral humana. Con el objetivo de evaluar la influencia de las hormonas sexuales sobre el crecimiento de las líneas celulares con las que estábamos trabajando diseñamos una serie de experimentos in vitro.

2.1 EXPRESIÓN DE RECEPTORES EN LAS CÉLULAS TUMORALES PARA HORMONAS SEXUALES

El primer planteamiento fue evaluar si las células tumorales expresaban receptores para hormonas sexuales. Para ello se incubaron las células con los anticuerpos receptor específico que fueron descritos previamente (Tabla 2. Apartado 3 Análisis in vitro de la expresión y localización de receptores para hormonas sexuales en las líneas celulares tumorales). Los resultados se obtuvieron tras el análisis de los cultivos por citometría de flujo y microscopía confocal.

Ambas líneas celulares (BLM y SK-MEL-103) expresaron receptores para testosterona (androgen receptor, AR), para progesterona (PGR) y para el receptor alfa de estradiol (ESR1). Las líneas de melanoma que estábamos empleando mostraron expresión alta de todos los receptores hormonales estudiados tanto por citometría de flujo como por microscopía confocal (Figura 23A y B). La expresión de los receptores se localizó en el citoplasma, zona perinuclear, y en el núcleo según lo esperado (Figura 23C).

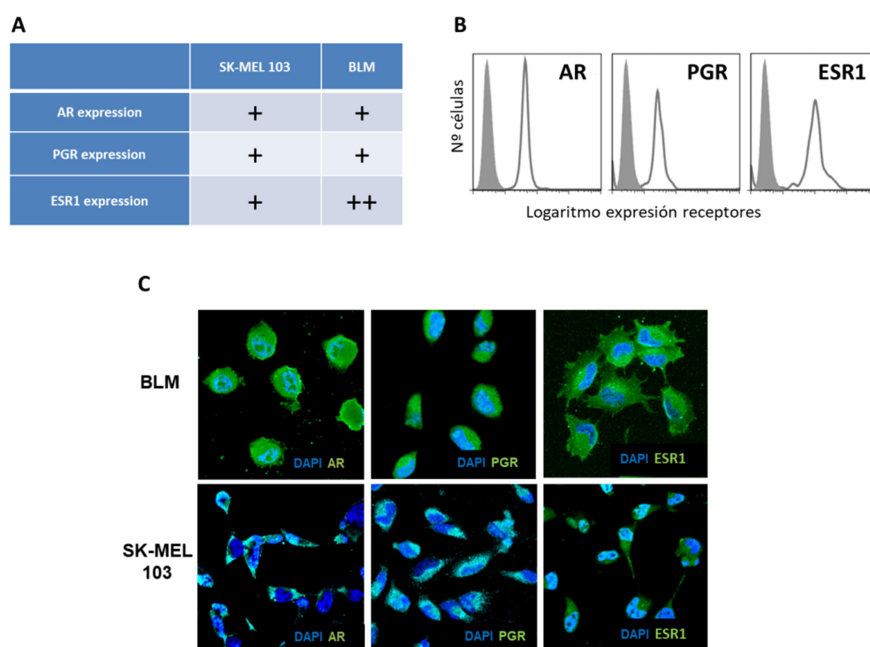


Figura 23. Expresión de receptores intracelulares de hormonas sexuales en las líneas de melanoma humano de BLM y SK-MEL-103.

A: Determinación semicuantitativa por microscopia confocal.

B: Ejemplo de la expresión de receptores de hormonas por citometría de flujo con la línea celular de melanoma humano **BLM**. Gris: isotipo control. Blanco: Receptor indicado.

C: Ejemplo de imágenes de inmunofluorescencia de la expresión de los receptores intracelulares de hormonas sexuales en las líneas celulares de melanoma humano **BLM** y **SK-MEL-103**.

TSR: Receptor testosterona. PR: Receptor de Progesterona. ESR1: Receptor estrógeno 1.

2.2 IMPACTO DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL CRECIMIENTO CELULAR

Una vez demostrada la expresión de receptores para hormonas sexuales por las células tumorales procedimos a valorar el efecto de las mismas sobre el crecimiento in vitro. Tal valoración la realizamos por varios métodos.

2.2.1 Contaje por citometría de flujo

Las células se incubaron con hormonas sexuales durante 72h y después se analizó la tasa de crecimiento mediante contaje del número de células por citometría de flujo. En la planificación de estos experimentos optamos por añadir concentraciones hormonales en rangos superiores e inferiores a las fisiológicas. La figura 24 muestra cómo, ni el crecimiento de BLM ni el de SK-MEL-103 resultó afectado por la presencia de estradiol o testosterona a ninguna de las concentraciones estudiadas. Por otro lado el uso de concentraciones de progesterona 10 veces por encima a la fisiológica redujo la proliferación de las células.

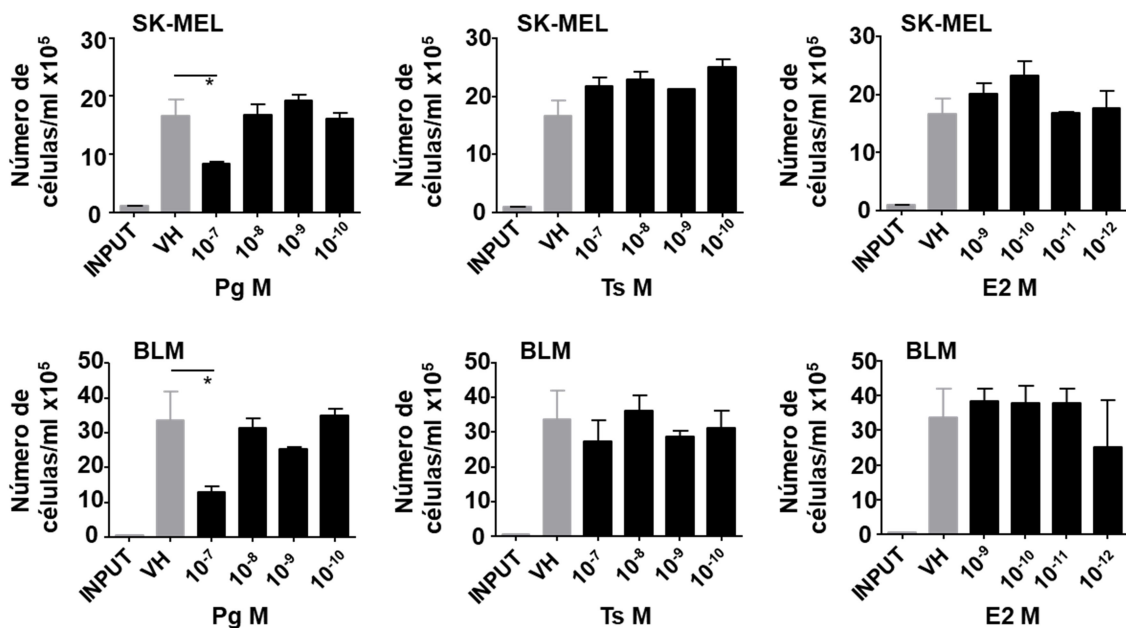


Figura 24: Análisis de la proliferación de las líneas celulares tumorales en presencia de diferentes concentraciones de hormonas realizado mediante el contaje (+SD) por citometría de flujo.

Línea celular de melanoma humano BLM y SK-MEL-103

Vh: Vehículo, Ts: Testosterona, Pg: progesterona, E2: Estradiol.

Input: células de inicio M: molar.

* p < 0.05 por

2.2.2 Valoración del crecimiento por incorporación de BdrU por citometría de flujo

Las células se incubaron con dosis fisiológicas de hormonas por un lapso de 24 horas tras el cual se administró un pulso de BrdU de 4 horas de duración. El objetivo fue valorar el número de células en fase de S del ciclo celular, a través de la incorporación de BdrU en su ADN. El número de células se estimó por citometría de flujo, observándose que, aproximadamente el 40% de las células estaban en fase replicativa. No se observó efecto de las hormonas sobre la incorporación de BrdU en las células (Figura 25).

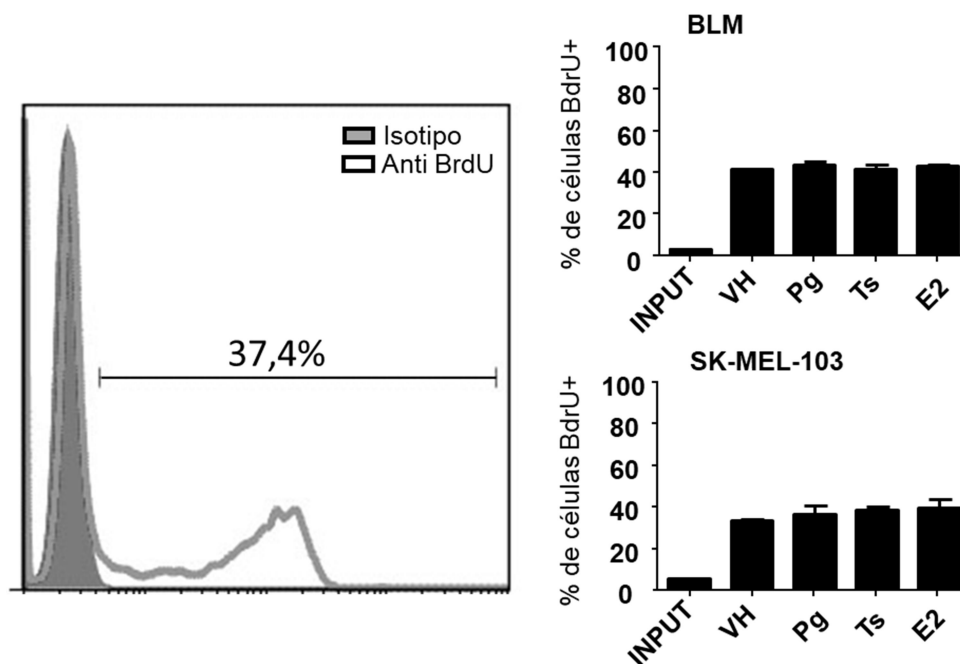


Figura 25: Análisis de la proliferación celular por incorporación de BrdU.

Línea celular de melanoma humano **BLM y SK-MEL-103**

Determinaciones mediante microscopía confocal.

IC: isotipo control, Vh: Vehículo, Ts: Testosterona 10^{-8} M, Pg: progesterona 10^{-8} M, E2: Estradiol 10^{-10} M.

2.2.3 Valoración del crecimiento por incorporación de BdrU por microscopía confocal

Por otro lado, y empleando también la técnica de BdrU, se valoró el número de células en crecimiento por microscopía confocal. Observamos una distribución homogénea de la tinción de BdrU en los núcleos del 35-40% de las células

tumorales y no observamos efecto de las hormonas sobre la incorporación de BrdU a las mismas en las dosis fisiológicas (Figura 26).

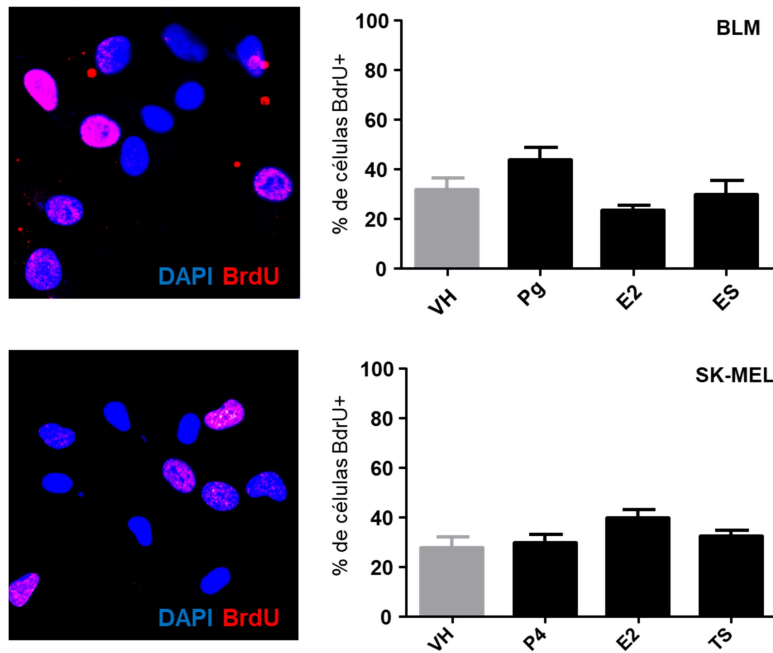


Figura 26: Análisis de la proliferación celular por incorporación de BrdU y determinaciones mediante microscopía confocal.

Línea celular de melanoma humano **BLM y SK-MEL-103**

Vh: Vehículo, Ts: Testosterona 10^{-8} M, Pg: progesterona 10^{-8} M, E2: Estradiol 10^{-10} M.

A la luz de estos resultados pudimos afirmar que el crecimiento de las líneas celulares que estábamos empleando, se mostraba independiente de concentraciones fisiológicas de hormonas sexuales, aunque las mismas presentasen receptores para testosterona, progesterona y estradiol.

OBJETIVO 3: *Evaluar el efecto de las hormonas sexuales sobre el desarrollo tumoral local, sometiendo al modelo animal a diferentes estímulos hormonales controlados*

Los resultados acumulados durante los experimentos previos evidenciaron que el efecto condicionado por las hormonas sexuales sobre el desarrollo tumoral no era por repercusión directa sobre el crecimiento de las células tumorales, por tanto sus efectos tendrían que ser secundarios a las interferencias generadas sobre la interrelación tumor-huésped. De esta forma se generaría un ambiente local favorecedor o inhibidor del desarrollo tumoral.

Los efectos hormonales sobre el desarrollo y evolución tumoral en el ámbito clínico, en ocasiones, no son fáciles de identificar. En el macho resulta fácil suponer que su desventaja oncológica pueda ser secundaria a la testosterona y, de hecho, en la literatura, tiene un papel inmunosupresor (Klein and Flanagan 2016) y se le atribuyen comportamientos protumorales como el estímulo de la angiogénesis (S. Yoshida, Ikeda, and Aihara 2016a; Eisermann and Fraizer 2017). Por el contrario, en hembras, es más complejo ya que en el escenario hormonal conviven dos hormonas sometidas a cambios periódicos, según el ciclo menstrual, o definitivos con la llegada de la menopausia. En este sentido, algunos trabajos han postulado que la ventaja pronóstica de las mujeres se debe al efecto directo del estradiol, ya que durante la menopausia el pronóstico entre hombres y mujeres tienden a equipararse. Por otro lado, algunos trabajos, han encontrado un exceso de riesgo en el desarrollo de melanoma en el subgrupo de pacientes postmenopáusicas suplementadas con pautas basadas exclusivamente en estrógenos, dato que no se observaba en las que recibían terapia combinada con estrógenos y progesterona; de hecho algunos trabajos demuestran que la suplementación en postmenopausia con progesterona natural previene el desarrollo de algunos cánceres (Botteri et al. 2017; Dika et al. 2019).

Con el objetivo de aclarar los efectos individuales de cada hormona sobre el desarrollo tumoral local procedimos a diseñar una serie de modelos, que hormonalmente controlaríamos, y sobre los que podríamos observar su repercusión pro o antitumoral, los denominamos: *Modelos en ambientes hormonales controlados*. La visión general de todos los modelos desarrollados en esta fase se muestra en la figura 27, aunque los motivos y momentos en que aparece cada modelo, se explica a continuación.

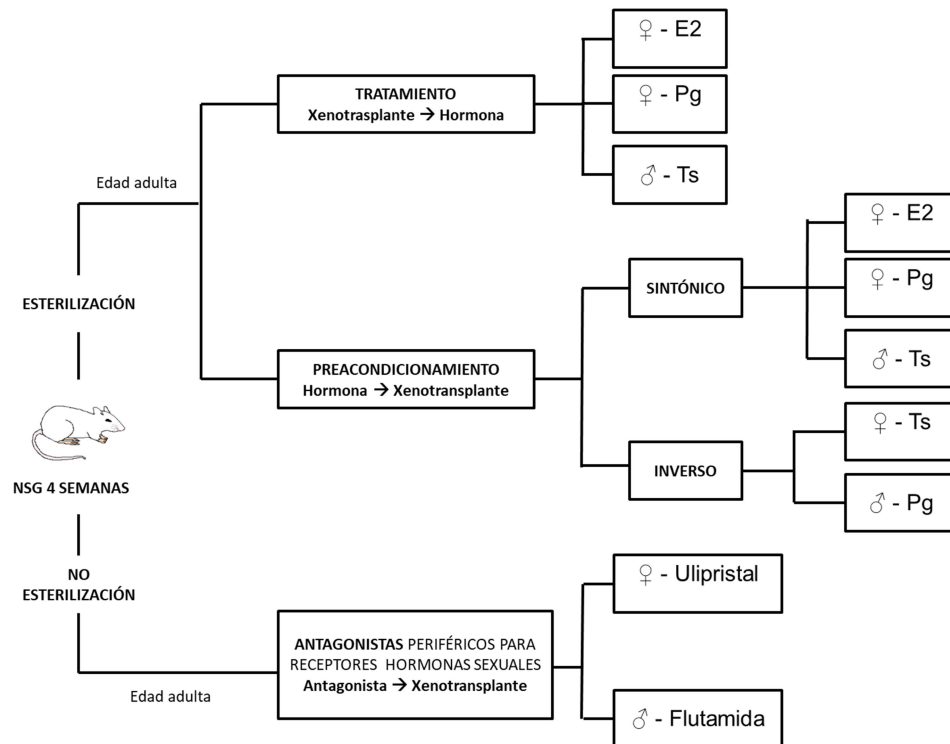


Figura 27: Modelos murinos de generación de tumores y seguimiento en ambientes hormonales controlados.

E2: Estradiol, Pg: Progesterona, Ts: Testosterona. Ulipristal: Acetato de Ulipristal.

3.1 MODELO TRATAMIENTO

Este escenario requirió la esterilización quirúrgica de los ratones y el compuesto hormonal se administró después de la inoculación del xenotrasplante. Correspondería a una filosofía de esquema “tratamiento” de la práctica clínica habitual en el que la medida terapéutica es administrada tras el desarrollo, o primeros síntomas, de la enfermedad y ejerce su efecto simultáneamente al desarrollo de la misma, partiendo en inferioridad de condiciones y tratando de recabar y estimular los recursos de los que dispone el organismo para resolver la patología y volver a la normalidad.

