



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

Papel de la p38 MAPK en cáncer colorrectal

Autor: María Montero Lázaro

Fecha: Julio del 2020

Tutor: Almudena Porras Gallo

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
PALABRAS CLAVE.....	3
INTRODUCCIÓN	3
1. Las MAPKs: p38 MAPKs.....	3
2. El cáncer: cáncer colorrectal	4
3. p38 MAPKs en cáncer colorrectal	6
4. Metástasis en cáncer colorrectal.....	7
OBJETIVOS.....	8
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
1. Implicación de la p38 α MAPK en cáncer colorrectal	9
1.1 Papel dual de p38 α MAPK en cáncer colorrectal	9
1.2 Terapia frente al cáncer colorrectal.....	11
1.3 Metástasis en cáncer colorrectal	13
2. Últimos descubrimientos sobre el papel de p38 δ MAPK en cáncer colorrectal	15
CONCLUSIONES	16
BIBLIOGRAFÍA.....	17

RESUMEN

Las MAPKs son proteínas quinasas activadas por mitógenos que participan en la transducción de señales. Dentro de la superfamilia de las MAPKs se encuentran las p38 quinasas (p38 MAPKs), que engloban cuatro isoformas: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . Las p38 MAPKs contribuyen al control de numerosos procesos celulares entre los que se encuentran la regulación de la respuesta inmune, la inflamación y el cáncer. En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica para caracterizar el papel que desempeña p38 MAPK en el cáncer colorrectal, que es el tercer tipo de cáncer más común y la cuarta causa de muerte relacionada con el cáncer. Se determinó el papel dual que presenta p38 α en el cáncer colorrectal asociado a colitis, así como el papel prometastásico. Recientemente, se ha relacionado la activación de p38 δ con la pérdida de eficacia de uno de los tratamientos quimioterápicos más utilizado en el cáncer colorrectal. Además, se destacó la importancia del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la especificidad y en la combinación de tratamientos.

PALABRAS CLAVE

p38 MAPKs, cáncer colorrectal, terapia, metástasis

INTRODUCCIÓN

1. Las MAPKs: p38 MAPKs

Se conoce con el nombre de MAPKs a las proteínas quinasas activadas por mitógenos, que participan en la transducción de señales. Su función es la de transducir los estímulos extracelulares que son captados por los receptores de la célula, de manera que se acaben obteniendo, a nivel intracelular, respuestas concretas para el estímulo. Participan, entre otras, en respuestas a factores de crecimiento, mediadores de la inflamación y también intervienen en la patogénesis de enfermedades como el cáncer. A nivel celular regulan una gran variedad de actividades celulares que incluyen proliferación celular, diferenciación, supervivencia, muerte y transformación ¹.

Dentro de la gran familia de las MAPKs, destacan las que se conocen como MAPKs clásicas, que son: las quinasas reguladas por factores extracelulares o ERKs (*extracellular-regulated kinases*), las quinasas JNKs (*c-JUN-N-terminal kinases*) y p38 quinasas (p38 MAPKs). Todas ellas presentan actividad serina/treonina quinasa, se activan por fosforilación y se inactivan por desfosforilación. Se caracterizan porque comparten una secuencia estructural TXY, donde T es el residuo treonina (Thr), X el aminoácido diferenciador e Y el residuo tirosina (Tyr). El aminoácido diferenciador se corresponde con glutamina (Glu) para ERK-1/2, prolina (Pro) para JNK-1/2/3 y glicina (Gly) para las p38.

La activación de estas MAPKs se consigue mediante una doble fosforilación en los residuos Thr y Tyr, producida por las MAPKKs (quinasas de las MAPKs) conocidas como MEK (MEK1/2 activan ERKs, MEK4/7 activan JNKs y MEK3/6 activan p38 MAPKs). A su vez, estas MAPKKs son activadas por fosforilación de los residuos de Ser/Thr conservados en su estructura primaria por las MAPKKKs (quinasas de las quinasas de las MAPKs), las que también han de activarse a través de intermediarios que fosforilan residuos de los centros catalíticos de la MAPK sustrato. Estos intermediarios dependen de la señal extracelular que

llega y es recogida por receptores de membrana o receptores intracelulares, comenzando así la cascada de señalización ya descrita. Así, las MAPKs ya activadas pueden activar otras quinasas o fosforilar a otras proteínas a nivel citoplasmático o nuclear, ya que muchas de sus dianas son factores de transcripción (Figura 1) ^{1,2}.

La inactivación de las MAPKs, por su parte, se produce por las fosfatasas duales (*MAPK phosphatases* o MKPs) o de otro tipo, lo que permite la reversibilidad de los procesos anteriores. Estas fosfatasas pueden ser de tipo Ser/Thr, Tyr o de doble especificidad (duales). Estas últimas a su vez se subdividen en 4 subfamilias entre las que están las enzimas nucleares MKP1/2 (que actúan sobre todas las MAPKs) y las enzimas citoplasmáticas MKP3 (con mayor actividad sobre ERK1/2) ².

