

EJEMPLOS DE DIMORFISMO SEXUAL BIOLÓGICO: CÁNCER DE HÍGADO Y SISTEMA INMUNITARIO

Magdalena Leiva^{1,2,3} y Francisco Javier Cubero^{1,2,3,4}

¹Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

²Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica (IUIIN), Universidad Complutense de Madrid

³Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM), Madrid

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red para el estudio de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid

<https://doi.org/10.18567/sebbmrev.228.202603.dc3>



El carcinoma hepatocelular (CHC) es el cáncer de hígado más frecuente y el quinto tipo de cáncer más común, siendo una de las enfermedades oncológicas más graves a nivel mundial con una elevada mortalidad. Su aparición está relacionada con múltiples factores como las hepatitis virales, el consumo excesivo de alcohol, la obesidad y otras enfermedades hepáticas crónicas. Sin embargo, un aspecto que ha pasado desapercibido durante décadas es el incremento en riesgo y mortalidad asociado al sexo, y que hace que los hombres sean más proclives al desarrollo de este tipo de cáncer.

De hecho, numerosos estudios han demostrado que el CHC es mucho más frecuente en hombres que en mujeres. Esta diferencia no se debe únicamente a hábitos de vida distintos, sino también a factores biológicos propios de cada sexo. En particular, las hormonas sexuales así como la expresión diferencial de determinadas enzimas o proteínas que desempeñan un papel importante en este dimorfismo sexual. A nivel hormonal está ampliamente descrito que, los andrógenos, predominantes en varones, pueden favorecer procesos inflamatorios y de crecimiento celular en el hígado, mientras que los estrógenos, más abundantes

en mujeres, ejercen un efecto protector frente al daño hepático y al desarrollo tumoral. Por si esto fuera poco, la respuesta inmunitaria también es género-dependiente, jugando la disparidad hormonal un papel fundamental que afecta a la respuesta hepática tanto a insultos crónicos como a su capacidad de regeneración.

Comprender cómo el sexo influye en el desarrollo del cáncer hepático no sólo permite explicar mejor las desigualdades observadas en el desarrollo de la enfermedad, sino que también abre la puerta a estrategias de prevención y tratamientos más personalizados, mejorando así el abordaje global de esta patología. Para ello, es necesario disponer de modelos preclínicos que nos permitan reproducir la fisiopatología en humanos y que nos ayuden a identificar los mecanismos moleculares implicados en este dimorfismo sexual.

En Biomedicina, la investigación preclínica se ha llevado a cabo principalmente en animales macho durante décadas. Sin embargo, el empleo de machos y hembras, principalmente en roedores, ha aumentado de manera muy significativa en los últimos años. Tradicionalmente, se pensaba que el uso de hembras en modelos animales aumentaba de manera significativamente la dispersión de los resultados experimentales debido a las hormonas sexuales. No obstante, se ha demostrado que tanto machos como hembras presentan niveles similares de variabilidad. Numerosos estudios en los que se han testado agentes quimioterapéuticos no han tenido en cuenta el sexo de los animales empleados en modelos de cáncer y, más concretamente, en CHC. En efecto, ha existido discrepancia entre los datos clínicos y preclínicos que erróneamente se ha atribuido a la especie y no al sexo de los animales empleados. Las

diferencias ligadas al sexo entre humanos y modelos animales tienen un impacto muy importante en el resultado de los estudios llevados a cabo. El cáncer hepático ocurre más frecuentemente en machos que hembras premenopáusicas, tal y como sucede en humanos. En las distintas disciplinas científicas que abordan este tipo de tumor, como es el campo del desarrollo de fármacos quimioterapéuticos, el empleo de modelos animales con condiciones fisiológicas extrapolables al humano, es decir, la inclusión de machos y hembras con el fin de reproducir distintas condiciones hormonales, resulta esencial. Esto incluye el uso de animales adultos y peri- o menopáusicos.

Las hormonas sexuales, junto con su papel en la reproducción y en el desarrollo sexual, afectan al riesgo de desarrollar enfermedad hepática y de manera más general enfermedades metabólicas. En particular, los estrógenos reducen la susceptibilidad al desarrollo de esteatosis en las células parenquimatosas hepáticas, uno de los factores de riesgo del desarrollo de cirrosis y CHC. De hecho, el papel protector de los estrógenos que contribuye al dimorfismo sexual en CHC se ha demostrado en numerosos estudios. La ovariectomía en modelos preclínicos de ratón, es decir, la inducción de menopausia precoz de manera quirúrgica favorece la aparición de tumores hepáticos. Por otra parte, la administración de estrógenos de manera exógena a estas hembras protege significativamente frente al desarrollo del CHC.