Así pues, tras la esterilización quirúrgica, los animales recibieron sólo un compuesto hormonal por experimento, 72 horas después del xenotrasplante, y se mantuvo, con una periodicidad de 4 días, hasta el final de la secuencia. A las hembras se les administró estradiol o progesterona y a los machos testosterona. El *tratamiento con estradiol* no produjo diferencias entre grupos en cuanto al peso tumoral a los 14 días (Figura 28A), mientras que *con*

progesterona se generaron tumores algo más pequeños (~30%) que los controles, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 28B). Por último, en los machos *tratados con testosterona* y evaluados en 14º día postxenotransplante, se observaron lesiones tumorales de mayor peso (~40%) que los que recibieron vehículo. Estas diferencias no obtuvieron significación estadística, pero quizá sí tiene alguna significación de carácter biológico (Figura 28C).

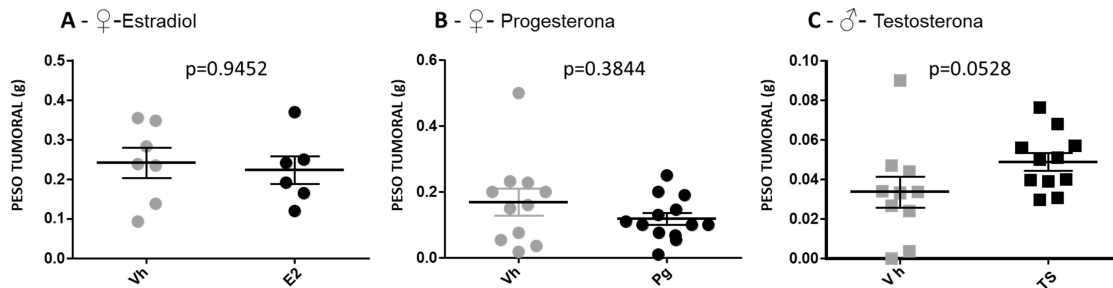


Figura 28: Modelo TRATAMIENTO en ratones machos y hembras adultos esterilizados quirúrgicamente.

Diferencia en **peso tumoral a día 14** postxenotransplante.

Línea celular empleada: Melanoma humano **SK-MEL-103**.

72 horas después del xenotransplante subdérmico se inicia la administración, por vía subcutánea de:

A: Estradiol.

B: Progesterona.

C: Testosterona.

p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo. E2: Estradiol. Pg Progesterona. Ts: Testosterona.

El concepto que parece reflejar estos experimentos en nuestro modelo es que, una vez la interacción tumor-huésped se ha iniciado y ha tomado una determinada inercia, la administración de las hormonas no puede invertirla, al menos completamente, sin embargo sí parece tener cierto grado de capacidad potenciadora. Así mientras que con estradiol no se generó ningún efecto, con progesterona pareció intuirse una tendencia inhibitoria que quedó atenuada. El efecto promotor de la testosterona es moderadamente más patente puesto se ejercería a favor.

3.2 MODELO PREACONDICIONAMIENTO

Observando las tendencias resultantes del experimento previo, optamos por diseñar un modelo en **preacondicionamiento**.

La finalidad de una situación de precondicionamiento es estimular las capacidades de un órgano o sistema con el fin de rentabilizar al máximo sus recursos. Al estimular las respuestas, el organismo se encuentra más preparado que en una situación basal, su respuesta puede ser más rápida o más vigorosa o su tolerancia al daño ejercido es mayor.

En estos modelos los animales también fueron esterilizados y recibieron un sólo compuesto hormonal 72 horas antes del xenotransplante y éste se administró periódicamente cada 4 días hasta el final del experimento.

3.2.1 Modelos sintónicos

En este escenario los machos y hembras recibieron las hormonas en consonancia a su sexo.

3.2.1.1 Hembras reciben estradiol

Se administró estradiol a hembras aneختomizadas antes del xenotransplante con la línea celular BLM. Se monitorizó el lugar de punción del mismo, centrándonos en el momento de inicio de desarrollo tumoral. Una vez las lesiones alcanzaron el mínimo tamaño para ser accesibles a la palpación se inició el registro periódico de medidas hasta el día 18º postxenotransplante.

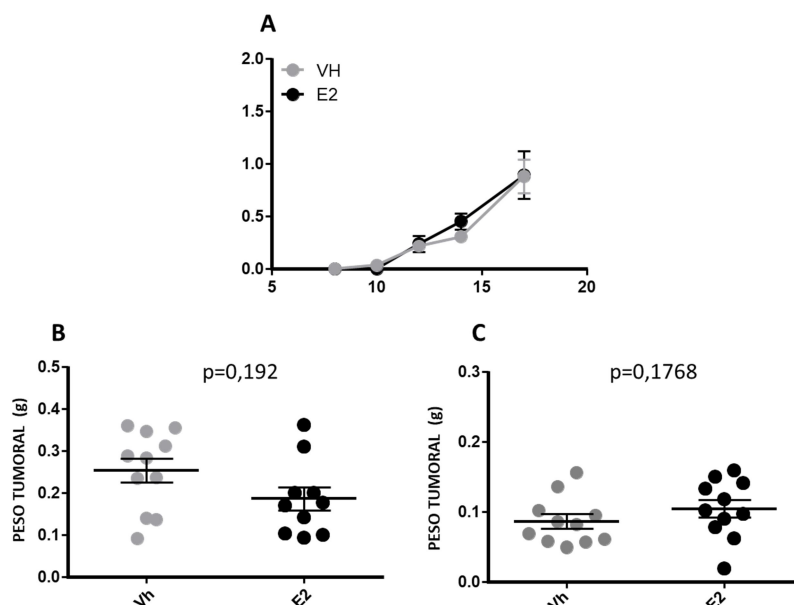


Figura 29: Modelo precondicionamiento con estradiol en ratones hembra adultos esterilizados quirúrgicamente.

A: Seguimiento evolutivo del tamaño tumoral, desde la detección de una lesión nodular (aprox. día 8-10), hasta la finalización del experimento (criterio finalización: Superar los 20 días o tamaño superior a 1/1,5 cm²) con la línea celular de melanoma Humano BLM. *=p<0,05 por regresión lineal respecto al tiempo

B: Diferencia en peso tumoral a día 14. Línea celular de melanoma humano BLM. p test de Mann Whitney

C: Diferencia en peso tumoral a día 12. Línea celular de melanoma humano SK-MEL-103. p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo, E2: Estradiol.

El precondicionamiento con estradiol no generó diferencias en tamaño tumoral, respecto a sus controles, a lo largo del tiempo. Asimismo tampoco tuvo repercusión en el peso en 14º día postxenotransplante (Figura 29A y B).

Para corroborar estos datos, empleamos una segunda línea celular, SK-MEL-103, que proporcionó los mismos resultados: ausencia de diferencia estadísticamente significativa (Figura 29C)

Estos datos reflejan que, en nuestro modelo, el estradiol parece no tener repercusión sobre el desarrollo tumoral ya que ni en tratamiento ni en precondicionamiento se detectaron diferencias entre las hembras a las que se les suministro estradiol y a las que no.

3.2.1.2 Hembras reciben progesterona

De igual forma que antes, se administró progesterona a hembras aneختomizadas previo al xenotransplante y se siguió el desarrollo tumoral a lo largo del experimento.

En las hembras preacondicionadas con progesterona las lesiones tumorales generadas con la línea BLM aparecieron más tarde (unas 72 horas) y su crecimiento fue más lento durante toda la evolución cronológica. Se observaron tamaños significativamente inferiores (~95% en día 12°, ~83% en día 14°, ~60% en día 16° y ~15% en día 18°), respecto a los tumores en hembras sin preacondionamiento hormonal (vehículo). En la parte final del experimento las diferencias parecieron acortarse (Figura 30A).

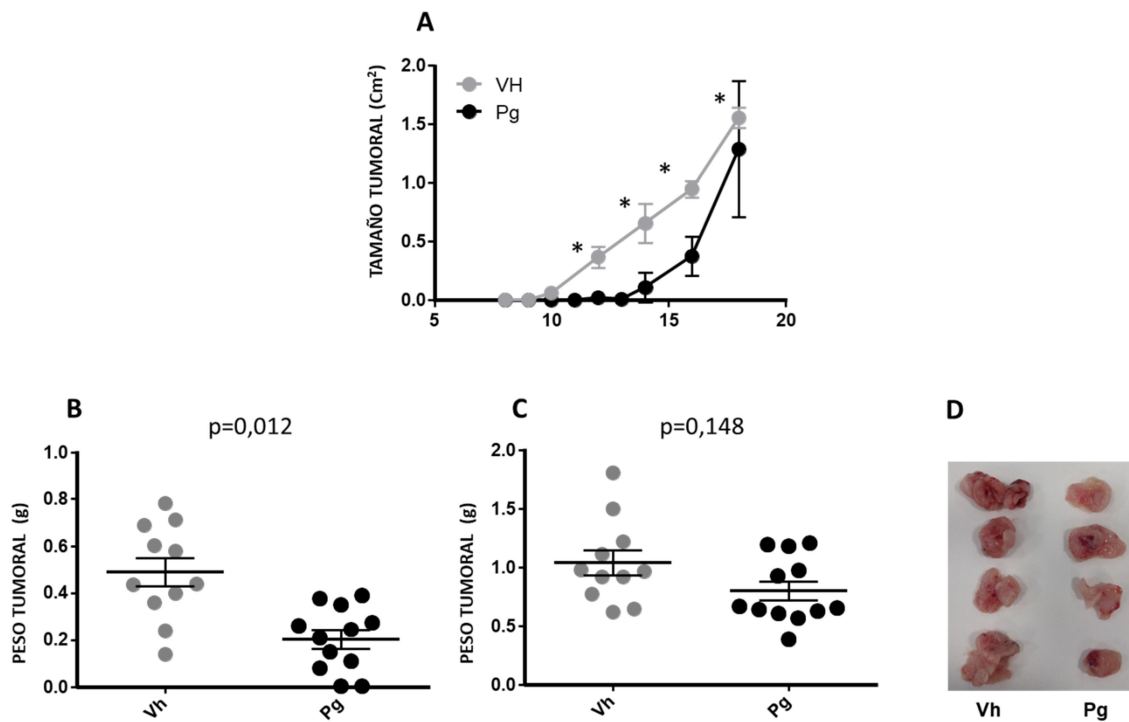


Figura 30: Modelo preacondicionamiento con progesterona en ratones hembra adultos esterilizados quirúrgicamente.

A: Seguimiento evolutivo del tamaño tumoral, desde la detección de una lesión nodular (aprox. día 8-10), hasta la finalización del experimento (criterio finalización: Superar los 20 días o tamaño superior a $1/1,5 \text{ cm}^2$) con la línea celular de melanoma Humano BLM.

*= $p < 0,05$ por regresión lineal respecto al tiempo

B: Diferencia en **peso tumoral a día 14**. Línea celular de melanoma humano **BLM**. p test de Mann Whitney

C: Diferencia en **peso tumoral a día 20**. Línea celular de melanoma humano **BLM**. p test de Mann Whitney.

D: Imagen macroscópica comparativa de las lesiones tumorales a día 20. Línea celular de melanoma humano **BLM**.

Vh: Vehículo, Pg: Progesterona.

El estudio de esta secuencia se amplió programando dos baterías de experimentos que se detendrían, una a la mitad del ciclo y el otro al final del mismo. Así, en día 14° postxenotransplante se observaron unos pesos significativamente menores (~60%) en los tumores de las hembras preacondicionadas con progesterona, mientras que al final, día 20° postxenotransplante, estas diferencias fueron menores (~20%) y no significativas (Figura 30B y C). Los datos descritos se generaron empleando la línea celular BLM y para ratificar la reproducibilidad del efecto observado, empleamos la línea celular SK-MEL-103. Igualmente, observamos que los tumores de las hembras preacondicionadas con progesterona fueron significativamente menores (~80%) que las no preacondicionadas (figura 31).

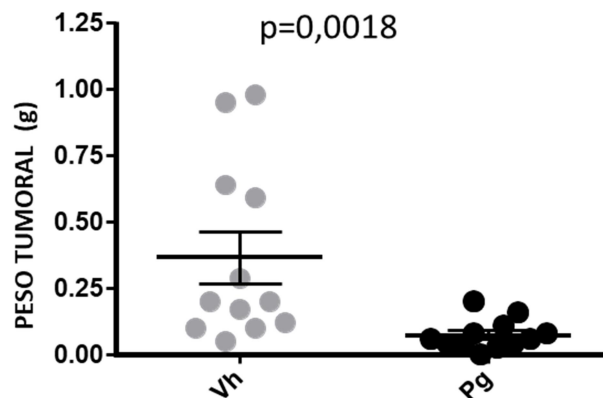


Figura 31: Modelo preacondicionamiento con progesterona en ratones hembra NSG adultos esterilizados quirúrgicamente.

Xenotransplante subdérmico con la línea celular de melanoma humano **SK-MEL-103**.

Diferencia en **peso tumoral a día 12**.

p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo. Pg: Progesterona.

3.2.1.3 Machos reciben testosterona

La mecánica de estos experimentos es idéntica a lo descrito previamente, los machos recibieron testosterona 72 horas antes del xenotransplante realizado con la línea celular BLM y la evolución de la lesión tumoral se siguió a lo largo de 20 días.

El preacondicionamiento con testosterona no mostró impacto inicialmente y las lesiones en ambos grupos fueron detectables en el mismo momento. Sin embargo, entorno al 12° día postxenotransplante comenzó a observarse un

incremento del tamaño tumoral en el grupo de testosterona que no se amortiguó en toda la secuencia dinámica: ~20% en día 12°, ~90% en día 14°, ~70% en día 16° y ~60% en día 18° (Figura 32A). Asimismo, obtuvimos registros de pesos tumorales en experimentos detenidos en día 14 y 20 postxenotransplante. En ambos casos, la diferencia en tamaño obtenía su correspondencia en peso, rondando el 40% (Figura 32B y C).

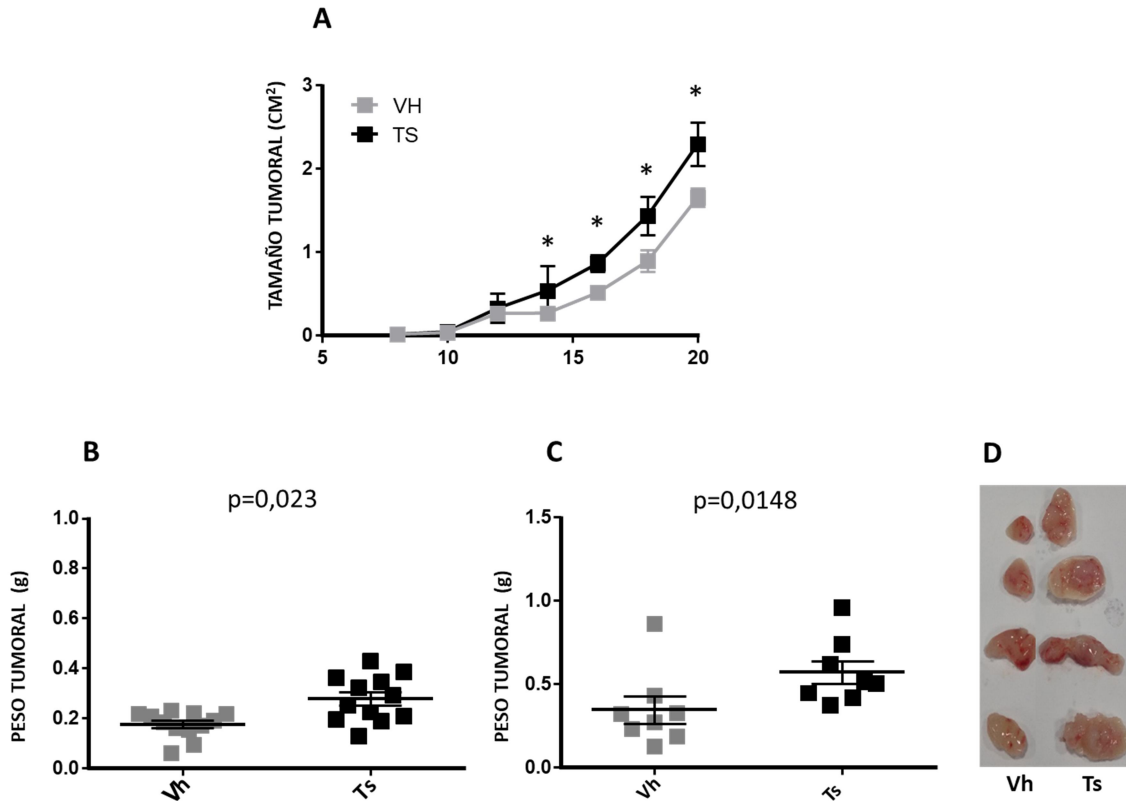


Figura 32: Modelo preconditionamiento con testosterona en ratones machos NSG adultos esterilizados quirúrgicamente.

A: Seguimiento evolutivo del tamaño tumoral, desde la detección de una lesión nodular (aprox. día 8-10), hasta la finalización del experimento (criterio finalización: Superar los 20 días o tamaño superior a $1/1,5\text{cm}^2$) con la línea celular de melanoma Humano BLM. $*=p<0,05$ por regresión lineal respecto al tiempo

B: Diferencia en peso tumoral a día 14. Línea celular de melanoma humano BLM. p test de Mann Whitney

C: Diferencia en peso tumoral a día 20. Línea celular de melanoma humano BLM. p test de Mann Whitney

D: Imagen macroscópica comparativa de las lesiones tumorales a día 20. Línea celular de melanoma humano BLM

Vh: Vehículo, Ts: Testosterona.

mecanismos protumorales que intuimos en el esquema tratamiento, favoreciendo la implantación.

Ambos efectos, pro y antitumoral, podrían llevarse a cabo modulando el entorno en el que se implanta y desarrolla el tumor.

3.2.2 Modelos inversos

Considerando los resultados obtenidos en el apartado previo (modelo preacondicionamiento sintónico) y, viendo cómo progesterona y testosterona mostraban efectos anti y protumorales, decidimos investigar si este efecto sería trasladable al sexo contrario o era sexo específico.