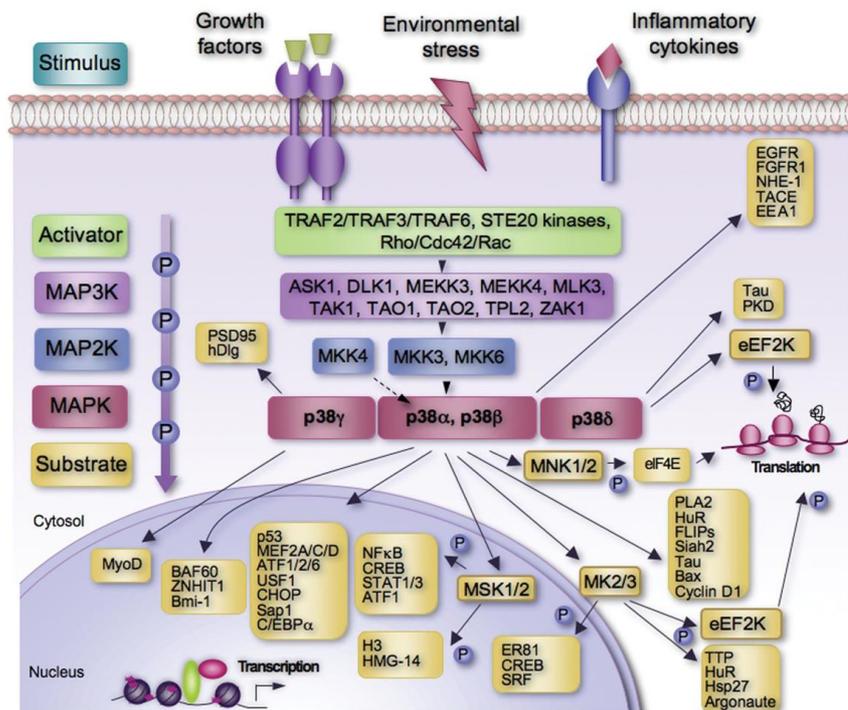


Figura 1. Mecanismo y funciones de la señalización de p38 MAPKs. Diferentes estímulos tales como factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias o señales de estrés extracelular pueden activar las p38 MAPKs. Se muestran MAP3K, MAP2K y MAPK que se van fosforilando y activando consecutivamente, y los sustratos, que incluyen proteínas quinasas, sustratos citosólicos, factores de transcripción y remodeladores de cromatina ².

2. El cáncer: cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más común y la cuarta causa de muerte relacionada con el cáncer, siendo el segundo cáncer más común en mujeres y el tercero en hombres. La mayoría de los casos de cáncer colorrectal se detectan en países occidentales y su incidencia aumenta cada año. La probabilidad de sufrir CCR es de aproximadamente un 4% -5% y el riesgo de desarrollarlo está asociado a características personales como la edad, el historial de enfermedades crónicas y el estilo de vida, donde la microbiota intestinal tiene un papel muy importante y las situaciones de disbiosis pueden inducir carcinogénesis colónica a través de un mecanismo de inflamación crónica ⁸.

La inflamación crónica es un factor importante que incrementa el riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer. En el cáncer colorrectal, la mayoría de las mutaciones son inducidas por la inflamación crónica del epitelio del colon, y como consecuencia de ello, los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, tienen más riesgo de padecer cáncer colorrectal que la población sana.

La EII y el cáncer colorrectal se han asociado con un defecto en la función de la barrera epitelial intestinal. Esta consta de una capa de moco, que ejerce de barrera física, y de una capa epitelial, con células muy adheridas a través de uniones estrechas. La barrera epitelial presenta un papel protector del tracto gastrointestinal, pero cuando esto no ocurre por defectos en la misma, se produce el contacto entre los patógenos invasores del lumen y las toxinas ingeridas con la mucosa intestinal, promoviendo las respuestas inflamatorias. Además, como se explicará más adelante, se ha comprobado en estudios *in vivo* cómo los ratones con defectos en la barrera epitelial son más susceptibles a la colitis y a la tumorigénesis colorrectal, lo que pone de manifiesto la importante regulación de esta barrera sobre los procesos inflamatorios y tumorales¹⁰.

El CCR es causado por mutaciones de proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes relacionados con mecanismos de reparación del DNA. Dependiendo del origen de la mutación, el CCR se clasifica en esporádico (70%), heredado (5%) y familiar (25%). La patogénesis molecular del cáncer esporádico es heterogénea, pero en un elevado porcentaje de los casos de CCR comienza con la formación de un adenoma que acaba dando lugar a un carcinoma. El CCR heredado se puede clasificar, a su vez, en dos variantes: la que se caracteriza por la formación de pólipos potencialmente malignos en el colon, como es la poliposis adenomatosa familiar (PAF), y la que se relaciona con mutaciones en los genes de los mecanismos de reparación del DNA, que es el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC).

Los CCR de tipo esporádico se clasifican según tengan inestabilidad cromosómica (CIN)⁸, estabilidad de microsatélites (MSS)⁷, inestabilidad de microsatélites (MSI) o fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). Dentro de estos tipos de CCR, se ha visto la alteración de vías de señalización importantes como WNT, MAPK, PI3K, TGF- β , TP53, así como KRAS o BRAF⁸. Todo ello se ha utilizado para clasificar el CCR, tratar a los pacientes y establecer un pronóstico de supervivencia, poniendo de manifiesto que el CCR es una enfermedad heterogénea, que puede generarse por alteraciones de varias vías distintas como consecuencia de diferentes combinaciones de cambios genéticos y epigenéticos¹⁵.