Un efecto similar se ha observado en ratonas hembras genéticamente deficientes para el receptor de estrógenos. El efecto antitumoral de los estrógenos también se ha verificado en roedores machos, ya que la administración de esta hormona disminuye la hepatocarcinogénesis inducida por agentes

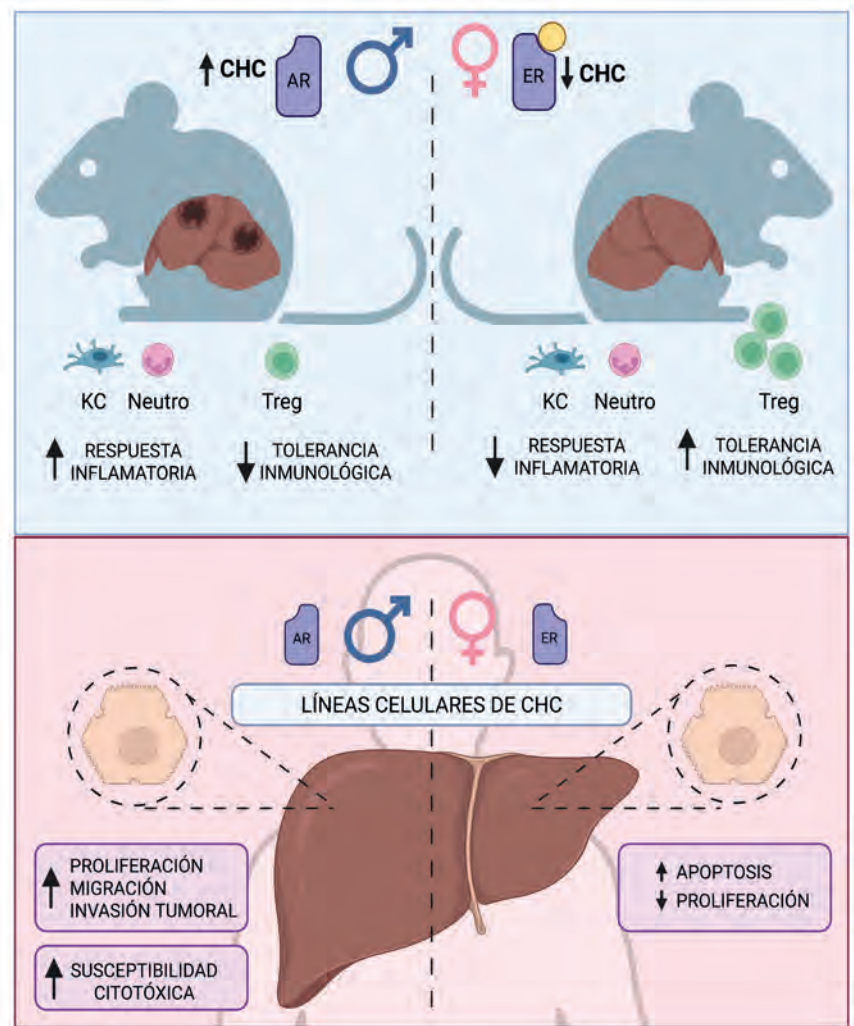


Figura 1

Dimorfismo sexual en la progresión del carcinoma hepatocelular (CHC) y en la modulación de la respuesta inmunitaria. En modelos de roedor, los machos presentan mayor incidencia de CHC asociada a un aumento de la respuesta inflamatoria por células de Kupffer (KC) y neutrófilos (Neutro) y a una disminución de la tolerancia inmunológica mediada por células T reguladoras (Treg). En contraste, las hembras muestran una menor carga tumoral, asociada a la activación del receptor de estrógenos (ER), una reducción de la inflamación y un aumento de la tolerancia inmunológica. A nivel celular, las líneas de CHC derivadas de varones exhiben mayor proliferación, migración e invasión tumoral, así como mayor susceptibilidad a mecanismos citotóxicos, mientras que las líneas derivadas de hembras presentan mayor apoptosis y menor proliferación.

químicos como la dietilnitrosamina (DEN). Resulta también importante destacar que el dimorfismo sexual afecta igualmente a modelos como el de xenotrasplante de cáncer hepático, ampliamente utilizado en medicina personalizada, en el que se ha observado que tanto la eficacia terapéutica como la toxicidad asociada a fármacos quimioterapéuticos varía entre

machos y hembras.

Sin embargo, el dimorfismo sexual en CHC no puede simplificarse al papel que ejercen las hormonas sexuales en el hepatocito. La respuesta inmunitaria en el hígado es clave para la progresión del CHC, y hembras y machos presentan diferencias importantes en la respuesta innata y adaptativa. Esto es debido a que tanto

la expresión genética ligada a los cromosomas sexuales, como el impacto de las hormonas sexuales influyen en gran medida en la función del sistema inmunitario. Diversos tipos de células inmunitarias, incluyendo linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, neutrófilos y células Natural Killers (NK), expresan el receptor de estrógenos, lo que sugiere que sus funciones van a estar moduladas, al menos en parte, por los niveles de estos esteroides.