Para ello, empleamos el mismo esquema que en el modelo preacondicionamiento sintónico pero administrando, en esta ocasión, la hormona no dominante en su sexo. Así, a las hembras esterilizadas las preacondicionamos con testosterona y a los machos esterilizados, con progesterona. Estos modelos los denominamos *inversos*.

Observamos que en los machos esterilizados que recibieron progesterona prexenotransplante no se evidenció repercusión en el peso de los tumores en día 14°. De igual forma, la administración de testosterona prexenotransplante en hembras esterilizadas, no generó ninguna diferencia respecto al peso tumoral. (Figura 34A y B).

De la observación de ambos experimentos se desprende que la presencia de la hormona es condición necesaria, pero no suficiente, para ver el efecto pro o antitumoral. Se necesitan requisitos adicionales para que el efecto completo surta efecto. En esta línea podría sugerirse que, en la interrelación del tumor con el huésped, es posible que existan algunos mecanismos sexo específicos que activen o inhiban determinadas funciones o comportamientos que, a la postre, modulan y condicionan la forma y el ambiente en que se implanta y desarrolla el tumor.

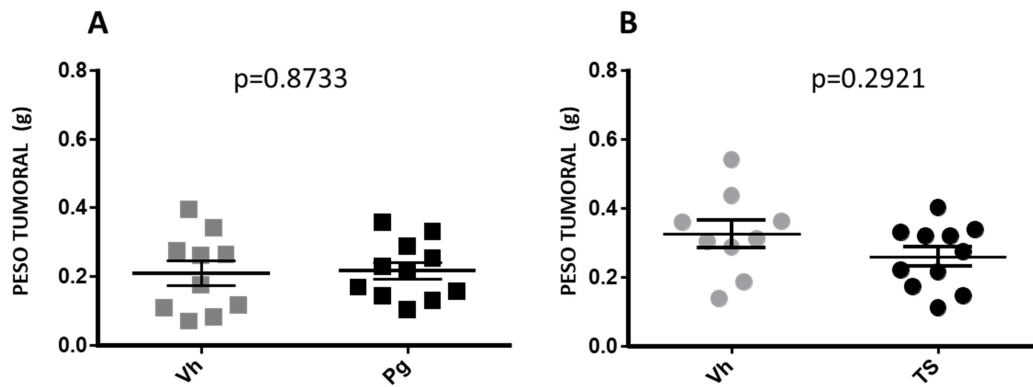


Figura 34: Modelo precondicionamiento inverso.

A: Ratones machos adultos esterilizados quirúrgicamente y precondicionados con progesterona.

B: Ratones hembra adultas esterilizadas quirúrgicamente y precondicionados con testosterona.

Xenotransplante subdérmico con la línea celular de melanoma humano **SK-MEL-103**.

Diferencia en **peso tumoral a día 14**.

p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo. Pg: Testosterona. Ts: Testosterona

3.3. MODELO ANTAGONISTA DE RECEPTORES PERIFERICOS HORMONAS SEXUALES (TESTOSTERONA Y PROGESTERONA)

Habiendo comprobado que la preparación del organismo, precondicionamiento, por parte de progesterona y testosterona era un fenómeno que condicionaba la implantación/desarrollo tumoral y el efecto pro o antitumoral, optamos por eliminarlo por un mecanismo diferente y cerciorarnos de su papel.

Desarrollamos un modelo en el que se mantuvieron las hormonas endógenas, y fisiológicas, de cada sexo (no se realizó esterilización quirúrgica), pero se realizó un bloqueó farmacológico de receptores de hormonas sexuales. El antagonista periférico de los receptores de testosterona y progesterona se administró previo al xenotransplante. Siguiendo este esquema, las hembras en presencia de acetato de ulipristal, antagonista periférico de los receptores de progesterona, mostraron tumores significativamente más grandes (~40%) que las hembras no antagonizadas. (Figura 35A). Por otro lado los machos en presencia de flutamida, antagonista de la testosterona, mostraron tumores significativamente más pequeños (~50%) que a los que se les administró vehículo (Figura 35B).

De esta manera parece confirmarse el efecto protumoral de la testosterona y el efecto antitumoral de la progesterona.

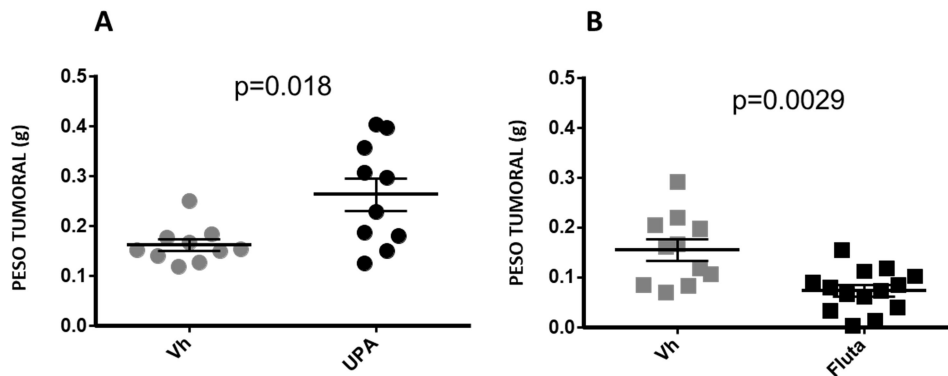


Figura 35: Modelo natural en ratón adulto en presencia de antagonistas para receptores de hormonas sexuales (bloqueo farmacológico)

A: Diferencia en **peso tumoral en día 20** postxenotransplante en hembras a las que se les administró acetato de ulipristal 72 horas antes del mismo.

B: Diferencia en **peso tumoral en día 20** postxenotransplante en machos a los que se les administró flutamida 72 horas antes del mismo.

Xenotransplante subdérmico con la línea celular de melanoma humano **BLM**.

p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo. UPA: Acetato de Ulipristal. Fluta: Flutamida

Aunque no realizamos estudios pormenorizados de correspondencia entre la dosis de antagonista suministrada por vía subcutánea y sus niveles plasmáticos, sí realizamos estudio de toxicidad para descartar esta posible interferencia. Empleamos un rango amplio de concentraciones de antagonistas en cultivos in vitro, no observándose repercusión ni en el conteo de células por citometría de flujo (figuras 36A y B), ni en la incorporación de BdrU durante los ciclos de división celular (Figura 36C).

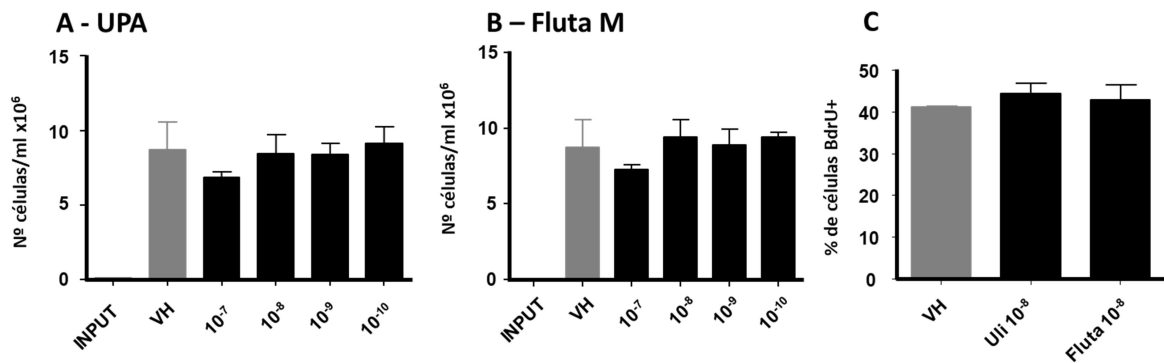


Figura 36: Análisis de la toxicidad de los antagonistas periféricos de hormonas sexuales sobre la línea celular BLM.

A: Repercusión sobre la proliferación celular, estimada mediante contaje celular (+SD) por citometría de flujo, tras incubación en presencia de diversas concentraciones de Acetato e Ulipristal.

B: Repercusión sobre la proliferación celular, estimada mediante contaje celular (+SD) por citometría de flujo, tras incubación en presencia de diversas concentraciones de Flutamida.

C: Repercusión sobre la proliferación celular, estimada por incorporación de BdrU mediante citometría de flujo, tras incubación en presencia de concentración intermedia de Acetato de Ulipristal y Flutamida.

Vh: Vehículo, UPA: Acetato de Ulipristal. Fluta: Flutamida.

Input: células de inicio, M: molar.

* p< 0.05 por

OBJETIVO 4: *Evaluar el impacto macroscópico que generan las hormonas sexuales en la diseminación a distancia*

Los experimentos realizados con la administración individual de hormonas sexuales mostraron un efecto local antitumoral para progesterona y un efecto protumoral para testosterona. A la luz de estos resultados nos planteamos cuál podría ser la repercusión de las hormonas sexuales sobre el desarrollo o la evolución en la diseminación de la enfermedad tumoral a otros órganos (metástasis a distancia). La diseminación metastásica y la disfunción orgánica progresiva es la causa más frecuente de muerte. Las teorías sobre la generación de enfermedad metastásica se enunciaron previamente (Introducción Apartado 3. Generación de enfermedad metastásica). La teoría mecánica se basa en el atrapamiento de las células tumorales en los pequeños capilares de los órganos, una vez han accedido a la circulación general. Las otras dos teorías difieren en el grado de condicionamiento que ejerce el crecimiento local sobre el desarrollo de enfermedad metastásica, pudiendo ser completamente dependiente (teoría "seed and soil") o parcialmente independiente (nicho premetastásico).

Diseñamos dos grupos de experimentos con animales esterilizados, con y sin tumor primario presente. A su vez, en el grupo con tumor primario presente, aplicamos los dos protocolos de administración de hormonas, preacondicionamiento y tratamiento. El objetivo fue conocer tanto si los efectos locales observados eran transferibles a la enfermedad a distancia como estudiar la interdependencia: desarrollo local/enfermedad metastásica.

4.1 MODELO METÁSTASIS NATURAL

Este modelo de trabajo respetó el transcurso habitual de una progresión tumoral típica en la que la enfermedad metastásica se desarrolla ya en presencia de tumor local evidente. A los ratones (machos y hembras esterilizados) se les realizó un xenotransplante subdérmico con la línea celular BLM y se les asignó, o bien a una rama preacondicionamiento o a una rama tratamiento con hormonas sexuales, progesterona o testosterona. En día 15º postxenotransplante (diámetro tumoral en torno a 1 cm) se realizó la resección completa del tumor primario y se continuó la observación diez días más, momento en el que finaliza el experimento, se extraen los pulmones, procediéndose al conteo manual de macrometástasis pulmonares.

4.1.1 Modelo precondicionamiento

El efecto antitumoral mostrado por progesterona a nivel local en precondicionamiento también presentó su correspondencia en la enfermedad pulmonar, siendo el contaje de macrometástasis pulmonares significativamente inferior en los ratones precondicionados (Figura 37A-C).

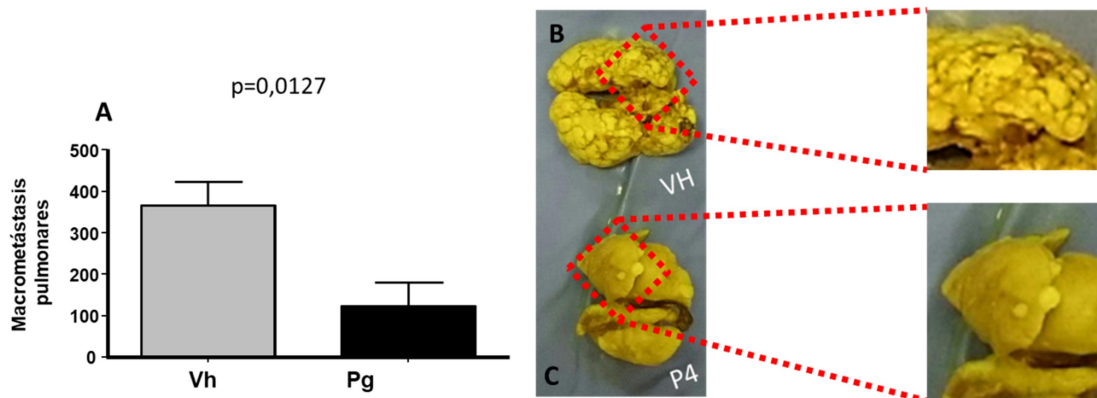


Figura 37: Generación metástasis sistémicas por vía natural en ratones hembras precondicionadas con progesterona.

A: Diferencia en número de **macrometástasis pulmonares**.

B: Detalle macroscópico de la afectación pulmonar en ausencia de precondicionamiento.

C: Detalle macroscópico de la afectación pulmonar en presencia de precondicionamiento.

Xenotransplante subdérmico con la línea celular de melanoma humano **BLM**.

p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo. Pg: Progesterona

Por el contrario, en el grupo de precondicionamiento con testosterona, que a nivel local había demostrado un efecto protumoral, no encontramos diferencia significativa en el contaje de macrometástasis pulmonares entre los ratones precondicionados y no precondicionados (Figura 38).

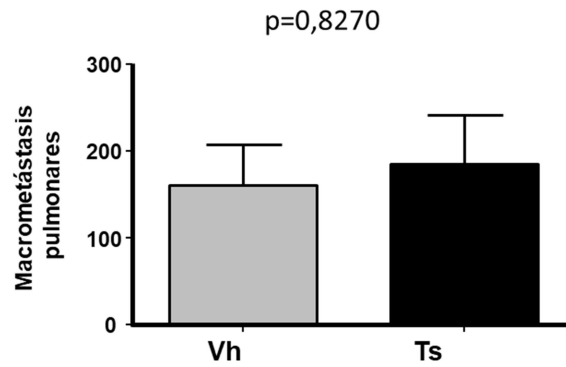


Figura 38: Generación metástasis sistémicas por vía natural en ratones machos preacondicionados con testosterona.

Diferencia en número de **macrometástasis pulmonares**

Xenotransplante subdérmico con la línea celular de melanoma humano **BLM**.

p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo. Ts: Testosterona.

4.1.2 Modelo tratamiento

El modelo tratamiento con progesterona mostró sutiles indicios antitumorales a nivel local, sin significación estadística. Al aplicarlo sobre el modelo de enfermedad metastásica se observó un menor número de lesiones sobre en el contaje de macrometástasis pulmonares. Nuevamente, en los machos tratados con testosterona, no se observó mayor número de metástasis pulmonares (Figuras 39A y B)

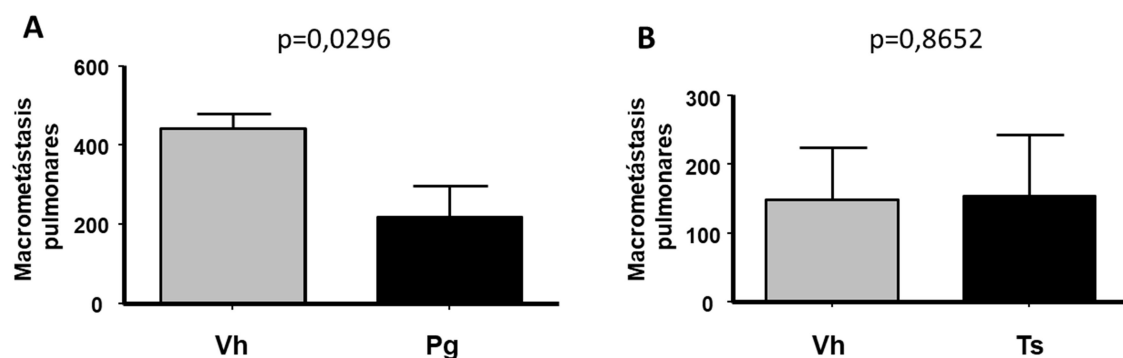


Figura 39: Generación metástasis sistémicas por vía natural según el modelo tratamiento.

Diferencia en número de **macrometástasis pulmonares** en (A) ratones hembra adultos esterilizados quirúrgicamente y tratados con progesterona y (B) ratones machos NSG adultos esterilizados quirúrgicamente y tratados con testosterona.

Xenotransplante subdérmico con la Línea celular de melanoma humano **BLM**.

p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo. Pg: Progesterona Ts: Testosterona.

4.2 MODELO METÁSTASIS INTRAVENOSO

En este modelo se eliminó la interferencia generada por las hormonas sexuales en el tumor local y la posible repercusión que ésta podría ejercer en los nichos metastásicos. Las células tumorales fueron depositadas directamente en el torrente sanguíneo a través de la vena de la cola de un ratón esterilizado previo precondicionamiento con progesterona o testosterona y sin realizarse xenotransplante previamente. Las células quedaron atrapadas en la vascularización de la red pulmonar, generando metástasis. Se establecieron grupos de machos y hembras precondicionados con testosterona y progesterona respectivamente.

Tras el sacrificio de los animales y el conteo macroscópico de las metástasis pulmonares no se observaron diferencias (Figuras 40A y B). Ni las hembras precondicionadas con progesterona mostraron menos metástasis que sus controles, ni los machos precondicionados con testosterona mostraron más.

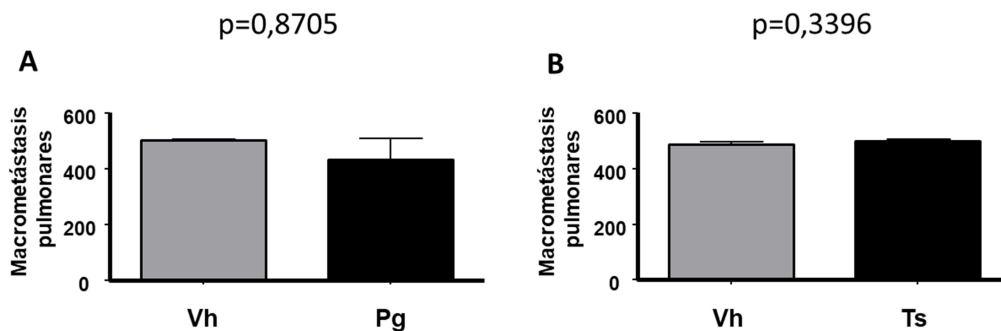


Figura 40: Generación metástasis sistémicas por vía intravenosa según el modelo precondicionamiento.

Diferencia en número de **macrometástasis pulmonares** en (A) Ratones hembra adultos esterilizados quirúrgicamente precondicionados con progesterona y (B) Ratones machos adultos esterilizados quirúrgicamente precondicionados con testosterona.