Actualmente se ha propuesto una nueva clasificación que integra los datos del microambiente tumoral y que incluye cuatro subtipos moleculares (*Consensus Molecular Subtypes* o CMS). Los tumores de colon CMS1 con MSI y CIMP se caracterizan por una expresión génica inflamatoria y un alto estado mutacional, con altos niveles de células inmunes infiltrantes en dichos tumores. Los subtipos intermedios CMS2 (canónico) y CMS3 (metabólico) presentan bajos componentes inmunes e inflamatorios. El CMS4, por su parte, tiene un fenotipo mesenquimal, con alteraciones en el número de copias somáticas, CIMP y alta densidad de fibroblastos con inflamación tumoral asociada (Figura 2)^{15,17}.

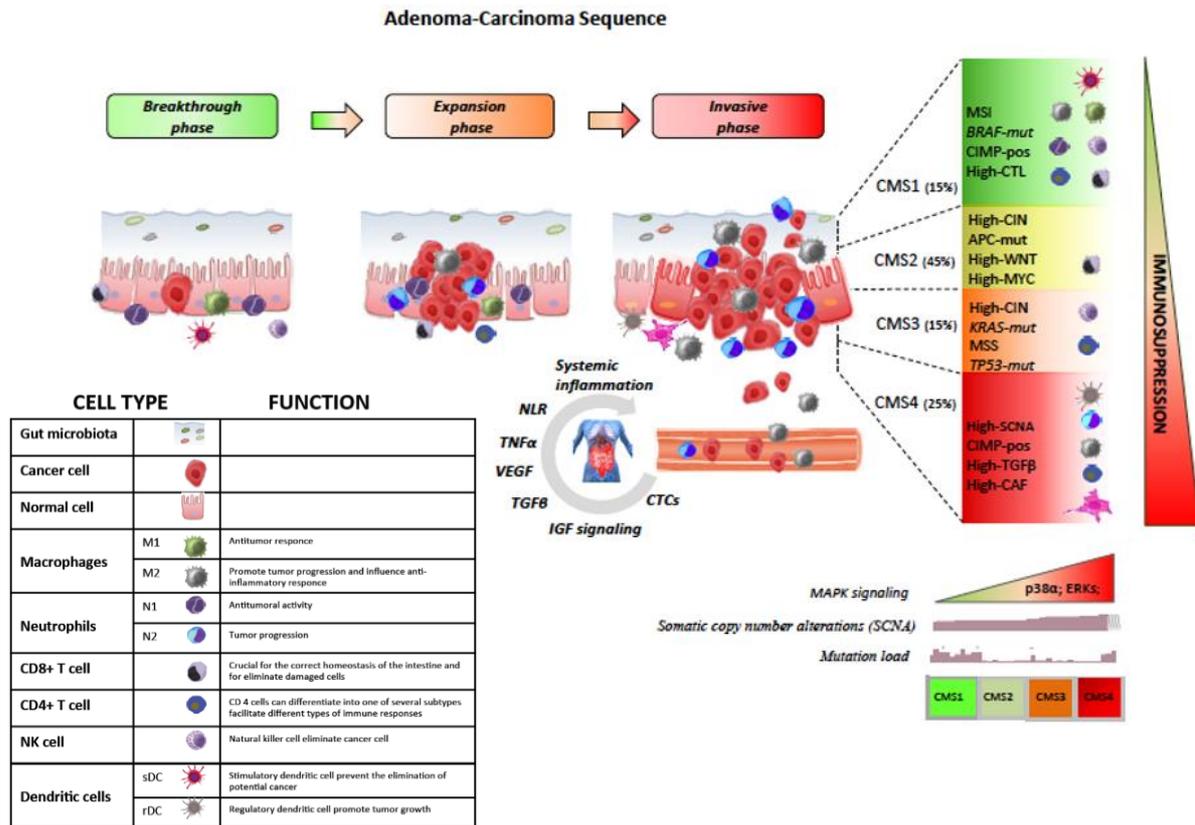


Figura 2. Características moleculares del cáncer colorrectal y microambiente inmune tumoral. Los cuatro subtipos (CMS1-4) muestran diferentes niveles de células inmunes infiltrantes, alteraciones del número de copias somáticas, carga mutacional y activación de MAPKs, principalmente ERKs y p38 α MAPK. Se indica la prevalencia aproximada (porcentaje) de cada subtipo.

Abreviaturas: CpG island methylator phenotype, CIMP; microsatellite stable, MSS or instable MSI profile; Somatic copy number alterations, SCNAs; Circulating tumor cells, CTCs; chromosomal instability, CIN; cytotoxic T-lymphocytes, CTL; neutrophil lymphocyte ratio, NLR; cancer-associated fibroblasts, CAFs; Transforming growth factor beta, TGF- β ; vascular endothelial growth factor, VEGF; Tumor necrosis factor alpha, TNF- α ; insulin-like growth factor, IGF; Mutation, Mut¹⁵.