Prueba de ello es que existen diferencias inmunitarias ligadas al dimorfismo sexual que se aprecian principalmente tras la pubertad y en la perimenopausia, cuando existen más variaciones en los niveles de estrógenos. En general, la respuesta del sistema inmunitario innato en machos promueve la inflamación hepática y la progresión de ésta a CHC, mientras que en hembras los estrógenos reducen la producción de citocinas proinflamatorias en neutrófilos y en macrófagos hepáticos, también células de Kupffer (KC). De hecho, un ejemplo importante es la actividad inhibitoria de los estrógenos en la producción de la citocina proinflamatoria interleukina 6 (IL-6) por KC en un modelo de CHC inducido por carcinógeno. De manera interesante, la reducción en los niveles de IL-6 reduce el riesgo de CHC en hembras. En cuanto a la inmunidad adaptativa, los estrógenos aumentan el tamaño de la población de células T reguladoras (Treg), un tipo de leucocito crucial para frenar las respuestas inmunitarias excesivas, entre ellas la autoinmunidad. Estos resultados sugieren claramente el enorme impacto de los estrógenos en la respuesta inmunitaria, creando microambientes menos proinflamatorios y con mayor tolerancia inmunológica.

Otro factor a tener en cuenta son las proteínas ligadas al cromosoma X con funciones

inmunitarias como el ligando CD40 (CD40L) y diversas proteínas asociadas a la vía de señalización del factor nuclear- κ B (NF- κ B), esenciales en la activación de la respuesta inmunitaria. Aunque uno de los dos cromosomas X en las hembras se inactiva de forma aleatoria mediante mecanismos epigenéticos como la metilación; alrededor del 15 % de los genes escapan a la inactivación en cierto grado, mostrando una expresión parcial o variable, lo que origina diferencias inmunitarias adicionales ligadas al sexo. Todas estas diferencias inmunológicas no sólo van a afectar a la incidencia y desarrollo de CHC, sino también al diseño de ensayos terapéuticos como la inmunoterapia.

Es importante poner de manifiesto que, hasta el momento, la mayor parte del conocimiento disponible en cuanto al dimorfismo sexual en CHC procede de modelos animales, mientras que los estudios *in vitro*, centrados en las diferencias entre sexo en humanos siguen siendo limitados. Los modelos *in vitro* basados en el sexo para el estudio del CHC se limitan principalmente a cultivos celulares bidimensionales, incluyendo líneas celulares de cáncer hepático, hepatocitos primarios y modelos derivados de células madre.

Las líneas celulares de cáncer hepático son los modelos más utilizados, ya que reflejan muchas de las alteraciones genéticas y epigenéticas presentes en los tumores originales. Sin embargo, cada línea celular procede de un único donante masculino o femenino, lo que limita su capacidad para representar la complejidad biológica real del CHC. Además, estas líneas no reproducen completamente la diversidad que existe dentro de un mismo tumor ni entre distintos pacientes. Este problema puede mitigarse parcialmente utilizando paneles de líneas

celulares masculinas y femeninas, pero sorprendentemente se han publicado pocos estudios comparativos entre líneas procedentes de ambos sexos. En la actualidad, existen menos de treinta líneas celulares de cáncer hepático disponibles para el estudio del CHC y la mayoría son de origen masculino, mientras que los modelos femeninos siguen siendo escasos. De hecho, en muchos trabajos científicos ni siquiera se especifica el sexo de las células utilizadas, lo que dificulta enormemente la interpretación de los resultados desde una perspectiva de género y su posterior aplicación clínica.

Algunos estudios *in vitro* han aportado información valiosa sobre el papel de las hormonas sexuales en el CHC. Por ejemplo, estudios comparativos entre líneas celulares masculinas y femeninas han demostrado que los estrógenos, especialmente el estradiol, ejercen un efecto protector frente al desarrollo del cáncer de hígado. Este efecto se debe, en parte, a la activación de vías moleculares que favorecen la muerte celular por apoptosis y limitan la proliferación celular. Otros trabajos han descrito que los andrógenos, como la dihidrotestosterona, aumentan la proliferación, la migración y la invasión de las células tumorales portadoras del receptor de andrógenos. En conjunto estos datos refuerzan la noción de que las diferencias hormonales son clave para explicar el sesgo sexual en el CHC.