Línea celular de melanoma humano **BLM**.

p test de Mann Whitney.

Vh: Vehículo. Pg: Progesterona Ts: Testosterona.

Tomando en consideración los tres grupos de experimento observamos que, con progesterona, se produce control de las metástasis sólo si existe tumor local (ya sea grande o pequeño) lo que traduciría un vínculo tumor local/metástasis, sobre éste interferiría progesterona. Por otro lado la administración subcutánea de progesterona en el modelo metástasis-

tratamiento se inicia en un momento en el que ni siquiera existe tumor macroscópico o lo que es lo mismo, no hay tumor con capacidad invasiva, por lo que no se puede confirmar que el grado de invasividad local esté vinculado al desarrollo de enfermedad metastásica.

En el caso de testosterona, en apariencia, no se mostró efecto protumoral en el contexto metastásico, pero cabe la duda de si el efecto protumoral podría ser más en tiempo que en volumen, es decir, si la testosterona podría haber causado una aparición más precoz de las metástasis a distancia. En este aspecto no hemos pormenorizado en esta fase y será objeto de investigación en futuros experimentos.

DISCUSIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo (World Health Organization 2018a) y su impacto en la economía estatal es muy significativo. Los gastos derivados de procedimientos diagnósticos, quirúrgicos y tratamientos farmacológicos adyuvantes se incrementan anualmente. Adicionalmente, es necesaria una constante inversión en investigación puesto que constituye la única fuente constante de nuevos conocimientos que nos ayudan a comprender mejor los mecanismos de progresión y escape tumoral, los factores que condicionan su pronóstico y, sobre todo, nos ayudan a diseñar nuevas estrategias terapéuticas con las que tratar de amortiguar el impacto del cáncer sobre la población. Fruto de las investigaciones clínico-epidemiológicas se ha identificado al sexo como un factor relevante en el pronóstico oncológico. El sexo es una característica intrínseca a cada paciente, no modificable, con un significativo y reconocido impacto en la fisiopatología de la enfermedad. En lo que se refiere al cáncer, existe un claro dimorfismo sexual oncológico que trasciende a la mayoría de los tumores y es independiente de la ubicación geográfica o de la condición socio-económica y que se traduce en que, independientemente de otros factores particulares que afecten a cada tipo específico de tumor, las mujeres tienen mejor pronóstico oncológico que los hombres. Las bases de este fenómeno continúan siendo desconocidas en su mayor parte, siendo necesario ahondar sobre ellas para, quizá, poder explotarlas como herramientas terapéuticas. Con esta filosofía, buscando pormenorizar sobre estos mecanismos, hemos realizado el modelo sobre el que asienta el presente estudio de investigación.

Existen diferentes propuestas en la literatura con objeto de explicar cómo el sexo ejerce su efecto sobre los tumores. Nuestro trabajo parte de la hipótesis que las hormonas sexuales juegan un papel determinante en la ventaja oncológica mostrada por las mujeres. Para estudiar esta premisa seleccionamos un tumor en el que tenemos amplia experiencia clínica, melanoma cutáneo, y empleando líneas tumorales humanas, hemos desarrollado un modelo de experimentación animal reproducible sobre el que hemos podido estudiar las repercusiones de estradiol, progesterona y testosterona sobre el desarrollo local y sobre la enfermedad metastásica en diferentes escenarios. Los datos obtenidos nos permiten afirmar que existe un

vínculo entre las hormonas sexuales y el pronóstico oncológico y que podría ser consecuencia de la modulación que las hormonas ejercen sobre la relación tumor-huésped, conocido como microambiente tumoral. Gracias a los resultados obtenidos hemos constatado el papel protumoral de testosterona, pero además hemos observado que progesterona tiene un destacado papel antitumoral sobre el que no se ha profundizado en estudios de investigación previos. Sus efectos afectan al desarrollo local y también nos proporciona evidencia de su influencia sobre el desarrollo de enfermedad metastásica. Adicionalmente, nuestro modelo permitirá profundizar en los mecanismos que emplean las hormonas sexuales e intentar trasladarlos a la práctica clínica en forma de herramientas terapéuticas. Igualmente facilitará la investigación sobre otros factores, dado que aunque existe asociación entre hormonas sexuales y pronóstico oncológico, no es el único factor que determina la diferencia, siendo necesario continuar la investigación en otros aspectos como los genéticos.

1 LA INVESTIGACIÓN DEL SEXO COMO FACTOR PRONÓSTICO ES ESENCIAL

El sexo es un factor pronóstico oncológico cuya influencia permanece estable independientemente de la región geográfica o el status socio-económico y es aplicable a la gran mayoría de los tumores. Las mujeres tienen una mayor supervivencia en cáncer que los hombres, pero no sólo eso, sino que en muchos tumores se han observado diferentes grados de respuesta a los tratamientos quimioterápicos dependiendo del sexo (Schmuck et al. 2020). La trascendencia del sexo es tan significativa que, en algunos tumores, ya forma parte de los sistemas de estadificación postoperatoria que nos ayudan a determinar las probabilidades de recidiva o muerte (Haugen et al. 2015). Sin embargo conocer la dimensión completa de la repercusión del sexo es complejo por varios motivos. Por un lado, el grado de influencia del sexo como factor pronóstico no siempre es homogéneo, sobre todo en lo que concierne a la edad de los pacientes. La ventaja es significativamente mayor en los jóvenes, particularmente antes de los 55-60 años, a partir de ese momento la ventaja, aunque persiste, se atenúa y en algún tipo de cáncer puede hasta desaparecer (Galvin et al. 2018; Majek et al. 2013). Adicionalmente, algunos

estudios han señalado que la ventaja oncológica no trasciende a todos los estadios de desarrollo tumoral. Así en el estudio de Enniga desarrollado sobre más de 100.000 pacientes con melanoma cutáneo, se observó que las mujeres, con estadios iniciales o intermedios de afectación tumoral, presentaban menos riesgo de muerte que los hombres. Este hecho se observaba en todos los grupos de edad (18-45 años, 46-55 años, >56 años), sin embargo la diferencia no se observaba en presencia de enfermedad metastásica. Un dato muy relevante, presente en todo el estudio, es que la ventaja de las mujeres respecto a los hombres se reducía en la medida que la edad se incrementaba (Enninga et al. 2017). Asimismo, en el déficit de conocimiento, también influyen las deficiencias metodológicas en el estudio del sexo y es que, a pesar de la inmensa cantidad de datos clínico-epidemiológicos que avalan su relevancia, el sexo es, con frecuencia, un factor infravalorado y reiteradamente obviado tanto en los estudios de investigación clínica como los experimentales. Múltiples trabajos reflejan una muy escasa representación de las mujeres en los ensayos clínicos controlados. El artículo de Murthy, publicado en 2004, ya reflejaba una mayor probabilidad de entrar en un ensayo para un hombre que para una mujer: 2.1% frente a 1.6%, en cáncer de colon. La consecuencia es que las mujeres tienen muy poca representación, tanto en los estudios de investigación clínica no oncológicos como en los oncológicos, donde la tasa de participación de mujeres ronda un 38.8% (Jagsi et al. 2009; Geller et al. 2011; Murthy, Krumholz, and Gross 2004; Wagner et al. 2019). El sesgo que este hecho supone en la clínica, también trasciende a los modelos experimentales. Varias publicaciones han observado un empleo mayoritario de animales machos, postulándose como posibles razones un mayor tamaño de los mismos, que los hace más manejables, o la ausencia de un ciclo menstrual que pueda interferir en los estudios de farmacocinética o toxicidad farmacológica (Miller 2014; Sandberg and Umans 2015). Estando identificadas estas cuestiones es necesario dar al factor sexo la relevancia que le corresponde, y diseñar trabajos de investigación exclusivos con metodologías cuidadosas y sistemáticas que consideren todos sus condicionantes y que nos permitan conocer toda su amplitud y repercusión. En este sentido, estaremos en mejores condiciones de identificar los condicionantes si abordamos el

estudio del sexo desde una perspectiva biológica, investigando sobre aquellas cuestiones intrínsecas que diferencian a hombres de mujeres. Una de ellas es la genética, las mujeres tienen dos cromosomas X y los hombres un X y un Y. La información contenida en ellos afecta a todas las funciones celulares y a la fisiología del organismo desde su nacimiento hasta la muerte. Es una variable dicotómica que no debe ser confundida con el género, que es un concepto social fruto de las diferencias conductuales, psicológicas y culturales que afectan a la población y que genera un continuo de posibilidades. La segunda diferencia son las hormonas sexuales, diferentes en cada sexo y particularmente complejas en las mujeres. Las hormonas sexuales tienen demostrada influencia sobre múltiples funciones orgánicas y se responsabilizan de la organización de situaciones fisiológicas de extrema complejidad, pero al mismo tiempo su desregulación tiene importantes consecuencias patológicas. Las hormonas sexuales son el objeto de nuestro trabajo de investigación y aportamos datos sólidos que ayudan a conocer su vínculo con el pronóstico oncológico y abren puertas a líneas de investigación sobre su mecanismo.

2 HORMONAS SEXUALES

Seleccionamos las hormonas como posible responsable sexual intrínseco de las alteraciones generadas sobre el proceso de implantación y desarrollo tumoral por ser un factor claramente diferenciador entre sexos, por su reconocida influencia sobre el funcionamiento y coordinación de órganos y sistemas y por la atenuación de la ventaja pronóstica en relación con la edad. Todas estas observaciones están debidamente reflejadas en la literatura. Así las hormonas sexuales tienen la capacidad de reconocer y coordinar situaciones en la que es necesaria la tolerancia a aloinjertos, como en el embarazo, evitando que se produzca el rechazo del feto (Robinson and Klein 2012a), pero también coordina la inmunidad en regiones anatómicas precisas, como el tracto vaginal, como ha sido demostrado en otros trabajos desarrollados en nuestro laboratorio (S. Lasarte et al. 2013; Sandra Lasarte et al. 2016; Salinas-Muñoz et al. 2018).

Adicionalmente, la relación entre la pérdida de la ventaja pronóstica mostrada por las mujeres según se incrementa la edad ha sido investigada y reflejada en múltiples trabajos epidemiológicos que han analizado volúmenes poblacionales de considerables dimensiones, como el estudio de Michelli basado en los resultados del proyecto EUROCORE-4. En él, además de demostrarse la ventaja en supervivencia para las mujeres en 15 variedades de tumores, se identificó la edad como el principal determinante de la ventaja y ésta disminuía en la medida que la edad se incrementaba haciéndose prácticamente imperceptible en ancianos (Micheli, Ciampichini, Oberaigner, Ciccolallo, de Vries, Izzarugaza, Zambon, Gatta, and De Angelis 2009). En algunos casos, como el cáncer de colon, esta relación ha tardado más tiempo en demostrarse, pero los datos son también vinculantes. El reciente metaanálisis de Yang confirmó una mejor supervivencia global y específica para el grupo de mujeres, sugiriendo una significativa influencia del sexo en el tratamiento del cáncer de colon (Yang et al. 2017). Pero además otros trabajos, como el de Majek, pormenorizaron en esta ventaja hallando que el beneficio en supervivencia tras ajuste por edad y estadio tumoral era realmente significativo por debajo de los 65 años (Majek et al. 2013). Adicionalmente se ha observado un beneficio en supervivencia por cáncer de colon en mujeres entre 50 y 60 años en tratamiento con suplementación hormonal (Schmuck et al. 2020).

La línea celular elegida para nuestro estudio de investigación, melanoma cutáneo, se ajusta a estos patrones epidemiológicos generales pero además, la bibliografía específica sobre melanoma aporta algún dato adicional que confiere solidez al vínculo hormonas sexuales/pronóstico oncológico. El trabajo retrospectivo de Eniga constató beneficio en supervivencia para las mujeres en todos los grupos de edad (18-45, 46-54 y >55) pero, curiosamente, a pesar de que en la medida que la edad aumentaba el riesgo de muerte por melanoma también lo hacía en ambos sexos, éste era más marcado en las mujeres, dejando intuir que la pérdida de las hormonas sexuales en las mujeres, también conlleva la pérdida de su ventaja pronóstica (Enninga et al. 2017). Adicionalmente las hormonas sexuales femeninas también han sido identificadas como agentes protectores contra la oxidación celular favoreciendo consecuentemente un ambiente adecuado para la síntesis de calcitriol. Ambos

factores, reducción de los niveles de estrés oxidativo y niveles adecuados de calcitriol, fueron identificados por Nosrati como factores protectores en la evolución del melanoma cutáneo (Nosrati and Wei 2014). Nuestros resultados han encontrado consonancia con las evidencias aquí descritas reforzando, por tanto, la necesidad de investigar el grado de participación de las hormonas sexuales, como factor intrínseco al sexo en la ventaja oncológica de las mujeres para tratar de ahondar en sus mecanismos.

3 LA NECESIDAD DE TRABAJAR CON UN BUEN MODELO EXPERIMENTAL

Previamente (Apartado 1 La investigación del sexo como factor pronóstico) hemos reflejado las deficiencias metodológicas que afectan a los trabajos científicos en lo que respecta a la investigación del factor sexo y cuya consecuencia ha sido la infravaloración de su importancia y la imposibilidad de ser identificado como factor pronóstico independiente en muchos cánceres. Para poder aportar conocimientos sólidos a este tema hemos aplicado una metodología sistemática y minuciosa, otorgando importancia a una serie de pilares:

- Empleo ponderado de animales machos y hembras en cada experimento, evitando la reutilización de resultados previos. Cada experimento se diseñó considerando un número equiparable de animales de cada sexo, con sus casos y controles, y las comparaciones se establecieron entre ellos. De esta forma tratamos de reducir los sesgos concernientes a las condiciones particulares que afectan a cada experimento como pueden ser la calidad de la camada, del cultivo celular, de la ejecución del xenotrasplante o de la dilución de las hormonas.
- Las líneas celulares empleadas fueron humanas con el objetivo de buscar la máxima traslacionalidad al terreno clínico. Además existe evidencia de la mayor sensibilidad e inestabilidad de las líneas de melanoma animales y esto podría condicionar la validez de los efectos observados (Joshi, Hassan, and Ramaraj 2017; Ramaraj and Cox 2014b).
- La verificación de los resultados se realizó por duplicado siempre que ha sido posible. Así, como línea celular inicial usamos BLM pero hemos

corroborado la gran mayoría de experimentos con una segunda línea celular, SK-MEL-103. Somos conscientes de que la decisión de emplear células humanas nos obligó a utilizar un ratón apto para xenotransplante, lo que traería como consecuencia una deficiencia inmunológica que coartarían algunos aspectos de los resultados, sobre todo los dependientes de las respuestas a largo plazo y las citotóxicas. A cambio obtendríamos máxima fiabilidad en los procesos de implantación tumoral y desarrollo precoz.

- Medición del grado de sesgo que podrían tener otros factores de influencia. El condicionante genético es otro factor intrínsecos al sexo, que en algunos sistemas, como el inmune, imprimen diferencias que son patentes desde el nacimiento (Klein and Flanagan 2016). Para ponderar el peso de factor genético en nuestro modelo diseñamos experimentos que lo contemplaron de forma específica. Nuestro modelo fue sometido a un escenario libre de hormonas sexuales de forma fisiológica (inmadurez sexual) en la que la carga genética tuviese mayor posibilidad de expresión. El modelo en el ratón prepuber nos permitió observar que los resultados atribuibles a las hormonas no quedarían desacreditados por otros factores de confusión.

El primer resultado que obtuvimos al aplicar esta sistemática fue un modelo animal que representa adecuadamente la ventaja pronóstica de las hembras y establece un nexo causal dependiente de hormonas sexuales. La diferencia mostrada no resulta invalidada por otros factores intrínsecos al sexo, como el componente genético. Siendo un modelo sólido y reproducible sobre el que poder aplicar diferentes supuestos de experimentación, hay que tener en cuenta que nos permite una horquilla de tiempo de estudio de unos 20 días postxenotransplante dado que, en torno a ese momento, las diferencias naturales desaparecen probablemente porque la progresión tumoral rebase las particulares capacidades del sistema inmune del ratón.

4 EFECTOS DE LAS HORMONAS SEXUALES SOBRE LA IMPLANTACIÓN Y DESARROLLO TUMORAL LOCAL

Nuestros datos establecen un nexo causal entre la ventaja oncológica para las mujeres y las hormonas sexuales. Sobre esta base deberíamos suponer que las hormonas sexuales de las hembras serían antitumorales y las de los

machos protumorales, sin embargo, el ambiente hormonal en mujeres es complejo debido a la coexistencia de dos hormonas y en la literatura pueden observarse indicios de que ambas pueden no ser sinérgicas en el ámbito oncológico. Aunque se ha considerado la pérdida de estrógenos, resultado de la menopausia, como el hecho responsable de la pérdida de la ventaja oncológica en mujeres, no parece que sea así en todos los casos y particularmente no lo que hemos observado en nuestros modelos de melanoma (Clocchiatti et al. 2016). Botteri en su trabajo sobre melanoma cutáneo realizado sobre más de 600000 mujeres noruegas entre 45 y 79 años, investigó la repercusión de las diferentes combinaciones de suplementación hormonal sobre la incidencia de este cáncer. Observó que la suplementación exclusiva con estrógenos se asoció a un incremento de riesgo de desarrollo de melanoma, mientras que el empleo de formulaciones combinadas estrógenos/progesterona, no lo hizo. De hecho los análisis pormenorizados que se realizaron sobre dosis-respuesta evidenciaron que el consumo de estrógenos se asociaba a un incremento de riesgo mientras que el de progesterona disminuía el mismo (Botteri et al. 2017). De igual manera, otros estudios han publicado que la suplementación en postmenopausia con progesterona natural podría prevenir el desarrollo de algunos cánceres (Dika et al. 2019, 2017). A la luz de estos hechos expuestos en la bibliografía diseñamos los modelos hormonalmente controlados con el objetivo de pormenorizar sobre los efectos individuales de las hormonas sexuales. Sus resultados fueron, un efecto protumoral para testosterona, un efecto antitumoral para progesterona y un efecto neutro en el caso del estradiol.