Las etapas en las que se divide el cáncer colorrectal son cinco. En la etapa 0, fase muy temprana, hay alteraciones en la capa más interna del intestino; en la etapa I está localizado en las capas internas del colon; en la etapa II se ha diseminado a través de la pared muscular del colon; en la etapa III ha llegado a los ganglios linfáticos; y en la etapa IV el cáncer ya se ha extendido a otros órganos. La prevención del CCR es muy importante para detectarlo en las etapas más tempranas y que pueda ser tratado y conseguir así la curación del paciente, lo que es posible en las etapas I y II. El examen de sangre oculta en heces y la colonoscopia son las pruebas más habituales para la detección precoz, teniendo en cuenta también los síntomas en caso de que estos estén presentes⁹.

3. p38 MAPKs en cáncer colorrectal

Dentro de las p38 MAPKs existen cuatro isoformas en mamíferos, que son: α , β , γ y δ . Dentro de ellas, la p38 α es la mejor caracterizada y se expresa en todos los tipos de células. Años después de la identificación de p38 α se describieron las otras tres isoformas³, codificadas todas por diferentes genes: p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12) y p38 δ

(MAPK13). Aunque ubicua, p38 β se expresa en niveles muy bajos en comparación con p38 α y su función parece ser redundante con esta en algunos contextos⁴. p38 γ se expresa de manera más significativa en el músculo esquelético y p38 δ se encuentra sobre todo en testículos, páncreas, riñón e intestino delgado³. Es decir, p38 γ y p38 δ presentan patrones de expresión más restringidos, lo que puede hacer que tengan funciones más especializadas⁴.

La subfamilia de las p38 MAPKs se puede dividir a su vez en dos subgrupos, p38 α y p38 β (p38 MAPKs clásicas), por un lado, y p38 γ y p38 δ (p38 MAPKs no clásicas), por otro. Esto es debido a su identidad de secuencia de aminoácidos, ya que, p38 α y p38 β tienen un 75% de homología, mientras que la homología de p38 γ y p38 α es de un 62% y la de p38 δ y p38 α es de un 61%. Además, p38 γ y p38 δ tienen más homología entre sí, aproximadamente de un 70%. También se ha comprobado que la diferencia estructural en ambos, concretamente, un aminoácido en el sitio de unión del ATP (Thr106 para p38 α y p38 β y Met para p38 δ y p38 γ), hace que respondan de manera diferente frente a algunos inhibidores. Además, se ha confirmado la diferente selectividad de sustrato para estos dos grupos de quinasas, donde MAPKAP-K2 (MK-2) y MAPKAP-K3 (MK-3) son fosforiladas por p38 α y p38 β y no por p38 γ o p38 δ ^{3,6}.

In vivo, las p38 MAPKs contribuyen al control de numerosos procesos celulares entre los que se encuentran la regulación de la respuesta inmune, un papel dual en la inflamación, así como en el cáncer⁵. Aunque muchos de los estudios se han centrado en el papel de p38 α , se están empezando a conocer más a fondo las funciones celulares del resto de isoformas y su implicación en algunas condiciones patológicas³. No obstante, todavía hay un conocimiento limitado sobre algunos aspectos básicos de la funcionalidad de las vías de las p38 MAPKs. De hecho, p38 se ha considerado clásicamente un gen supresor de tumores, pero ahora hay un gran número de publicaciones que respaldan su papel como promotor tumoral. Por ello, es importante conocer cómo contribuye cada isoforma a la oncogénesis y es debido a esto por lo que muchos estudios relacionados con el cáncer son limitados ya que carecen de un enfoque dependiente de isoformas⁴.

En el cáncer colorrectal, p38 α regula la homeostasis intestinal y la integridad del epitelio del colon. Así, la regulación negativa de p38 α en las células epiteliales intestinales se traduce en una mayor susceptibilidad para la tumorigénesis del colon asociada a colitis. Sin embargo, esta regulación negativa o la inhibición farmacológica de p38 α en las células tumorales del colon, también reduce el desarrollo tumoral en ratones, por lo que p38 α también contribuye a la progresión del tumor de colon¹⁴. Actualmente, además se sabe que p38 γ y p38 δ no solo tienen una función esencial en la respuesta inmune y en la inflamación, sino que también juegan un papel oncogénico importante en el cáncer colorrectal. Se ha demostrado que son un vínculo entre la inflamación crónica y el cáncer. A través de modelos de cáncer de colon asociado a colitis y mediante el tratamiento con agentes procancerígenos y proinflamatorios, los ratones deficientes en p38 γ y p38 δ desarrollan menos tumores en el colon y presentan menor número de células inmunes e inflamatorias⁵.

4. Metástasis en cáncer colorrectal

La metástasis es la propagación del cáncer a un órgano distante, para lo que las células cancerosas necesitan la capacidad de invadir tejidos circundantes, sobrevivir en la circulación, extravasarse, colonizar el órgano secundario y reanudar el crecimiento. Este es un proceso que suele ser ineficiente, ya que la mayoría de las células tumorales no logran adquirir las

competencias metastásicas necesarias para llevarlo a cabo. Sí que se apuesta porque el crecimiento tumoral en un órgano secundario esté muy relacionado con que estas células tumorales adquieran un fenotipo de células madre metastásicas y dependan de su interacción con el microambiente para migrar, sobrevivir en la circulación y crecer en otro órgano ¹⁷.