Otro aspecto a tener en cuenta es que las líneas celulares hepáticas también se utilizan para evaluar la eficacia y toxicidad de fármacos antitumorales. En este contexto, se ha observado que algunos quimioterápicos, como la doxorubicina, presentan efectos citotóxicos dependientes del sexo, siendo más marcados en modelos masculinos que en femeninos. Estos resultados ponen de

manifiesto que el sexo biológico es una variable esencial que debe tenerse en cuenta en el desarrollo y cribado de nuevos tratamientos, ya que un fármaco puede comportarse de forma distinta según el modelo celular utilizado.

Los modelos bidimensionales, aunque son los más utilizados por su bajo coste y facilidad de uso, no reproducen adecuadamente el microambiente tumoral del hígado. Actualmente, no se han descrito modelos tridimensionales (3D) específicos que incorporen la variable sexo para el estudio del CHC. La introducción de modelos 3D podría permitir una representación más realista de la interacción entre las células tumorales y su entorno, acercándose más a lo que ocurre *in vivo*. Estos modelos permitirían conocer las diferencias asociadas al sexo desde una perspectiva más real incluyendo a la célula tumoral y a las células del sistema inmunitario. No obstante, estos modelos presentan desafíos importantes, como su mayor coste, la complejidad técnica y una menor estabilidad en cultivo.

En conjunto, aunque los modelos *in vitro* actuales han permitido avanzar en la comprensión del cáncer de hígado, siguen siendo insuficientes para captar plenamente las diferencias entre hombres y mujeres. En vista a la remarcable disparidad sexual en cáncer de hígado, y a pesar de los esfuerzos considerables que se han realizado en las últimas décadas, se necesita diseñar nuevos modelos experimentales relacionados con el dimorfismo sexual en investigación básica y traslacional para explorar el papel del dimorfismo sexual en el cáncer hepático. Utópicamente, el modelo ideal debería proporcionar un alto grado de confianza, ser muy reproducible, técnicamente sencillo, y de coste reducido. Además, el modelo ideal debe recapitular los eventos clave observados durante

la iniciación y la progresión de CHC en machos y hembras con vistas a establecer estrategias preventivas o terapéuticas personalizadas eficaces, identificar adecuadamente efectos adversos de nuevos fármacos y desenmascarar nuevos marcadores de pronóstico o predictivos ligados al sexo.

En este contexto, se deben aplicar las directrices, como las proporcionadas por las guías SAGER (por sus siglas en inglés *Sex and Gender Equity in Research*) o las promovidas por el Ministerio de Ciencia e Innovación, diseñadas específicamente para considerar las diferencias biológicas entre

sexos en Investigación Biomédica. Para ello, resulta necesario incorporar el diseño experimental de estudios *in vitro* e *in vivo* que incluyan células y/o modelos de ambos sexos, analizar resultados específicamente por sexo biológico, indicar el sexo de las células, animales o pacientes en publicaciones y justificar si sólo un sexo es estudiado. Ciertamente, la aplicación de estas sencillas normas ayudará a descubrir mecanismos moleculares específicos de hombres y mujeres, mejorar la traslación clínica de los hallazgos y evitar sesgos en el desarrollo de fármacos.

Para leer más

Heidari S, Babor TF, De Castro P, Tort S, Curno M. Sex and Gender Equity in Research: rationale for the SAGER guidelines and recommended use. *Research Integrity and Peer Review* 1 (2016) 2. <https://doi.org/10.1186/s41073-016-0007-6>

Manieri E, Herrera-Melle L, Mora A, Tomás-Loba A, Leiva-Vega L, Fernández DI, Rodríguez E, Morán L, Hernández-Cosido L, Torres JL, Seoane LM, Cubero FJ, Marcos M, Sabio G. Adiponectin accounts for gender differences in hepatocellular carcinoma incidence. *Journal of Experimental Medicine* 216 (2019) 1108-1119. doi: 10.1084/jem.20181288

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 317 (2007) 121-124. doi: 10.1126/science.1140485

Shimizu I, Yasuda M, Mizobuchi Y, Ma YR, Liu F, Shiba M, Horie T, Ito S. Suppressive effect of oestradiol on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Gut* 42 (1998) 112-119. doi: 10.1136/gut.42.1.112

Smiriglia A, Lorito N, Serra M, Perra A, Morandi A, Kowalik MA. Sex difference in liver diseases: How preclinical models help to dissect the sex-related mechanisms sustaining NAFLD and hepatocellular carcinoma. *iScience* 26 (2023) 108363. doi: 10.1016/j.isci.2023.108363

Van Epps H, Astudillo O, Del Pozo Martín Y, Marsh J. The sex and gender equity in research (SAGER) guidelines: implementation and checklist development. *European Science Editing* 48 (2022) e86910. doi: 10.3897/ese.2022.e86910