Curiosamente en los modelos que seguían un esquema tratamiento sólo obtuvimos ciertos indicios de este efecto, más marcados en testosterona que en progesterona. En el primer caso casi adquiere significación estadística, pero en el segundo sólo mostró una discreta tendencia antitumoral que, más allá de su valor estadístico, le otorgamos un valor biológico subsidiario de ser explorado tratando de generar una situación donde sus potenciales efectos se viesen ampliados. Si bien es cierto que el efecto atenuado en el esquema tratamiento podría ser secundario a que los recursos se movilizan tras la inoculación tumoral, existiendo un decalaje entre estímulo y respuesta, nos

preguntamos si podríamos optimizar el efecto administrando el compuesto hormonal previamente, condicionando que la respuesta estuviese estimulada antes de implante tumoral y eliminando el decalaje. Esta es la filosofía de los modelos precondicionamiento, muy empleados en la clínica, y cuyo objetivo es preparar a un órgano o sistema lo mejor posible para desarrollar una función, o “entrenarlo” para que pueda resistir mejor un estímulo nocivo. Así pequeños periodos de isquemia efectuados a un órgano como el hígado o el corazón, repercutirían en una reducción del daño tisular en una situación de isquemia más prolongada. Gracias a estas estrategias, el entrenamiento cardiovascular, que simula pequeñas isquemias, puede amortiguar los daños producidos por un infarto (Penna, Alloatti, and Crisafulli 2020) o en el caso del hígado repercute en que se puedan soportar periodos de isquemia más largos y así poder desarrollar resecciones hepáticas más amplias y complejas sin incrementar los problemas postoperatorios (G. Wu et al. 2020). Empleando esta estrategia fue la forma con la que conseguimos observar que testosterona favorecía la inercia tumoral y, por tanto, se amplificaban las diferencias en tamaño y peso. Aunque es más difícil revertir o frenar la inercia tumoral, con progesterona también pudimos constatar su efecto antitumoral, observando cómo retrasaba el inicio y desarrollo tumoral durante la horquilla de 20 días que permite nuestro modelo. Incrementar las diferencias quizá pueda favorecernos el posterior estudio de los mecanismos implicados.

4.1 Posibles responsables del efecto pro o antitumoral

A día de hoy serían dos los mecanismos planteables por los que se podrían ejercer los efectos pro o antitumorales. El primero sería derivado del efecto directo de las hormonas sexuales sobre las células tumorales y el segundo sería a consecuencia de la modulación realizada sobre la interacción tumor-huésped.

La dependencia hormonal en muchas estirpes tumorales es un hecho bien contrastado en la literatura. Es conocida la dependencia observada sobre las células tumorales de lesiones que afectan a órganos reproductores: glándula mamaria, ovario, endometrio o próstata por ejemplo (Folkerd and Dowsett 2010). De hecho, los fármacos que bloquean los receptores para estrógenos, progesterona o testosterona, se emplean como terapia adyuvante o definitiva

en múltiples situaciones (Bui et al. 2020; Zhu et al. 2012). Pero también se ha observado en las células tumorales de órganos no reproductores. Por ejemplo los estrógenos promueven el crecimiento de algunas líneas celulares de carcinoma epidermoide de laringe a través de GPER1 o de algunas isoformas de ESR1, mientras que el estímulo de ESR2, es supresor (YongHong Zhang et al. 2017). Li, profundizó en el hepatocarcinoma y encontró que, el efecto protector sobre la hepatocarcinogénesis murina, asociado a *Esr1*, y el favorecedor de la misma, asociado a *Ar*, se encontraba vinculado a *Foxa1/2* (Li et al. 2012). De igual forma, los estrógenos estimulan el crecimiento de las células tiroideas a través de ESR1, ESR2 y GPER1 (YongHong Zhang et al. 2017). Aunque existen publicaciones que sugieren cierto grado de hormonosensibilidad, melanoma cutáneo ha sido considerado clásicamente un tumor hormono independiente. Las conclusiones que arroja la literatura en este sentido son heterogéneas como bien refleja la revisión realizada por Ramaraj. (Ramaraj 2018). En la misma se describen una considerable cantidad de estudios experimentales que contemplan diferentes tipos de modelos experimentales, líneas tumorales (humanas o murinas), compuestos hormonales y dosis, que origina un magma de resultados dispares e incluso contrarios sobre el impacto de las hormonas sexuales en el crecimiento de las células de melanoma (Ramaraj 2018). El mismo Ramaraj publicó que la progesterona, en el medio de cultivo in vitro, promueve la autofagia de las células deteriorando el crecimiento tumoral (Ramaraj and Cox 2014a) y, de igual forma, se describen interferencias en el crecimiento celular gestionadas a través de receptores de membrana no clásicos (Kanda and Watanabe 2001; Ramaraj 2018; Natale et al. 2016). En nuestros experimentos in vitro también observamos que dosis extremadamente altas de progesterona, en el rango analizado, causaban retraso en la proliferación celular pero esto es intrascendente al aplicarlo a nuestro modelo ya que nuestro objetivo sobre el animal de experimentación fue reproducir una situación hormonal corriente, evitando estos niveles extremos sólo observables en el embarazo. Por este motivo nosotros trabajamos con concentraciones plasmáticas en el umbral fisiológico mientras que Ramaraj emplea concentraciones entre 10 y 100 veces mayores a las nuestras (Ramaraj and Cox 2014b). Gracias a la experiencia

previa de nuestro grupo con hormonas sexuales, sabemos que la correspondencia plasmática de tales concentraciones in vitro genera unos niveles muy por encima de los fisiológicos y, por tanto, no observables en la clínica habitual fuera del embarazo, donde los niveles superan unas 200 veces los fisiológicos (Altinoz, Ozpinar, and Elmaci 2019; Sandra Lasarte et al. 2016). Considerando la independencia de hormonas sexuales mostrada por nuestras líneas tumorales y los citados efectos pro y antitumorales, sería razonable postular que las hormonas sexuales ejercen su acción principalmente modulando la interacción entre el tumor y el huésped, entidad conocida como microambiente tumoral (Egeblad, Nakasone, and Werb 2010; T. Wu and Dai 2017). La relevancia del microambiente tumoral es creciente no sólo por su papel esencial durante la implantación, desarrollo y generación de metástasis, sino porque se ha convertido en un foco actual de atención para el desarrollo de estrategias terapéuticas. No todos los microambientes son iguales, de hecho, a día de hoy sabemos que el fenotipo agresivo de un cáncer está condicionado no sólo por las propiedades intrínsecas de las células tumorales sino también por el perfil del microambiente tumoral. De ahí que su análisis sea tan relevante, ofreciéndonos información de su posible comportamiento. En este sentido la modulación hormonal del microambiente podría dar lugar a microambientes promotores de la progresión tumoral o microambientes restrictivos.

En el caso particular de melanoma cutáneo el infiltrado inmune del microambiente ha sido identificado como un factor capital en el pronóstico, estando por encima del componente estromal. En el extraordinario trabajo de investigación de Wang se realiza un extenso análisis del microambiente tumoral de casi 500 muestras de melanoma cutáneo en tres niveles diferentes: tisular, celular y molecular. En el primero se estudia la relación entre el grado de infiltración inmune o estromal y características clínico-patológicas mientras que en el segundo se explora pormenorizadamente la composición celular del infiltrado inmune, tratando de establecer relaciones entre la presencia de subgrupos celulares y resultados clínicos. En el último análisis se buscan correlaciones entre los perfiles de expresión molecular y los patrones de infiltrado inmune con el objetivo de encontrar mecanismos reguladores o

biomarcadores pronósticos. En los resultados del análisis del primer nivel los autores encuentran correlación entre el grado de infiltración inmune y estromal con características pronósticas, de forma que los melanomas con indicadores de mal pronósticos, como ulceración o mayor índice de Clark, mostraban menor infiltración de ambos. Adicionalmente evidenciaron que los casos con mayor grado de infiltración inmune, pero no estromal, presentaban mejor supervivencia. Llamativamente los pacientes más jóvenes presentaban mayor grado de infiltrado inmune y estromal que los pacientes más mayores y las mujeres presentaban mayor infiltrado inmune que los hombres, observándose nuevamente como el dúo sexo/edad condicionan las diferencias pronósticas (P. Wang et al. 2020). En nuestra investigación no hemos abordado este nivel de análisis en este momento pero los datos que nos proporcionen la colección de muestras que hemos ido almacenando serán de un extraordinario interés.

4.2 Posible mecanismos implicados en el efecto pro o antitumoral local de las hormonas sexuales

El mecanismo pro o antitumoral de las hormonas sexuales puede ser ejercido directamente, estimulando o inhibiendo la proliferación de los clones tumorales, pero independientemente de este mecanismo, que además fue descartado en nuestro modelo, también debe existir una mediación basada en el microambiente tumoral a consecuencia de la amplia distribución de los receptores para hormonas sexuales en toda la economía.

En la literatura se ha otorgado mucho peso al componente inmune del microambiente, entre otras muchas razones por el vínculo evidenciado entre inflamación crónica no resuelta y cáncer. Por este motivo muchos de los efectos pro o antitumorales atribuidos a las hormonas sexuales han sido a consecuencia de su papel pro o antiinflamatorio. Así los estrógenos son considerados protumorales en base a una inhibición de la respuesta inmune celular y a la promoción de la respuesta humoral Th2 (Foo et al. 2017). De igual manera estimulan la secreción de citoquinas protumorales (IL6, IL4, TNF), la polarización de los macrófagos tumorales hacia un perfil M2, la proliferación de células T reguladoras y de MDSC, el incremento de la expresión celular de PDL1 y la inhibición de linfocitos T CD8+ (Rothenberger, Somasundaram, and Stabile 2018). Por su parte la progesterona es considerada una hormona

antiinflamatoria, sobre todo por los efectos observados durante el embarazo, donde juega un papel inmunomodulador, asegurando la tolerancia materna del feto (Robinson and Klein 2012b). Los niveles de progesterona en el embarazo nada tienen que ver con la realidad de la mayor parte del tiempo de la vida de una mujer y, por tanto, la situación del sistema inmune en el embarazo no es extrapolable a la vida diaria. Sin embargo sí se ha demostrado una elevación de la cifra de neutrófilos tras la ovulación, en respuesta al incremento plasmático de los niveles de progesterona, así como un aumento de su capacidad fagocítica en comparación con la fase folicular (Nowak, Borkowska, and Pawlowski 2016; Smirnova et al. 2018). De igual forma también se ha observado que el aumento de progesterona en la fase lútea precoz ejerce influencia sobre los receptores de respuesta innata tipo “Toll-Like”. Se ha observado, por ejemplo, incremento de los niveles de IL6 y TNF tras la estimulación de TLR2 y de los niveles de IL1B, IL6 y TNF tras la estimulación de TLR4. Asimismo, durante la fase lútea tardía, se ha observado una disminución de los niveles de TNF tras la estimulación de TLR8 (Dennison et al. 2012). Realmente este podría ser un interesante mecanismo aplicable a nuestro modelo en virtud del cual, el precondicionamiento con progesterona podría condicionar un incremento de las moléculas encargadas del reconocimiento de patrones moleculares que identifican a las células tumorales, ya sean TLR, RLR (RIG-I, retinoic acid-inducible gene-I-like receptors), NLR (Nod-like receptors) u otros no definidos, generando un estado de “hipervigilancia” responsable del retraso en implantación y desarrollo. La respuesta TLR también se ha analizado en relación a testosterona, considerada protumoral por su efecto inmunosupresor. Se ha observado que la orquiectomía en ratones macho se asocia a un incremento en la expresión de TLR4 en los macrófagos, generando una elevación de las citoquinas proinflamatorias en respuesta a la infección. (Rettew, Huet-Hudson, and Marriott 2008; Gubbels Bupp and Jorgensen 2018). Asimismo, Corcoran describió como la testosterona suprime la liberación de TNF e IL1B por parte de los macrófagos en respuesta a lipoproteínas exógenas (Rettew, Huet-Hudson, and Marriott 2008). Diversos estudios, han observado también que, aunque la testosterona puede generar un incremento en el número de

neutrófilos, al mismo tiempo y por un mecanismo todavía no definido, suprime su actividad antimicrobiana y la producción de citoquinas inflamatorias, incrementando la producción de IL10 y TGFB1 (antiinflamatoria) (Gubbels Bupp and Jorgensen 2018; Popp Marin et al. 2010). Los mismos autores describieron una reducción de la expresión de moléculas de superficie presentadoras de antígeno por parte de las células dendríticas, en respuesta al incremento de testosterona. Aunque los macrófagos asociados a cáncer son considerados una pieza de elevada relevancia en el desarrollo y progresión tumoral, desafortunadamente, no existen trabajos específicos sobre el impacto de las hormonas sexuales sobre éstos.

Considerando la relativa novedad del microambiente tumoral, también nos encontramos con el problema de la carencia de bibliografía específica y contrastada cuando tratamos de analizar el papel de las hormonas sexuales en relación con el resto de los componentes del microambiente. No es infrecuente observar publicado como una misma hormona puede favorecer o inhibir un mismo componente en función de la estirpe tumoral o como puede ejercer un efecto más o menos significativo en función del estadio tumoral. Es muy probable que todo ello sea secundario a una variación en la presencia/ausencia de receptores para hormonas sexuales o a su mayor/menor densidad en función de múltiples condicionantes (Zheng et al. 2018). Por estas variaciones la influencia de progesterona sobre el componente vascular cambia en función del escenario clínico considerado, mostrándose estimuladora de la angiogénesis en cáncer de mama (Benakanakere et al. 2006), mientras que en patología endometrial y en algunos estudios sobre patología cutánea se le ha vinculado con potencial antiangiogénico (Hudon et al. 2003; Demir, Yaba, and Huppertz 2010). Este papel antiangiogénico, ha sido confirmado en varios estudios experimentales en los que se ha demostrado que derivados de la progesterona poseen un significativo efecto antiangiogénico gracias a una reducción en VEGF, ANG, MMP9 y FGF1 (Yahya et al. 2017). Asimismo se ha observado que, tanto dosis altas como bajas de progesterona, tienen capacidad de inhibir la proliferación y migración in vitro de células progenitoras endoteliales (L. et al. 2010; Liu et al. 2015) contrarrestando, incluso, el efecto proangiogénico mostrado por estradiol en algunas situaciones, como sucede

sobre las células endoteliales tras estimulación de la secreción de VEGF y PAF por parte de las células estromales, vía ESR1 (Clocchiatti et al. 2016). El mismo efecto proangiogénico ha sido descrito para testosterona, demostrándose que estimula la migración de progenitores endoteliales, la proliferación de células endoteliales y la neovascularización a través de VEGFA. Este efecto se observa de una forma muy característica en machos, ya que es RA dependiente (S. Yoshida, Ikeda, and Aihara 2016a; Eisermann and Fraizer 2017).

Todos estos efectos descritos también tendrían su repercusión sobre los fibroblastos asociados a carcinoma, elementos muy importantes del componente estromal con esenciales funciones de soporte, comunicación, síntesis y remodelado de la matriz extracelular. Sus efectos también son heterogéneos y sus mecanismos y condicionantes poco conocidos, pudiendo asociarse a mal pronóstico en carcinoma de mama, pulmón y páncreas (Nurmik et al. 2020) o a una disminución de la agresividad y mejor pronóstico en el cáncer de próstata (McAllister et al. 2019).

Los efectos evidenciados por nuestro trabajo se alinean, en parte, con lo reflejado en la evidencia disponible al respaldar, por ejemplo, un papel protumoral para testosterona. Sin embargo no podemos confirmar el papel protumoral de los estrógenos dado que en nuestro modelo el efecto fue neutro, quizá debido a que el estradiol es particularmente complejo, tanto por la diversidad de los subtipos de sus receptores como por los niveles cambiantes durante el ciclo hormonal. Así se puede comportar como agente proinflamatorio a dosis bajas (similares a las de la fase folicular), mientras que a dosis altas (similares a las de la fase lútea) puede ser antiinflamatorio (Roved, Westerdahl, and Hasselquist 2017). Finalmente introducimos algunos datos novedosos en lo que respecta a progesterona puesto que en nuestro modelo se ha mostrado como un potente agente antitumoral si bien es cierto que, en la fase de desarrollo que se encuentra nuestro trabajo, no podemos anticipar cuales son los mecanismos implicados.

4.3 Las hormonas sexuales son condición necesaria pero no suficiente

A lo largo de la discusión hemos expuesto la relevancia de los factores intrínsecos al sexo, hormonas sexuales y genética, como posibles

responsables de la diferencia pronóstica entre sexos. Adicionalmente hemos observado concordancia entre la retirada de las hormonas y la desaparición de la ventaja para las hembras y, finalmente, hemos observado que en su propio sexo, la progesterona es antitumoral y la testosterona es protumoral. Sin embargo el intercambio de hormonas al sexo contrario no transfiere los efectos descritos, siendo una cualidad sexo específica bajo las condiciones de nuestro modelo. Según estas observaciones la presencia de hormonas es condición necesaria pero no suficiente y probablemente se requiera la información genética para que el efecto se muestre al completo. Así, los resultados obtenidos con este experimento implican interdependencia entre ambos, de forma que el efecto anti o protumoral lo genera la hormona sexual al amplificar características genéticas propias del sexo, siendo este motivo por el que no se evidenciaron diferencias en el modelo prepuber.

La información genética codificada en los cromosomas sexuales de hombres y mujeres es diferente, las mujeres tienen dos cromosomas X y los hombres un X y un Y. La riqueza génica del cromosoma X es superior a la del cromosoma Y, además, en el primero se encuentra codificada mucha información concerniente al sistema inmune cuya inhibición o estímulo podrían condicionar diferentes respuestas por parte del componente inmune del microambiente tumoral. Pero además en el cromosoma X reside un 10% de los miRNA, implicados en el control de la expresión génica mediante la supresión de la traslación de ARNm o la estimulación de la degradación del mismo (Schurz et al. 2019a). Asimismo en el cromosoma X se han descrito regiones promotoras, vinculadas a aspectos de la inmunidad innata, con capacidad para responder a esteroides sexuales (Klein and Flanagan 2016; Hannah, Bajic, and Klein 2008), de forma que la presencia o ausencia de progesterona, estradiol o testosterona podrían potenciar o inhibir respuestas inmunes concretas. Existen genes involucrados en los patrones de reconocimiento de patógenos, como TLR 7 y TLR 8, que residen en el cromosoma X, pero también se han observado genes implicados en las cascadas de señalización desencadenada por su estímulo, como IRAK1, o en el proceso de diferenciación y polarización de los macrófagos, como IL3RA o GATA1. Asimismo CYBB controla los procesos de activación de lisis intracelular por los fagocitos, IL2RG influye en la proliferación

de células T y FOXP3 presenta influencia en la diferenciación de células T reguladoras (Jaillon, Berthenet, and Garlanda 2019). Trabajos adicionales han demostrado que la liberación de IL10 en respuesta a la activación de TLR9 por proteínas virales, es mayor en los monocitos de hombres que en los de mujeres, tal hecho se correlacionaba de una forma directamente proporcional a los niveles de testosterona e inversamente proporcional a los niveles de estradiol (Torcia et al. 2012) y recientemente se ha evidenciado cómo en el aumento de la secreción de INFA1 por parte de las células dendríticas de mujeres, en respuesta a la estimulación de TLR7, están involucrados factores genéticos y hormonales (Laffont et al. 2014).