Cuando se diagnostica el CCR, un 35% de los pacientes presenta metástasis en estadio IV y un 20-50% de los que presentan la enfermedad en estadio II y III evolucionarán al estadio IV en algún momento del curso de la enfermedad. El CCR normalmente produce metástasis en hígado y pulmón y la tasa de supervivencia a 5 años tras el diagnóstico de CCR metastásico es inferior al 10% ¹³. La mayoría de las recaídas se producen en forma de metástasis y son causadas por células tumorales residuales que se han diseminado antes de la cirugía. Estas células tumorales latentes diseminadas no son eliminadas por las terapias sistémicas actuales, siendo también ineficaces en el tratamiento de la metástasis en crecimiento ¹⁷.

En cuanto al papel de p38 MAPK en la metástasis del cáncer colorrectal, existen varios trabajos recientes que indican que p38 α promueve la migración y la invasión, aunque luego existan diferencias según a qué órgano se dirijan las células. Hay trabajos que demuestran que la fibulina 3 (proteína de la matriz extracelular) promueve la migración y la invasión de una línea celular de carcinoma colorrectal humano a través de un mecanismo que requiere la activación de p38 α y/o p38 β ²⁰. Otros estudios indican que la eliminación de C3G (factor de intercambio de nucleótidos de guanina) en las líneas celulares anteriores promueven la migración y la invasión a través de la hiperactivación de p38 α ²¹. Así, se pone de manifiesto el papel prometastásico que se atribuye a p38 α en cáncer colorrectal.

OBJETIVOS

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Conocer el papel que desempeñan las diferentes isoformas de p38 MAPK en el cáncer colorrectal.
2. Conocer la implicación de las p38 MAPKs en la metástasis del cáncer colorrectal.
3. Determinar la importancia de las p38 MAPKs para el desarrollo de terapias adecuadas en el cáncer colorrectal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se ha realizado a través de una revisión bibliográfica de artículos científicos buscados, principalmente, en bases de datos como PubMed y Scienci Direct. Se han consultado 19 artículos de revistas científicas, además de otras páginas de información como la Enciclopedia Médica MedlinePlus y la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). La búsqueda se ha llevado a cabo mediante las palabras clave mencionadas, en lengua inglesa, y dando prioridad a aquellas publicaciones con fechas más recientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Implicación de la p38 α MAPK en cáncer colorrectal

1.1 Papel dual de p38 α MAPK en cáncer colorrectal

Se sabe que la vía de la p38 α MAPK participa tanto en la regulación de la producción de mediadores inflamatorios como en los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular que mantienen la homeostasis de los tejidos y cuya desregulación contribuye al desarrollo del cáncer. Sin embargo, la participación de p38 α MAPK es diferente según el tejido y la etapa tumorigénica, pudiendo actuar como supresor o como inductor tumoral ¹¹.

En línea con lo anterior, se ha comprobado que la p38 α MAPK en CCR suprime la iniciación del tumor de colon asociado a colitis al regular la función de barrera epitelial, que protege frente al daño epitelial y la inflamación. Sin embargo, una vez que se han formado los tumores de colon, p38 α MAPK favorece el crecimiento tumoral, ya que promueve la proliferación e inhibe la apoptosis de las células epiteliales transformadas.

Las conclusiones anteriores se han obtenido a partir de modelos de ratón en los que se ha empleado el protocolo AOM/DSS, que combina el tratamiento con el carcinógeno azoximetano (AOM) y con dextrán sulfato sódico (DSS) ¹⁰, un tóxico que induce la apoptosis de las células epiteliales y con ello, inflamación intestinal y colitis ¹¹. Además, se ha eliminado la expresión de p38 α MAPK en las células del epitelio intestinal (CEIs), demostrando que esto favorece el desarrollo del cáncer colorrectal asociado a colitis, siendo estos ratones más susceptibles al DSS (Figura 3). A nivel molecular también se han obtenido evidencias que se explican a continuación.

El papel de p38 α en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y de la integridad del epitelio del colon, se demuestra a través de la disminución en el número de células productoras de mucus (células caliciformes o gobet) en los ratones carentes de p38 α en las células del epitelio intestinal. Esta disminución de la función protectora no es suficiente para inducir por sí misma colitis o tumores, pero sí que favorece su desarrollo tras la exposición al DSS. Esto se relaciona con la reducción en la expresión de ZO-1, una proteína presente en las uniones estrechas de las células del epitelio intestinal. Además, se ha comprobado cómo a partir de una mezcla de probióticos se mejora la deficiencia en la función de barrera epitelial en estos ratones, apoyando el importante papel de p38 α en la regulación de la integridad de la barrera intestinal, que protege frente al daño inducido por colitis y el inicio de la tumorigénesis de colon.

Por su parte, los tumores de colon también presentan una deficiencia en la función de barrera epitelial, lo que se correlaciona con el aumento de las interleuquinas IL-23 e IL-17 y se traduce en un aumento de la permeabilidad, que contribuye a la tumorigénesis y a la invasividad. Sin embargo, y en contra de lo que se podría pensar por el ya mencionado papel de p38 α en la función de barrera epitelial normal, es poco probable que regule la función de barrera en los tumores.

El factor de transcripción STAT3 regula la supervivencia y la proliferación de las células tumorales del colon y su activación está muy relacionada con la expresión de IL-6 e IL-11. De hecho, la inhibición de STAT3, IL-6 o IL-11 reduce la capacidad tumorigénica en el

cáncer de colon asociado a inflamación. A su vez, la regulación negativa o la ausencia de p38 α en las células tumorales, da lugar a la reducción de los niveles de IL-6 e IL-11, disminuyendo la fosforilación de STAT3. Esto indica que la vía de p38 α puede controlar la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que podría explicar el vínculo observado entre la actividad de p38 α y la fosforilación de STAT3, aunque no se descarta que p38 α también pueda regular las vías de señalización intracelular que conducen a la fosforilación de STAT3 en las células tumorales.

El aumento de la apoptosis de las células tumorales del colon al inhibir p38 α es otro de los resultados obtenidos en el estudio. Esto se correlaciona con una activación de la señalización de JNK, una disminución en la expresión de la proteína antiapoptótica Mcl-1¹⁰ y una acumulación de la proteína proapoptótica Bak¹¹. p38 α puede regular negativamente la señalización de JNK y una activación mantenida de JNK se relaciona con la inducción de apoptosis, lo que puede estar mediado por la fosforilación y degradación de Mcl-1. Así, parece que la activación de la señalización de JNK junto con la disminución en los niveles de Mcl-1 contribuiría al aumento de la apoptosis de las células tumorales del colon al inhibir p38 α , aunque p38 α también puede inducir apoptosis por sí misma¹⁰.

En definitiva, lo que se explica es el papel dual que desempeña p38 α en CCR, pudiendo actuar como supresor o como inductor tumoral en las células epiteliales intestinales normales o transformadas, respectivamente. Quedaría por determinar cómo la señalización de p38 α contribuye a la tumorigénesis colorrectal en las células madre intestinales cancerígenas. La vía de p38 α puede contribuir a la supresión del inicio del tumor de colon asociado a inflamación al regular la homeostasis del colon y la función de barrera epitelial intestinal, pero también ayudar a la supervivencia y proliferación del mismo una vez que se haya formado (Figura 3)^{10,11}.

Se ha comprobado que tanto la regulación negativa a nivel genético como la inhibición farmacológica de p38 α en CCR disminuyen la capacidad tumoral y que mientras esta inhibición de p38 α se mantenga los tumores colorrectales no vuelven a crecer (Figura 3), por lo que se plantea como posible terapia, que se aborda en el siguiente apartado¹⁰.

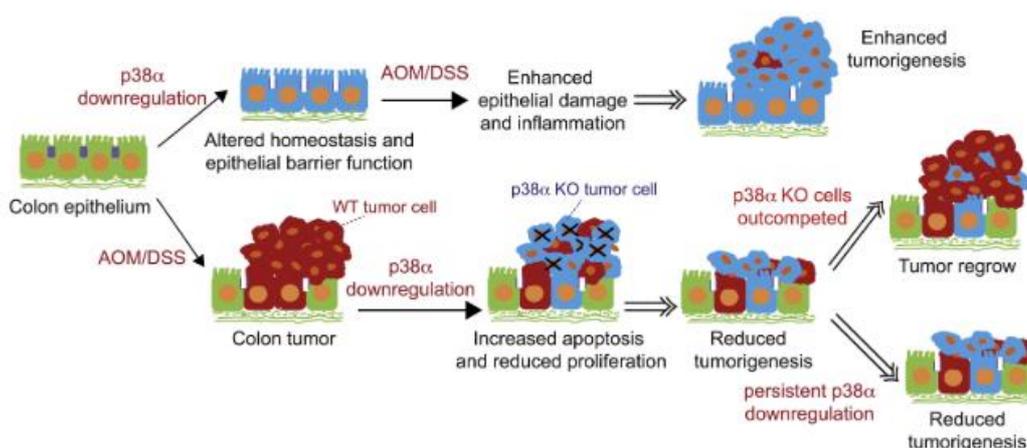


Figura 3. Diferente actuación de p38 α según el momento de la regulación negativa y tumorigénesis reducida si esta se mantiene. En las células epiteliales normales del colon, p38 α mantiene la homeostasis intestinal y la función de barrera para suprimir el inicio del tumor asociado a colitis. Por otro lado, p38 α contribuye al desarrollo tumoral al apoyar la proliferación e inhibir la apoptosis de las células epiteliales transformadas. Cuando se mantiene la regulación negativa de p38 α se consigue una reducción de la tumorigénesis¹⁰.

Además de los estudios *in vivo* anteriores, existen otros realizados con xenotrasplantes derivados de pacientes (PDXs), que se proponen como modelos preclínicos predictivos y que permiten realizar pruebas precisas de posibles terapias. Se han generado a partir de tumores de colon humano diferentes con una mínima manipulación *in vitro*, que representan la heterogeneidad clínica y que recapitulan las condiciones humanas del tumor, tanto histológicas como moleculares.

Así, para superar las limitaciones que presentan los estudios basados en modelos de ratón, sobre todo, porque carecen de la complejidad de los tumores humanos y porque puede que no representen realmente la respuesta terapéutica frente a estos, se emplean los PDXs. Estos son estudios adicionales que presentan un entorno más cercano a la situación clínica y que permiten confirmar el papel de p38 MAPK en la progresión del tumor colorrectal. Se comprueba que la inhibición de la señalización de p38 MAPK inhibe el crecimiento tumoral independientemente del tipo de tumor de colon y de la existencia de mutación en K-Ras con el inhibidor PH797804, aunque sería interesante ampliar estos resultados con otros inhibidores de p38 MAPK disponibles para ensayos clínicos.