Considerando lo expuesto, las hormonas sexuales probablemente potencien o inhiban de forma específica la transcripción de información concreta vinculada a los cromosomas sexuales, condicionando la respuesta del microambiente. Probablemente la estimulación o inhibición del frente inmune sea uno de los mecanismos con mayor implicación, pero no hay que olvidar que es posible que la información genética potencie o inhiba la expresión de receptores hormonales sobre los diversos componentes celulares del estroma repercutiendo en su comportamiento, sobre todo si tenemos en cuenta que los genes que codifican AR se ubican en el cromosoma X (Clocchiatti et al. 2016).

En otra línea de observaciones y de forma adicional, el hecho de que progesterona en nuestro modelo no condicione un efecto antitumoral en machos genera una observación colateral interesante pues descarta, una vez más, la autofagia de las células tumorales mediada por progesterona como responsable del retraso en el desarrollo tumoral, implicando al microambiente en el efecto.

5 EFECTO DE LAS HORMONAS SEXUALES SOBRE LA ENFERMEDAD METASTÁSICA

La información aportada por nuestros resultados en enfermedad metastásica hay que interpretarla a la luz de las dos teorías más relevantes sobre la generación de enfermedad sistémica. La teoría “seed and soil” que establece una dependencia directa entre la metástasis y el grado de invasión local, de forma que, en la medida que un tumor crece, invade los vasos locales

circundantes lo que le da acceso a la circulación general. Las células tumorales se asientan en lugares en los que puede formar un microambiente favorable (Paget 1889). Contrariamente, la teoría del nicho premetastásico, establece independencia del grado de invasión local, de forma que la preparación o acondicionamiento de los futuros órganos metastatizables se inicia en el mismo momento en el que el tumor empieza a desarrollarse. La fase inicial dependería de las propias células tumorales que secretarían las citoquinas necesarias, posteriormente el nicho sería mantenido por un microambiente educado a tal efecto que aportaría ya no sólo mediadores químicos, sino componentes celulares que incrementarían las capacidades del nicho. En este sentido se ha demostrado cómo las células perivasculares pierden su morfología en respuesta a la secreción de citoquinas tumorales y adquieren capacidad de migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular, colaborando a la formación de los nichos premetastásicos (Murgai et al. 2017; Hill et al. 2020). Asimismo Sai evidencia que las células madre mesenquimales de médula ósea, mediante estímulo citoquímico, son reclutadas por las células tumorales y estimuladas a diferenciarse en múltiples estirpes que nutren el microambiente tumoral. Al mismo tiempo son “educadas” por el tumor, adquiriendo capacidades de movilización a sitios distantes en los que promueven ambientes inmunosupresores gracias a la proliferación de MDSC-neutrófilos, y ambientes protumorales gracias a la secreción de CXCL5, óxido nítrico y GM-CSF (Sai et al. 2019). Hill aporta una extraordinaria revisión del papel que desempeña cada uno de los componentes del microambiente en la promoción de las capacidades metastásicas en cáncer de mama, enfatizando el papel determinante de los MAT y los NAT en la génesis y coordinación de los recursos que favorecen la formación de metástasis (Hill et al. 2020).

Considerando la repercusión de las hormonas sexuales sobre el desarrollo de metástasis, nuestros resultados sugieren que probablemente ambas teorías desempeñarían un papel en la génesis de enfermedad metastásica. El efecto antitumoral de progesterona sólo se produce en los modelos en que existe tumor primario, de lo que parece deducirse que progesterona no es capaz de promover un efecto antimetastásico difuso y universal en ausencia de tumor, sino que lo haría bloqueando las vías de comunicación que el tumor local trata

de organizar con sus futuros nichos. Por otro lado no hemos pormenorizado en la investigación que relaciona el grado de invasión local con la capacidad metastásica, ya que no hemos planteado un supuesto en el que la administración hormonal comenzase con un tumor muy desarrollado localmente y posteriormente evaluásemos las metástasis, por tanto sólo podemos afirmar que se produce efecto antitumoral a distancia en presencia de tumores poco invasivos. En este sentido parece razonable que, en la medida que un tumor crece e invade estructuras vasculares, sea más probable desarrollar metástasis y por tanto si a nivel local progesterona frena su desarrollo, es lógico que desarrolle menos metástasis. En el caso de testosterona, en apariencia, no se mostró efecto protumoral en el contexto metastásico, pero cabe la duda de si el efecto protumoral podría ser más tiempo dependiente que en volumen dependiente, es decir, las metástasis podrían haberse generado antes con testosterona. Este aspecto tampoco lo estudiamos.

Así pues nuestro trabajo sugiere, de nuevo, un papel significativo para el microambiente, esta vez en la gestión de metástasis sistémicas, bien en la adquisición de un comportamiento tumoral invasor, bien en la “educación” de otros componentes para que puedan acomodar el nicho premetastásico. Sin embargo los efectos particulares de testosterona o progesterona sobre la génesis de las metástasis, no pueden contextualizarse, ya que no existen trabajos específicos publicados sobre este aspecto.

6 CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Nuestro trabajo inicia una línea de investigaciones cuyo fin es aportar soluciones al estudio deficitario que existe en una cuestión tan importante como el impacto del sexo en el pronóstico oncológico. Muchas de las investigaciones previas no han abordado este problema de forma experimental sistemática, por lo que podemos encontrar resultados dispares o trabajos con resultados superficiales no contextualizables de forma que, los nuevos conocimientos que van surgiendo en la investigación oncológica no pueden ser observados bajo el prisma del sexo, sirva como ejemplo la evaluación condicionada por el sexo del microambiente tumoral.

Si bien es cierto que la implicación de las hormonas sexuales es evidente dada su capacidad coordinadora, la universal distribución de sus receptores sexuales y el vínculo deducido a raíz de los cambios pronósticos relacionados con la edad, sus mecanismos y oportunidades terapéuticas no han sido suficientemente analizados o rentabilizados. Es cierto que abordar esta cuestión empleando una metodología exigente puede ser complejo y, en ocasiones, no puede abordarse en toda su dimensión. En este sentido, nuestro trabajo propone un modelo que destaca por varios motivos: reproduce fielmente las diferencias pronósticas vinculadas al sexo, demuestra su dependencia (al menos parcial) de hormonas sexuales, es aplicable al humano al ser generado con células humanas y permite observar la interferencia que las hormonas sexuales causan en la relación tumor huésped puesto que sus clones tumorales son independientes de hormonas sexuales. Sobre esta base es posible pormenorizar en los mecanismos pero, en la extrapolación de nuestros resultados debemos también tener en cuenta sus limitaciones. Por un lado las carencias del sistema inmune del ratón NSG que no nos permitirán analizar todas las perspectivas y que podrán condicionar parcialmente alguna de las hipótesis. Por otro lado, si estamos enfatizando la importancia del sexo, tendremos que considerar la relevancia del sexo de las células tumorales que estamos empleando. Este ya es un fenómeno descrito en la literatura de investigación oncológica, hasta el punto que algunos autores han sugerido que la literatura científica tiene sexo (Miller 2014). En nuestro caso ambas líneas, BLM y SK-MEL-103 son células derivados de machos y nuestros resultados tendremos que ratificarlos con líneas tumorales de hembras.

Nuestras hipótesis sugieren un papel relevante para el microambiente, si bien es cierto que en este momento del desarrollo de la investigación todavía no podemos aportar los datos histológicos de nuestra colección de muestras, pero nuestros resultados, considerando la independencia hormonal de la línea celular, son muy sugerentes. Se abre así un campo en el que podremos confirmar y generar nuevas hipótesis sobre el papel protumoral de la testosterona, que nuestros resultados respaldan. Asimismo podremos colaborar en el entendimiento del papel oncológico de los estrógenos, que nosotros no hemos podido corroborar como protumoral como otros autores han

señalado y finalmente, potenciamos una vía poco explorada y explotada, la progesterona. Quizá por su papel en el entorno de la reproducción no ha tenido tanto desarrollo en oncología pero su impacto en la mediación de la interrelación tumor-huésped parece muy prometedor.

En resumen, este trabajo demuestra que las hormonas sexuales son uno de los factores que condicionan el papel del sexo sobre el pronóstico de los tumores. Aunque el desarrollo de la primera fase de esta línea de investigación es prometedor y con una potencial aplicación clínica muy significativa, aún falta saber el mecanismo por el cual las hormonas condicionan la progresión tumoral.

CONCLUSIONES

- 1** El modelo de xenotransplante desarrollado con melanoma cutáneo sobre ratones NSG reproduce las observaciones clínico-epidemiológicas descritas en la literatura oncológica. De esta forma, nuestro modelo, se convierte en una excelente herramienta sobre la que poder investigar los mecanismos responsables.
- 2** El crecimiento de las células de melanoma humano empleadas en nuestro trabajo no está condicionado por niveles fisiológicos de hormonas sexuales.
- 3** La progesterona, en hembras, tiene un perfil antitumoral y es extensible a la enfermedad metastásica sistémica.
- 4** La testosterona, en machos, muestra un perfil protumoral pero no parece tener influencia sobre la enfermedad metastásica sistémica.
- 5** El estradiol no presenta efecto sobre el tumor en nuestro modelo de xenotransplante con melanoma cutáneo.
- 6** Las hormonas sexuales, progesterona o testosterona, son factor necesario pero no suficiente para que el efecto descrito sobre el pronóstico oncológico se manifieste. . La consecuencia última de este hecho es que el efecto observado, pro o anti tumoral, es sexo específico.

BIBLIOGRAFÍA

- Altinoz, Meric A., Aysel Ozpinar, and Ilhan Elmaci. 2019. "Reproductive Epidemiology of Glial Tumors May Reveal Novel Treatments: High-Dose Progestins or Progesterone Antagonists as Endocrino-Immune Modifiers against Glioma." *Neurosurgical Review* 42 (2): 351–69. <https://doi.org/10.1007/s10143-018-0953-1>.
- Amin, Mahul B., Frederick L. Greene, Stephen B. Edge, Carolyn C. Compton, Jeffrey E. Gershenwald, Robert K. Brookland, Laura Meyer, Donna M. Gress, David R. Byrd, and David P. Winchester. 2017. "The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge from a Population-Based to a More 'Personalized' Approach to Cancer Staging." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 67 (2): 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>.
- Avilés-Izquierdo, J. A., L. M. Nieto-Benito, P. Lázaro-Ochaita, J. L. Escat-Cortés, I. Marquez-Rodas, and E. Mercader-Cidoncha. 2020. "Prognostic Significance of Sentinel Node Biopsy Status in Cutaneous Melanoma: A 21-Years Prospective Study from a Single Institution." *Clinical and Translational Oncology*, February. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02306-w>.
- Balkwill, F, and A Mantovani. 2001. "Inflammation and Cancer: Back to Virchow?" *Lancet (London, England)* 357 (9255): 539–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04046-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04046-0).
- Behringer, Richard, Marina Gertsenstein, Kristina Vintersten Nagy, and Andras Nagy. 2014. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Fourth Edition*. Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press Bookstore. 4th ed. Cold Spring Harbor, New York. <https://www.cshlpress.org/>.
- Benakanakere, Indira, Cynthia Besch-Williford, Jennifer Schnell, Sandra Brandt, Mark R Eilersieck, Alfredo Molinolo, and Salman M Hyder. 2006. "Natural and Synthetic Progestins Accelerate 7,12-Dimethylbenz[a]Anthracene-Initiated Mammary Tumors and Increase Angiogenesis in Sprague-Dawley Rats." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American*

Association for Cancer Research 12 (13): 4062–71.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0427>.

Bosch, F X, A Lorincz, N Muñoz, C J L M Meijer, and K V Shah. 2002. “The Causal Relation between Human Papillomavirus and Cervical Cancer.”

Journal of Clinical Pathology 55 (4): 244–65.

<https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.244>.

Botteri, Edoardo, Nathalie C Støer, Solveig Sakshaug, Sidsel Graff-Iversen, Siri Vangen, Solveig Hofvind, Giske Ursin, and Elisabete Weiderpass. 2017.

“Menopausal Hormone Therapy and Risk of Melanoma: Do Estrogens and Progestins Have a Different Role?” *International Journal of Cancer* 141 (9):

1763–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.30878>.

Brisken, Cathrin, Kathryn Hess, and Rachel Jeitziner. 2015. “Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis.”

Endocrinology. Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1392>.

Bui, Kim Tam, Melina L Willson, Shom Goel, Jane Beith, and Annabel Goodwin. 2020. “Ovarian Suppression for Adjuvant Treatment of Hormone Receptor-

Positive Early Breast Cancer.” *Cochrane Database of Systematic Reviews*,

March. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013538>.

Buoncervello, Maria, Matteo Marconi, Alessandra Carè, Paola Piscopo, Walter Malorni, and Paola Matarrese. 2017. “Preclinical Models in the Study of

Sex Differences.” *Clinical Science* 131 (6): 449–69.

<https://doi.org/10.1042/CS20160847>.

Cáceres, Alejandro, Aina Jene, Tonu Esko, Luis A Pérez-Jurado, and Juan R González. 2020. “Extreme Downregulation of Chromosome Y and Cancer

Risk in Men.” *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 26 (9).

<https://doi.org/10.1093/jnci/djz232>.

Carmeci, C, D A Thompson, H Z Ring, U Francke, and R J Weigel. 1997.

“Identification of a Gene (GPR30) with Homology to the G-Protein-Coupled Receptor Superfamily Associated with Estrogen Receptor Expression in

Breast Cancer.” *Genomics* 45 (3): 607–17.

<https://doi.org/10.1006/geno.1997.4972>.

Chamekh, Mustapha, Maud Deny, Marta Romano, Nicolas Lefèvre, Francis Corazza, Jean Duchateau, and Georges Casimir. 2017. "Differential Susceptibility to Infectious Respiratory Diseases between Males and Females Linked to Sex-Specific Innate Immune Inflammatory Response." *Frontiers in Immunology* 8 (DEC): 1806.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01806>.

Chaves, Jorge, and Muhammad Wasif Saif. 2011. "IGF System in Cancer: From Bench to Clinic." *Anti-Cancer Drugs* 22 (3): 206–12.
<https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32834258a1>.

Chen, Daniel S, and Ira Mellman. 2013. "Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle." *Immunity* 39 (1): 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>.

Clocchiatti, Andrea, Elisa Cora, Yosra Zhang, and G. Paolo Dotto. 2016. "Sexual Dimorph." *Nature Reviews Cancer* 16 (5): 330–39.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.30>.

Cook, Michael B, Katherine A McGlynn, Susan S Devesa, Neal D Freedman, and William F Anderson. 2011. "Sex Disparities in Cancer Mortality and Survival." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 20 (8): 1629–37.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0246>.

Coussens, Lisa M, and Zena Werb. 2002. "Inflammation and Cancer." *Nature* 420 (6917): 860–67. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.

Demir, Ramazan, Aylin Yaba, and Berthold Huppertz. 2010. "Vasculogenesis and Angiogenesis in the Endometrium during Menstrual Cycle and Implantation." *Acta Histochemica* 112 (3): 203–14.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.04.004>.

Dennison, Una, Declan P. McKernan, Paul Scully, Gerard Clarke, John Cryan, and Timothy Dinan. 2012. "Menstrual Cycle Influences Toll-like Receptor

Responses.” *NeuroImmunoModulation* 19 (3): 171–79.

<https://doi.org/10.1159/000331424>.

Dika, Emi, Pier Alessandro Fanti, Sabina Vaccari, Elisa Capizzi, Alessio Degiovanni, Agnese Gobbi, Bianca Maria Piraccini, et al. 2017. “Oestrogen and Progesterone Receptors in Melanoma and Nevi: An Immunohistochemical Study.” *European Journal of Dermatology* 27 (3): 254–59. <https://doi.org/10.1684/ejd.2017.3019>.

Dika, Emi, Annalisa Patrizi, Martina Lambertini, Nicholas Manuelpillai, Michelangelo Fiorentino, Annalisa Altimari, Manuela Ferracin, et al. 2019. “Estrogen Receptors and Melanoma: A Review.” *Cells* 8 (11): 1463. <https://doi.org/10.3390/cells8111463>.

Dranoff, Glenn. 2004. “Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy.” *Nature Reviews Cancer* 4 (1): 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc1252>.

Egeblad, Mikala, Elizabeth S Nakasone, and Zena Werb. 2010. “Tumors as Organs: Complex Tissues That Interface with the Entire Organism.” *Developmental Cell* 18 (6): 884–901. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>.

Eisermann, Kurtis, and Gail Fraizer. 2017. “The Androgen Receptor and VEGF: Mechanisms of Androgen-Regulated Angiogenesis in Prostate Cancer.” *Cancers* 9 (12): 32. <https://doi.org/10.3390/cancers9040032>.

Ellison, Larry F. 2016. “Differences in Cancer Survival in Canada by Sex.” *Health Reports* 27 (4): 19–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27096620>.

Enninga, Elizabeth Ann L., Justin C. Moser, Amy L. Weaver, Svetomir N. Markovic, Jerry D. Brewer, Alexey A. Leontovich, Tina J. Hieken, et al. 2017. “Survival of Cutaneous Melanoma Based on Sex, Age, and Stage in the United States, 1992–2011.” *Cancer Medicine* 6 (10): 2203–12. <https://doi.org/10.1002/cam4.1152>.

- Eurostat. 2018. "Estadísticas Sobre Causas de Muerte." 2018.
https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics/es#Principales_resultados_estad.C3.ADsticos.
- Ewing, J. 1941. "Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumors." Edited by London: W. B. Saunders Company. *Translational Research* 26 (4): 755.
<https://doi.org/10.5555/uri:pii:S0022214341908211>.
- Eyster, Kathleen M. 2016. "The Estrogen Receptors: An Overview from Different Perspectives." In *Methods in Molecular Biology*, 1366:1–10. Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3127-9_1.
- Faries, Mark B, John F Thompson, Alistair J Cochran, Robert H Andtbacka, Nicola Mozzillo, Jonathan S Zager, Tiina Jahkola, et al. 2017. "Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma." *The New England Journal of Medicine* 376 (23): 2211–22.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613210>.
- Fearon, Douglas T. 2014. "The Carcinoma-Associated Fibroblast Expressing Fibroblast Activation Protein and Escape from Immune Surveillance." *Cancer Immunology Research* 2 (3): 187–93. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0002>.
- Folkerd, Elizabeth J., and Mitch Dowsett. 2010. "Influence of Sex Hormones on Cancer Progression." *Journal of Clinical Oncology* 28 (26): 4038–44.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.4290>.
- Foo, Yong Zhi, Shinichi Nakagawa, Gillian Rhodes, and Leigh W. Simmons. 2017. "The Effects of Sex Hormones on Immune Function: A Meta-Analysis." *Biological Reviews* 92 (1): 551–71.
<https://doi.org/10.1111/brv.12243>.
- Forouzanfar, Mohammad H, Ashkan Afshin, Lily T Alexander, H Ross Anderson, Zulfiqar A Bhutta, Stan Biryukov, Michael Brauer, et al. 2016. "Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 79 Behavioural, Environmental and Occupational, and Metabolic Risks or

- Clusters of Risks, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.” *The Lancet* 388 (10053): 1659–1724.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31679-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8).
- Fujii, Shinya, and Hiroyuki Kagechika. 2019. “Androgen Receptor Modulators: A Review of Recent Patents and Reports (2012-2018).” *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 29 (6): 439–53.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1618831>.
- Gabrilovich, Dmitry I. 2017. “Myeloid-Derived Suppressor Cells.” *Cancer Immunology Research* 5 (1): 3–8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0297>.
- Galvin, Angéline, Fleur Delva, Catherine Helmer, Muriel Rainfray, Carine Bellera, Virginie Rondeau, Pierre Soubeyran, Gaëlle Coureau, and Simone Mathoulin-Pélissier. 2018. “Sociodemographic, Socioeconomic, and Clinical Determinants of Survival in Patients with Cancer: A Systematic Review of the Literature Focused on the Elderly.” *Journal of Geriatric Oncology* 9 (1): 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2017.07.007>.
- Gamba, Christina S, Christina A Clarke, Theresa H M Keegan, Li Tao, and Susan M Swetter. 2013. “Melanoma Survival Disadvantage in Young, Non-Hispanic White Males Compared with Females.” *JAMA Dermatology* 149 (8): 912–20. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.4408>.
- Geller, Stacie E, Abby Koch, Beth Pellettieri, and Molly Carnes. 2011. “Inclusion, Analysis, and Reporting of Sex and Race/Ethnicity in Clinical Trials: Have We Made Progress?” *Journal of Women’s Health* (2002) 20 (3): 315–20. <https://doi.org/10.1089/jwh.2010.2469>.
- Giese, Morgan A., Laurel E. Hind, and Anna Huttenlocher. 2019. “Neutrophil Plasticity in the Tumor Microenvironment.” *Blood* 133 (20): 2159–67.
<https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844548>.
- Gubbels Bupp, Melanie R., and Trine N. Jorgensen. 2018. “Androgen-Induced Immunosuppression.” *Frontiers in Immunology* 9 (APR): 794.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00794>.

- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2000. "The Hallmarks of Cancer." *Cell* 100 (1): 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- . 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hannah, Michele F, Vladimir B Bajic, and Sabra L Klein. 2008. "Sex Differences in the Recognition of and Innate Antiviral Responses to Seoul Virus in Norway Rats." *Brain, Behavior, and Immunity* 22 (4): 503–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.10.005>.
- Haugen, Bryan R, Erik K. Alexander, Keith C. Bible, Gerard Doherty, Susan J Mandel, Yuri E. Nikiforov, Furio Pacini, et al. 2015. "2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer." *Thyroid* 26 (1): thy.2015.0020. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.
- Hill, Billy Samuel, Annachiara Sarnella, Giuliana D'Avino, and Antonella Zannetti. 2020. "Recruitment of Stromal Cells into Tumour Microenvironment Promote the Metastatic Spread of Breast Cancer." *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.028>.
- Hornig, Huann-Cheng, Wen-Hsun Chang, Chang-Ching Yeh, Ben-Shian Huang, Chia-Pei Chang, Yi-Jen Chen, Kuan-Hao Tsui, and Peng-Hui Wang. 2017. "Estrogen Effects on Wound Healing." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (11): 2325. <https://doi.org/10.3390/ijms18112325>.
- Hudon, V, F Berthod, A F Black, O Damour, L Germain, and F A Auger. 2003. "A Tissue-Engineered Endothelialized Dermis to Study the Modulation of Angiogenic and Angiostatic Molecules on Capillary-like Tube Formation in Vitro." *The British Journal of Dermatology* 148 (6): 1094–1104. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05298.x>.
- Hussain, S P, P Amstad, K Raja, S Ambs, M Nagashima, W P Bennett, P G Shields, et al. 2000. "Increased P53 Mutation Load in Noncancerous Colon Tissue from Ulcerative Colitis: A Cancer-Prone Chronic Inflammatory

Disease.” *Cancer Research* 60 (13): 3333–37.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10910033>.

Innos, Kaire, Peeter Padrik, Vahur Valvere, and Tiiu Aareleid. 2015. “Sex Differences in Cancer Survival in Estonia: A Population-Based Study.” *BMC Cancer* 15 (1): 72. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1080-9>.

Jacobson, Eric M, Eric R Hugo, Dana C Borcharding, and Nira Ben-Jonathan. 2011. “Prolactin in Breast and Prostate Cancer: Molecular and Genetic Perspectives.” *Discovery Medicine* 11 (59): 315–24.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524385>.

Jagsi, Reshma, Amy R Motomura, Sudha Amarnath, Aleksandra Jankovic, Nathan Sheets, and Peter A Ubel. 2009. “Under-Representation of Women in High-Impact Published Clinical Cancer Research.” *Cancer* 115 (14): 3293–3301. <https://doi.org/10.1002/cncr.24366>.

Jaillon, Sébastien, Kevin Berthenet, and Cecilia Garlanda. 2019. “Sexual Dimorphism in Innate Immunity.” *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 56 (3): 308–21. <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8648-x>.

Joosse, Arjen, Sandra Collette, Stefan Suciu, Tamar Nijsten, Ferdy Lejeune, Ulrich R. Kleeberg, Jan Willem W Coebergh, Alexander M M Eggermont, and Esther De Vries. 2012. “Superior Outcome of Women with Stage I/II Cutaneous Melanoma: Pooled Analysis of Four European Organisation for Research and Treatment of Cancer Phase III Trials.” *Journal of Clinical Oncology* 30 (18): 2240–47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.0584>.

Joosse, Arjen, Sandra Collette, Stefan Suciu, Tamar Nijsten, Poulam M. Patel, Ulrich Keilholz, Alexander M M Eggermont, Jan Willem W Coebergh, and Esther de Vries. 2013. “Sex Is an Independent Prognostic Indicator for Survival and Relapse/Progression-Free Survival in Metastasized Stage III to IV Melanoma: A Pooled Analysis of Five European Organisation for Research and Treatment of Cancer Randomized Controlled Trials.” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 31 (18): 2337–46. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.5031>.

- Joshi, Kumud, Sherif S. Hassan, and Pandurangan Ramaraj. 2017. "Differential Biological Effects of Dehydroepiandrosterone (DHEA) between Mouse (B16F10) and Human Melanoma (BLM) Cell Lines." *Dermato-Endocrinology* 9 (1): e1389360.
<https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1389360>.
- Jung, Kyu-Won, Sohee Park, Aesun Shin, Chang-Mo Oh, Hyun-Joo Kong, Jae Kwan Jun, and Young-Joo Won. 2012. "Do Female Cancer Patients Display Better Survival Rates Compared with Males? Analysis of the Korean National Registry Data, 2005-2009." Edited by Olga Y. Gorlova. *PloS One* 7 (12): e52457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052457>.
- Kanda, Naoko, and Shinichi Watanabe. 2001. "17 β -Estradiol, Progesterone, and Dihydrotestosterone Suppress the Growth of Human Melanoma by Inhibiting Interleukin-8 Production." *Journal of Investigative Dermatology* 117 (2): 274–83. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01422.x>.
- Kang, Yibin, and Klaus Pantel. 2013. "Tumor Cell Dissemination: Emerging Biological Insights from Animal Models and Cancer Patients." *Cancer Cell* 23 (5): 573–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.017>.
- Klein, Sabra L, and Katie L Flanagan. 2016. "Sex Differences in Immune Responses." *Nature Reviews. Immunology* 16 (10): 626–38.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>.
- L., Liu, Shi G., Zhang Y., Liu Lai Y., Liu Lai Y., Lu X., Lihong Liu, et al. 2010. "[Effects of Medroxyprogesterone Acetate on Endothelial Progenitor Cell]." *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi = Journal of Biomedical Engineering = Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 27 (6): 1317–21.
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L560043393>.
- Laffont, Sophie, Nelly Rouquié, Pascal Azar, Cyril Seillet, Joël Plumas, Caroline Aspod, and Jean-Charles Guéry. 2014. "X-Chromosome Complement and Estrogen Receptor Signaling Independently Contribute to the Enhanced TLR7-Mediated IFN- α Production of Plasmacytoid Dendritic Cells from Women." *The Journal of Immunology* 193 (11): 5444–52.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303400>.

- Lasarte, S., D. Elsner, T. Sanchez-Elsner, A. Fernandez-Pineda, L. A. López-Fernández, A. L. Corbí, M. A. Muñoz-Fernandez, and M. Relloso. 2013. "Estradiol Downregulates NF-Kb Translocation by Ikbkg Transcriptional Repression in Dendritic Cells." *Genes and Immunity* 14 (7): 462–69. <https://doi.org/10.1038/gene.2013.35>.
- Lasarte, Sandra, Rafael Samaniego, Laura Salinas-Muñoz, Mauriel A. Guia-Gonzalez, Linnea A. Weiss, Enrique Mercader, Elena Ceballos-García, et al. 2016. "Sex Hormones Coordinate Neutrophil Immunity in the Vagina by Controlling Chemokine Gradients." *Journal of Infectious Diseases* 213 (3): 476–84. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv402>.
- Lea, Robert W., Timothy Dawson, Carlos G. Martinez-Moreno, Nasra El-Abry, and Steve Harvey. 2015. "Growth Hormone and Cancer: GH Production and Action in Glioma?" *General and Comparative Endocrinology* 220 (September): 119–23. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.06.011>.
- Lee, S. L., A. Al-Shamkhani, and A. Mirnezami. 2019. "Immuno-Oncology for Surgeons." *British Journal of Surgery* 106 (10): 1273–82. <https://doi.org/10.1002/bjs.11224>.
- Li, Zhaoyu, Geetu Tuteja, Jonathan Schug, and Klaus H. Kaestner. 2012. "Foxa1 and Foxa2 Are Essential for Sexual Dimorphism in Liver Cancer." *Cell* 148 (1–2): 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.026>.
- Liu, L-H, Y Lai, L-J Linghu, Y-F Liu, and Y Zhang. 2015. "Effect of Different Concentrations of Medroxy-Progesterone Acetate Combined with 17 β -Estradiol on Endothelial Progenitor Cells." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19 (10): 1790–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26044222>.
- Majek, Ondrej, Adam Gondos, Lina Jansen, Katharina Emrich, Bernd Holleczeck, Alexander Katalinic, Alice Nennecke, Andrea Eberle, and Hermann Brenner. 2013. "Sex Differences in Colorectal Cancer Survival: Population-Based Analysis of 164,996 Colorectal Cancer Patients in

- Germany.” Edited by Hiromu Suzuki. *PLoS ONE* 8 (7): e68077.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068077>.
- Mantovani, Alberto, Federica Marchesi, Alberto Malesci, and Luigi Laghi. 2018. “Europe PMC Funders Group Tumor-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology.” *Nat Rev Clin Oncol.* 14 (7): 399–416.
<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217.Tumor-Associated>.
- Mao, Allen, Vladislava Paharkova-Vatchkova, John Hardy, Marcia M Miller, and Susan Kovats. 2005. “Estrogen Selectively Promotes the Differentiation of Dendritic Cells with Characteristics of Langerhans Cells.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (8): 5146–51.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5146>.
- Masucci, Maria Teresa, Michele Minopoli, and Maria Vincenza Carriero. 2019. “Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy.” *Frontiers in Oncology* 9 (November): 1146.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01146>.
- Matsumoto, Takahiro, Matomo Sakari, Maiko Okada, Atsushi Yokoyama, Sayuri Takahashi, Alexander Kouzmenko, and Shigeaki Kato. 2013. “The Androgen Receptor in Health and Disease.” *Annual Review of Physiology* 75 (1): 201–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183656>.
- McAllister, Milly J., Mark A. Underwood, Hing Y. Leung, and Joanne Edwards. 2019. “A Review on the Interactions between the Tumor Microenvironment and Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer.” *Translational Research* 206 (April): 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.11.004>.
- Mertens-Walker, Inga, Robert C. Baxter, and Deborah J. Marsh. 2012. “Gonadotropin Signalling in Epithelial Ovarian Cancer.” *Cancer Letters* 324 (2): 152–59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.05.017>.
- Micheli, A., R. Ciampichini, W. Oberaigner, L. Ciccolallo, E. de Vries, I. Izzarugaza, P. Zambon, G. Gatta, and R. De Angelis. 2009. “The Advantage of Women in Cancer Survival: An Analysis of EURO CARE-4 Data.” *European Journal of Cancer* 45 (6): 1017–27.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.11.008>.

- Micheli, A., R. Ciampichini, W. Oberaigner, L. Ciccolallo, E. de Vries, I. Izzarugaza, P. Zambon, G. Gatta, R. De Angelis, and EUROCARE Working Group. 2009. "The Advantage of Women in Cancer Survival: An Analysis of EUROCARE-4 Data." *European Journal of Cancer* 45 (6): 1017–27. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.11.008>.
- Miller, Virginia M. 2014. "Why Are Sex and Gender Important to Basic Physiology and Translational and Individualized Medicine?" *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 306 (6): H781–88. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00994.2013>.
- Morvan, Maelig G., and Lewis L. Lanier. 2016. "NK Cells and Cancer: You Can Teach Innate Cells New Tricks." *Nature Reviews Cancer* 16 (1): 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>.
- Mulligan, Lois M. 2014. "RET Revisited: Expanding the Oncogenic Portfolio." *Nature Reviews Cancer* 14 (3): 173–86. <https://doi.org/10.1038/nrc3680>.
- Murgai, Meera, Wei Ju, Matthew Eason, Jessica Kline, Daniel W. Beury, Sabina Kaczanowska, Markku M. Miettinen, et al. 2017. "KLF4-Dependent Perivascular Cell Plasticity Mediates Pre-Metastatic Niche Formation and Metastasis." *Nature Medicine* 23 (10): 1176–90. <https://doi.org/10.1038/nm.4400>.
- Murthy, Vivek H, Harlan M Krumholz, and Cary P Gross. 2004. "Participation in Cancer Clinical Trials: Race-, Sex-, and Age-Based Disparities." *JAMA* 291 (22): 2720–26. <https://doi.org/10.1001/jama.291.22.2720>.
- Natale, Christopher A., Elizabeth K. Duperret, Junqian Zhang, Rochelle Sadeghi, Ankit Dahal, Kevin Tyler O'Brien, Rosa Cookson, Jeffrey D. Winkler, and Todd W. Ridky. 2016. "Sex Steroids Regulate Skin Pigmentation through Nonclassical Membrane-Bound Receptors." *ELife* 5 (APRIL2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.15104>.

- National Cancer Institute. 2019a. "Desigualdades Por Cáncer." 2019. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/desigualdades>.
- . 2019b. "Risk Factors: Age." 2019. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age>.
- . 2019c. "Risk Factors: Infectious Agents." 2019. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/infectious-agents>.
- . 2019d. "Risk Factors: Radiation." 2019. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/radiation>.
- . 2019e. "The Genetics of Cancer." 2019. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>.
- "NOD.Cg-Prkdc<scid> Il2rg<tm1Wjl>/SzJ." n.d. <https://www.jax.org/strain/005557>.
- Nosrati, Adi, and Maria L. Wei. 2014. "Sex Disparities in Melanoma Outcomes: The Role of Biology." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 563: 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.018>.
- Nowak, Judyta, Barbara Borkowska, and Boguslaw Pawlowski. 2016. "Leukocyte Changes across Menstruation, Ovulation, and Mid-Luteal Phase and Association with Sex Hormone Variation." *American Journal of Human Biology : The Official Journal of the Human Biology Council* 28 (5): 721–28. <https://doi.org/10.1002/ajhb.22856>.
- Nugent, Bridget M., Christopher L. Wright, Amol C. Shetty, Georgia E. Hodes, Kathryn M. Lenz, Anup Mahurkar, Scott J. Russo, Scott E. Devine, and Margaret M. McCarthy. 2015. "Brain Feminization Requires Active Repression of Masculinization via DNA Methylation." *Nature Neuroscience* 18 (5): 690–97. <https://doi.org/10.1038/nn.3988>.
- Nurmik, Martin, Pit Ullmann, Fabien Rodriguez, Serge Haan, and Elisabeth Letellier. 2020. "In Search of Definitions: Cancer-associated Fibroblasts and Their Markers." *International Journal of Cancer* 146 (4): 895–905.

<https://doi.org/10.1002/ijc.32193>.

Oberaigner, W., and U. Siebert. 2011. "Do Women with Cancer Have Better Survival as Compared to Men after Adjusting for Staging Distribution?" *The European Journal of Public Health* 21 (3): 387–91.

<https://doi.org/10.1093/eurpub/ckq099>.

Paget, Stephen. 1889. "THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST." *The Lancet* 133 (3421): 571–73.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0).