A nivel molecular se amplían los resultados anteriores, sugiriendo un papel importante para p38 α en la regulación de la señalización de IL-6/STAT3 en tumores de colon humano. En cambio, aunque IL-11 también puede inducir la activación de STAT3, no parece verse afectada por la inhibición de p38 MAPK en estos modelos, lo que sugiere que no se produce a niveles suficientemente altos como para activar STAT3. En el caso de JNK también aumenta su activación, pero se propone que dicha activación no produce cambios en la expresión génica.

De forma general, los estudios con PDXs de CCR extienden los estudios anteriores y respaldan el interés de usar inhibidores de p38 MAPK para el tratamiento del CCR. También plantean la importancia de emplear estos modelos, utilizando un panel de tumores humanos que representen la heterogeneidad clínica, para comprobar la eficacia de las combinaciones de los inhibidores de p38 MAPK con fármacos quimioterapéuticos u otras terapias, lo que se aborda a continuación ¹³.

1.2 Terapia frente al cáncer colorrectal

Como ya se ha explicado, la ausencia de p38 α en las células del epitelio intestinal hace que sean más propensas a la tumorigénesis colorrectal asociada a colitis. Sin embargo, la ausencia de p38 α en las células tumorales del colon o su inhibición farmacológica con PH797804 reducen la capacidad tumorigénica en los modelos de ratón, lo que se correlaciona con la activación de la vía JNK, la reducción de la expresión de Mcl-1 y la regulación negativa de la señalización de IL-6/STAT3. El tratamiento con el inhibidor de p38 MAPK SB202190 también reduce el crecimiento de tumores de colon en xenotrasplantes generados por líneas celulares de cáncer de colon humano o en ratones que expresan APC^{min} ^{11,14}. Este último es otro de los modelos de ratón que se utilizan como modelo del CCR humano, en concreto, para el cáncer de colon con poliposis adenomatosa familiar, que representa el 1% del total de casos de CCR diagnosticados cada año. El cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC), por su parte, representa el 1-2% de la incidencia mundial ¹³.

Para el tratamiento del CCR se emplean en numerosos pacientes fármacos quimioterapéuticos, como el cisplatino o el fluorouracilo. Para comprobar la participación de

p38 α en los efectos de la quimioterapia, se han realizado estudios sobre líneas celulares de cáncer de colon que muestran cómo p38 α es necesario para la apoptosis que inducen dichos fármacos y que está mediada por la fosforilación de p53 por p38 α ¹⁴. Sin embargo, también existen evidencias *in vitro* e *in vivo* que demuestran que los inhibidores de p38 α potencian el efecto quimioterapéutico de algunos de estos fármacos. Por ejemplo, la respuesta al cisplatino se ve reforzada por la inhibición de p38 α , lo que resulta en una regulación positiva de la vía JNK en las células tumorales de colon, así como en tumores subcutáneos generados mediante xenotrasplante de células de líneas celulares de cáncer de colon humano, en los que se reduce el tamaño y la malignidad del tumor^{12,14}. De forma similar, en algunas líneas celulares de cáncer de colon los inhibidores de p38 α sensibilizan a las células frente al tratamiento con fluorouracilo e irinotecán¹⁴. De hecho, altos niveles de p38 MAPK fosforilada se han correlacionado con la resistencia al fármaco irinotecán¹¹.

En resumen, la evidencia creciente apoya un papel importante de p38 α en la quimiorresistencia tumoral, proponiéndose como posibles mecanismos para ello la inducción de la latencia de las células tumorales y las respuestas adaptativas en condiciones de estrés mediadas por p38 α . En el primer caso, parece que las células que no se dividen pueden ser más resistentes a los tratamientos citotóxicos, mientras que en el segundo caso se relacionaría con la reprogramación del metabolismo de la glucosa en las células tumorales por parte de p38 α . También se ha implicado a p38 α en la mediación de la supervivencia celular en respuesta a la muerte celular debido al daño en el DNA producido por la acción de numerosos fármacos quimioterapéuticos, de manera que los inhibidores de p38 α sensibilizarían a las células tumorales frente a la quimioterapia y favorecerían la muerte celular¹⁴. Así, las terapias que combinan inhibidores de p38 α y fármacos quimioterapéuticos como el cisplatino o el irinotecán, pueden ser estrategias prometedoras para el tratamiento de algunos tipos de cáncer como el cáncer colorrectal. Aun así, habría que conocer más en detalle qué tipo de tumores y qué pacientes podrían beneficiarse de estas terapias^{12,14}.

Habría que tener en cuenta que mientras el empleo de inhibidores de p38 α puede ser útil para frenar el crecimiento tumoral donde se requiera esta vía para su proliferación o supervivencia, a su vez, puede no ser beneficioso en otros tejidos donde la inhibición de la función protectora de p38 α resultara en una estimulación de la tumorigénesis. Así, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas requiere de un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en las acciones de p38 α , para poder activar o inhibir específicamente la vía de p38 α en tipos celulares concretos y en un momento dado. También los inhibidores de p38 α pueden presentar limitaciones debido al papel que desempeñen otros miembros de la familia de p38 MAPK durante el desarrollo tumoral, a las interacciones pleiotrópicas con otras vías de señalización y a la capacidad de adaptación de las células tumorales. Un enfoque terapéutico alternativo podría basarse en otros componentes de la vía p38 α , buscando una mayor selectividad. También son necesarios más estudios *in vivo* que permitan conocer el microambiente tumoral y con ello la respuesta de las células tumorales a tratamientos específicos¹⁴.