Paharkova-Vatchkova, Vladislava, Ruben Maldonado, and Susan Kovats. 2004. "Estrogen Preferentially Promotes the Differentiation of CD11c+ CD11b(Intermediate) Dendritic Cells from Bone Marrow Precursors."

Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) 172 (3): 1426–36.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1426>.

Palethorpe, Helen M, Paul A Drew, and Eric Smith. 2017. "Androgen Signaling in Esophageal Adenocarcinoma Cell Lines In Vitro." *Digestive Diseases and Sciences* 62 (12): 3402–14. <https://doi.org/10.1007/s10620-017-4794-5>.

Patente, Thiago A., Mariana P. Pinho, Aline A. Oliveira, Gabriela C.M. Evangelista, Patrícia C. Bergami-Santos, and José A.M. Barbuto. 2019. "Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy." *Frontiers in Immunology* 10 (JAN): 3176. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03176>.

Penna, Claudia, Giuseppe Alloatti, and Antonio Crisafulli. 2020. "Mechanisms Involved in Cardioprotection Induced by Physical Exercise." *Antioxidants & Redox Signaling* 32 (15): 1115–34. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.8009>.

Popp Marin, Douglas, Anaysa Paola Bolin, Rita De Cassia Macedo Dos Santos, Rui Curi, and Rosemari Otton. 2010. "Testosterone Suppresses Oxidative Stress in Human Neutrophils." *Cell Biochemistry and Function* 28 (5): 394–402. <https://doi.org/10.1002/cbf.1669>.

- Puré, Ellen, and Albert Lo. 2016. "Can Targeting Stroma Pave the Way to Enhanced Antitumor Immunity and Immunotherapy of Solid Tumors?" *Cancer Immunology Research* 4 (4): 269–78. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0011>.
- Ramaraj, Pandurangan. 2018. "Is Melanoma a Hormone-Dependent Cancer or a Hormone-Responsive Cancer?" In *Cancer Prognosis*, edited by Guy-Joseph Lemamy. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76499>.
- Ramaraj, Pandurangan, and James L. Cox. 2014a. "In Vitro Effect of Progesterone on Human Melanoma (BLM) Cell Growth." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7 (11): 3941–53.
- Ramaraj, Pandurangan, and James L. Cox. 2014b. "In Vitro Effect of Progesterone on Human Melanoma (BLM) Cell Growth." *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7 (11): 3941–53. www.ijcem.com.
- Randall, D. 2008. "The X-Files in Immunity." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 148 (4): 461–62. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.051>.
- Relloso, Miguel, Laura Aragoneses-Fenoll, Sandra Lasarte, Christelle Bourgeois, Gema Romera, Karl Kuchler, Angel L Corbí, et al. 2012. "Estradiol Impairs the Th17 Immune Response against *Candida Albicans*." *Journal of Leukocyte Biology* 91 (1): 159–65. <https://doi.org/10.1189/jlb.1110645>.
- Rettew, Jennifer A., Yvette M. Huet-Hudson, and Ian Marriott. 2008. "Testosterone Reduces Macrophage Expression in the Mouse of Toll-Like Receptor 4, a Trigger for Inflammation and Innate Immunity." *Biology of Reproduction* 78 (3): 432–37. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.063545>.
- Robinson, Dionne P, and Sabra L Klein. 2012a. "Pregnancy and Pregnancy-Associated Hormones Alter Immune Responses and Disease Pathogenesis." *Hormones and Behavior* 62 (3): 263–71.

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.023>.

———. 2012b. “Pregnancy and Pregnancy-Associated Hormones Alter Immune Responses and Disease Pathogenesis.” *Hormones and Behavior* 62 (3): 263–71. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.023>.

Rodríguez-Lomba, E., I. Marquez-Rodas, E. Mercader-Cidoncha, R. Suárez-Fernández, and J. A. Avilés-Izquierdo. 2017. “Why Do Patients with Thick Melanoma Have Different Outcomes? A Retrospective Epidemiological and Survival Analysis.” *Clinical and Translational Oncology* 19 (8): 1055–57. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1637-y>.

Roh, Mi Ryung, Philip Eliades, Sameer Gupta, Jane M. Grant-Kels, and Hensin Tsao. 2015. “Cutaneous Melanoma in Women.” *International Journal of Women’s Dermatology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2015.01.001>.

Roma-Rodrigues, Catarina, Rita Mendes, Pedro V. Baptista, and Alexandra R. Fernandes. 2019. “Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy.” *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>.

Rothenberger, Natalie J, Ashwin Somasundaram, and Laura P Stabile. 2018. “The Role of the Estrogen Pathway in the Tumor Microenvironment.” <https://doi.org/10.3390/ijms19020611>.

Roved, Jacob, Helena Westerdahl, and Dennis Hasselquist. 2017. “Sex Differences in Immune Responses: Hormonal Effects, Antagonistic Selection, and Evolutionary Consequences.” *Hormones and Behavior* 88: 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.017>.

Sai, Buqing, Yafei Dai, Songqing Fan, Fan Wang, Lujuan Wang, Zheng Li, Jingqun Tang, et al. 2019. “Cancer-Educated Mesenchymal Stem Cells Promote the Survival of Cancer Cells at Primary and Distant Metastatic Sites via the Expansion of Bone Marrow-Derived-PMN-MDSCs.” *Cell Death & Disease* 10 (12): 941. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2149-1>.

- Salinas-Muñoz, Laura, Raúl Campos-Fernández, Enrique Mercader, Irene Olivera-Valle, Carlota Fernández-Pacheco, Lara Matilla, Julio García-Bordas, et al. 2018. "Estrogen Receptor-Alpha (ESR1) Governs the Lower Female Reproductive Tract Vulnerability to *Candida Albicans*." *Frontiers in Immunology* 9 (MAY): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01033>.
- Sánchez-García, Isidro. 2009. "The Crossroads of Oncogenesis and Metastasis." *The New England Journal of Medicine* 360 (3): 297–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr0808031>.
- Sandberg, Kathryn, and Jason G Umans. 2015. "Recommendations Concerning the New U.S. National Institutes of Health Initiative to Balance the Sex of Cells and Animals in Preclinical Research." *The FASEB Journal* 29 (5): 1646–52. <https://doi.org/10.1096/fj.14-269548>.
- Scarpin, Katherine M., J. Dinny Graham, Patricia A. Mote, and Christine L. Clarke. 2009. "Progesterone Action in Human Tissues: Regulation by Progesterone Receptor (PR) Isoform Expression, Nuclear Positioning and Coregulator Expression." *Nuclear Receptor Signaling*. <https://doi.org/10.1621/nrs.07009>.
- Schiwon, Marzena, Christina Weisheit, Lars Franken, Sebastian Gutweiler, Akanksha Dixit, Catherine Meyer-Schwesinger, Judith-Mira Pohl, et al. 2014. "Crosstalk between Sentinel and Helper Macrophages Permits Neutrophil Migration into Infected Uroepithelium." *Cell* 156 (3): 456–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.006>.
- Schmuck, Rosa, Michael Gerken, Eva Maria Teegen, Isabell Krebs, Monika Klinkhammer-Schalke, Felix Aigner, Johann Pratschke, Beate Rau, and Stefan Benz. 2020. "Gender Comparison of Clinical, Histopathological, Therapeutic and Outcome Factors in 185,967 Colon Cancer Patients." *Langenbeck's Archives of Surgery* 405 (1): 71–80. <https://doi.org/10.1007/s00423-019-01850-6>.
- Schurz, Haiko, Muneeb Salie, Gerard Tromp, Eileen G. Hoal, Craig J. Kinnear, and Marlo Möller. 2019a. "The X Chromosome and Sex-Specific Effects in Infectious Disease Susceptibility." *Human Genomics* 13 (1): 2.

<https://doi.org/10.1186/s40246-018-0185-z>.

———. 2019b. “The X Chromosome and Sex-Specific Effects in Infectious Disease Susceptibility.” *Human Genomics*. NLM (Medline).

<https://doi.org/10.1186/s40246-018-0185-z>.

SEOM, Sociedad Española de Oncología Médica. 2018. “Cifras de Cáncer En España SEOM 2018.” 2018. <https://doi.org/M-3161-2018>.

Shin, Seong Ah, Sun Young Moon, Daeho Park, Jong Bae Park, and Chang Sup Lee. 2019. “Apoptotic Cell Clearance in the Tumor Microenvironment: A Potential Cancer Therapeutic Target.” *Archives of Pharmacal Research*. Pharmaceutical Society of Korea. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01169-2>.

Skjefstad, Kaja, Elin Richardsen, Tom Donnem, Sigve Andersen, Yury Kiselev, Thea Grindstad, Sigurd M. Hald, et al. 2015. “The Prognostic Role of Progesterone Receptor Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Patients: Gender-Related Impacts and Correlation with Disease-Specific Survival.” *Steroids* 98 (June): 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.01.020>.

Smirnova, T. G., A. Yu Savochkina, I. I. Dolgushin, K. V. Nikushkina, and I. V. Samuseva. 2018. “Changes in Functional Activity of Neutrophils and Monocytes Isolated from the Peripheral Blood of Women at Different Phases of the Menstrual Cycle.” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 166 (2): 222–24. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4318-0>.

Torcia, Maria Gabriella, Lucia Nencioni, Ann Maria Clemente, Livia Civitelli, Ignacio Celestino, Dolores Limongi, Giulia Fadigati, et al. 2012. “Sex Differences in the Response to Viral Infections: TLR8 and TLR9 Ligand Stimulation Induce Higher IL10 Production in Males.” *PLoS One* 7 (6): e39853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039853>.

Veglia, Filippo, and Dmitry I. Gaborovich. 2017. “Dendritic Cells in Cancer: The Role Revisited.” *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.01.002>.

- Verbrugge, L. M. 1982. "Sex Differentials in Health." *Public Health Reports* (Washington, D.C. : 1974) 97 (5): 417–37.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6750677>.
- Wada-Hiraike, Osamu, Otabek Imamov, Haruko Hiraike, Kjell Hultenby, Thomas Schwend, Yoko Omoto, Margaret Warner, and Jan Åke Gustafsson. 2006. "Role of Estrogen Receptor β in Colonic Epithelium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2959–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511271103>.
- Wagner, A D, S Oertelt-Prigione, A Adjei, T Buclin, V Cristina, C Csajka, G Coukos, et al. 2019. "Gender Medicine and Oncology: Report and Consensus of an ESMO Workshop." *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (12): 1914–24.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdz414>.
- Waldmann, Thomas A. 2018. "Cytokines in Cancer Immunotherapy." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (12).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028472>.
- Walker, Cameron, Elijah Mojares, and Armando Del Río Hernández. 2018. "Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression." *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms19103028>.
- Wang, Pan, Xinyu Zhang, Nan Sun, Zhihong Zhao, and Jie He. 2020. "Comprehensive Analysis of the Tumor Microenvironment in Cutaneous Melanoma Associated with Immune Infiltration." *Journal of Cancer* 11 (13): 3858–70. <https://doi.org/10.7150/jca.44413>.
- Wang, Yue, Hong Liao, Holly C Zheng, Linmin Li, Lin Jia, Zhengbo Zhang, and Wenxin Zheng. 2015. "Effect of Luteinizing Hormone-Induced Prohibitin and Matrix Metalloproteinases on Ovarian Epithelial Tumor Cell Proliferation." *American Journal of Cancer Research* 5 (1): 114–24.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628924>.
- Ward, William H., and Jeffrey M. Farma, eds. 2017. *Cutaneous Melanoma:*

Etiology and Therapy. Codon Publications.

<https://doi.org/10.15586/codon.cutaneousmelanoma.2017>.

Wen, Simeng, Hong-Chiang Chang, Jing Tian, Zhiqun Shang, Yuanjie Niu, and Chawnshang Chang. 2015. "Stromal Androgen Receptor Roles in the Development of Normal Prostate, Benign Prostate Hyperplasia, and Prostate Cancer." *The American Journal of Pathology* 185 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.10.012>.

World Health Organization. 2018a. "Cancer." 2018.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

———. 2018b. "Cancer Today." 2018. <https://gco.iarc.fr/today/home>.

———. 2018c. "Cancer Today." 2018. <http://gco.iarc.fr/today/home>.

———. 2018d. "Las 10 Principales Causas de Defunción." 2018.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

———. 2020a. "Cancer Prevention." 2020.

<https://www.who.int/cancer/prevention/en/>.

———. 2020b. "Global Cancer Observatory." 2020. <https://gco.iarc.fr/>.

Wu, Guilin, Mo Chen, Xiaoqiang Wang, Erliang Kong, Weifeng Yu, Yuming Sun, and Feixiang Wu. 2020. "Effect of Remote Ischemic Preconditioning on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Patients Undergoing Liver Resection: A Randomized Controlled Trial." *Minerva Anestesiologica* 86 (3): 252–60. <https://doi.org/10.23736/S0375-9393.19.13838-2>.

Wu, Ting, and Yun Dai. 2017. "Tumor Microenvironment and Therapeutic Response." *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>.

Yahya, Shaymaa M.M., Abdou O. Abdelhamid, Mervat M. Abd-Elhalim, Ghada H. Elsayed, and Emad F. Eskander. 2017. "The Effect of Newly Synthesized Progesterone Derivatives on Apoptotic and Angiogenic Pathway in MCF-7 Breast Cancer Cells." *Steroids* 126: 15–23.

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.08.002>.

Yang, Yafan, Guiying Wang, Jingli He, Shuguang Ren, Fengpeng Wu, Jianfeng Zhang, and Feifei Wang. 2017. "Gender Differences in Colorectal Cancer Survival: A Meta-Analysis." *International Journal of Cancer* 141 (10): 1942–49. <https://doi.org/10.1002/ijc.30827>.

Yeh, Chiu-an-Ren, Spencer Slavin, Jun Da, lawen Hsu, Jie Luo, Guang-Qian Xiao, Jie Ding, Fu-Ju Chou, and Shuyuan Yeh. 2016. "Estrogen Receptor α in Cancer Associated Fibroblasts Suppresses Prostate Cancer Invasion via Reducing CCL5, IL6 and Macrophage Infiltration in the Tumor Microenvironment." *Molecular Cancer* 15 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0488-9>.

Yin, Zhongping, Ling Bai, Wei Li, Tanlun Zeng, Huimin Tian, and Jiuwei Cui. 2019. "Targeting T Cell Metabolism in the Tumor Microenvironment: An Anti-Cancer Therapeutic Strategy." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1409-3>.

Yoshida, Sumiko, Yasumasa Ikeda, and Ken-ichi Aihara. 2016a. "Roles of the Androgen--Androgen Receptor System in Vascular Angiogenesis." *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 23 (3): 257–65. <https://doi.org/10.5551/jat.31047>.

Yoshida, Sumiko, Yasumasa Ikeda, and Ken Ichi Aihara. 2016b. "Roles of the Androgen–Androgen Receptor System in Vascular Angiogenesis." *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. Japan Atherosclerosis Society. <https://doi.org/10.5551/jat.31047>.

Yoshida, Toshimichi, Tatsuya Akatsuka, and Kyoko Imanaka-Yoshida. 2015. "Tenascin-C and Integrins in Cancer." *Cell Adhesion & Migration* 9 (1–2): 96–104. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1008332>.

Zafon, Carles, and Gabriel Obiols. 2009. "Vía de Señalización Dependiente de La Proteincinasa de Activación Mitogénica En El Carcinoma Papilar de Tiroides. De Las Bases Moleculares a La Práctica Clínica." *Endocrinología*

y *Nutricion*. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(09\)70982-9](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)70982-9).

- Zazzo, Erika Di, Rita Polito, Silvia Bartollino, Ersilia Nigro, Carola Porcile, Andrea Bianco, Aurora Daniele, and Bruno Moncharmont. 2019. "Adiponectin as Link Factor between Adipose Tissue and Cancer." *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20040839>.
- Zhai, Wei, Yin Sun, Changcheng Guo, Guanghui Hu, Mingchao Wang, Jiayi Zheng, Wan Ying Lin, et al. 2017. "LncRNA-SARCC Suppresses Renal Cell Carcinoma (RCC) Progression via Altering the Androgen Receptor (AR)/MiRNA-143-3p Signals." *Cell Death and Differentiation* 24 (9): 1502–17. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.74>.
- Zhang, YongHong, Feng Wei, Jing Zhang, Lanxiang Hao, Jie Jiang, Liansheng Dang, Dan Mei, ShanShan Fan, Yajin Yu, and Ling Jiang. 2017. "Bisphenol A and Estrogen Induce Proliferation of Human Thyroid Tumor Cells via an Estrogen-Receptor-Dependent Pathway." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 633 (February): 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.09.002>.
- Zhang, Yongshu, Gabriel Eades, Yuan Yao, Qinglin Li, and Qun Zhou. 2012. "Estrogen Receptor α Signaling Regulates Breast Tumor-Initiating Cells by down-Regulating MiR-140 Which Targets the Transcription Factor SOX2." *Journal of Biological Chemistry* 287 (49): 41514–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404871>.
- Zhang, Zhe, Qinsi He, Si Fu, and Zhi Zheng. 2017. "Estrogen Receptors in Regulating Cell Proliferation of Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Involvement of Intracellular Ca²⁺ Signaling." *Pathology and Oncology Research* 23 (2): 329–34. <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0105-2>.
- Zheng, Daoshan, Cecilia Williams, Jeremy A Vold, Justin H Nguyen, Denise M Harnois, Sanjay P Bagaria, Sarah A McLaughlin, and Zhaoyu Li. 2018. "Regulation of Sex Hormone Receptors in Sexual Dimorphism of Human Cancers." *Cancer Letters* 438: 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.09.001>.

Zhu, Jianguo, Yunlin Wang, Shuxiong Xu, and Zhaolin Sun. 2012. "Intermittent Androgen Blockade or Continuous Androgen Blockade in Advanced Prostate Cancer: A Meta-Analysis of Efficacy, Quality of Life and Side Effects." *Journal of B.U.ON. : Official Journal of the Balkan Union of Oncology* 17 (2): 350–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740217>.

Zhuo, Yingchen, Xueqian Li, Qiaowei Zheng, Xingjun Fan, Wenbing Ma, Jingguo Chen, Xue Zhao, et al. 2018. "Estrogen Enhances Tumor Growth and Angiogenesis Indirectly via Mediation of Bone Marrow-Derived Cells as Well as Directly through Stimulation of Tumor and Endothelial Cells." *Oncology Reports* 40 (4): 2147–56. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6631>.