Precisamente es importante conocer cómo las células inmunes organizan el microambiente tumoral para regular la actividad de las células T. Las interacciones entre el sistema inmunitario y el cáncer han revelado que cada componente de la inmunidad innata o adquirida participa en el desarrollo tumoral y/o en su control. Así, cuando el sistema inmune no puede eliminar las células transformadas o las células cancerosas, se produce un escape de la respuesta inmune antitumoral. Como se sabe que la activación de las células T es uno de los factores que limitan estas respuestas inmunes antitumorales, las inmunoterapias se basan en

inhibidores de los puntos de control inmunitarios, como PD-1, PD-L1 y CTLA-4, a través de anticuerpos. Esto es porque la inducción de la expresión de CTLA-4 limita la respuesta de las células T citotóxicas frente a las células tumorales mientras que en el caso de PD-1 y su ligando PD-L1, no participan en la coestimulación, pero sí en la protección de las células frente al ataque de las células T.

Las terapias dirigidas, por su parte, pueden presentar efectos sobre las respuestas inmunes del huésped, además de sobre la biología del tumor. Hay buena evidencia de que las alteraciones en ERKs y p38 MAPKs principalmente modifican la respuesta inflamatoria y la inmunidad antitumoral, mejorando las características metastásicas de los tumores. En el cáncer colorrectal es bien conocida la función de las ERKs promoviendo el crecimiento tumoral, por lo que se busca su inhibición, como ya se ha explicado para p38 α MAPK. Sin embargo, las células tumorales generalmente se vuelven resistentes a la inhibición de ERKs, por lo que se requiere de una combinación de inhibidores.

Por tanto, se buscan combinaciones adicionales de terapias dirigidas, además de los inhibidores de MAPK, e inmunoterapias para el tratamiento del CCR. En el primer caso, algunas están aprobadas y otras en ensayos clínicos, mientras que en el segundo caso todas se encuentran en desarrollo clínico ¹⁵.

1.3 Metástasis en cáncer colorrectal

Como ya se ha mencionado, las metástasis generadas a partir del cáncer colorrectal afectan principalmente al hígado y a los pulmones. Para ello, las células cancerígenas han tenido que ser previamente diseminadas a la circulación. En la metástasis hepática, ingresan a la circulación portal, se transportan a los sinusoides hepáticos y pueden regresar al parénquima hepático debido a la fenestración de los vasos. En el caso de la metástasis pulmonar, las células cancerígenas primero tienen que alcanzar la circulación general y luego infiltrarse en el parénquima pulmonar, para lo que se requiere la destrucción de las células capilares pulmonares. Sin embargo, el paso de las células tumorales circulantes al órgano distante es limitante y no todas sobreviven. Las que sí lo hagan y sobrevivan al nuevo entorno podrán dar lugar a metástasis, aunque no todas tienen la capacidad para establecer una colonia próspera, y en muchos casos permanecen latentes durante meses o años. Las metástasis normalmente se desarrollan después de un periodo de latencia, que en el CCR es variable llegando hasta los 5 años. La estrategia terapéutica actual para acabar con las células residuales es la quimioterapia, aunque no es muy efectiva, ya que esta se dirige a las células de proliferación rápida y las células latentes son en gran medida resistentes a la quimioterapia. Es de gran importancia conocer mejor estos mecanismos para poder curar a los pacientes al eliminar la enfermedad residual antes de que se produzca la metástasis manifiesta.

La heterogeneidad intratumoral es un concepto clave para entender la progresión metastásica y la resistencia terapéutica, lo que depende de la jerarquización celular, la diversificación clonal de las células y el microambiente. El estroma o microambiente tumoral se vincula en todos los pasos de progresión y metástasis del cáncer, proponiéndose una comunicación y evolución conjunta de las células tumorales y el estroma. Por ello, es importante conocerlo. Entre las diferentes células que lo componen destacan los fibroblastos asociados al cáncer, las células endoteliales y las células inmunes ¹⁷. Concretamente, se ha comprobado la relación entre la regulación positiva de la quimioquina CCL2 en el carcinoma de colon en estadio IV y la capacidad metastásica, ya que, CCL2 derivado de las células

tumorales activa el receptor CCR2 en células endoteliales, lo que permite la extravasación eficiente de las células tumorales. De hecho, la señalización de CCR2 en las células endoteliales específicamente permite la trans migración de células tumorales con CCL2. Además, la expresión de CCR2 en las células endoteliales está vinculada a la inducción de la permeabilidad vascular. Se han identificado a las vías de señalización JAK2-Stat5 y p38 MAPK como responsables de la inducción de dicha permeabilidad vascular y extravasación, las cuales, actúan independientemente una de la otra. Es decir, que CCL2 activa la señalización de JAK2 y p38MAPK, lo que lleva a una permeabilidad vascular mejorada que, junto con el reclutamiento de monocitos CCR2+, permite la extravasación eficiente de células tumorales (Figura 4) ¹⁶. Sin embargo, el papel de p38 α en la metástasis del cáncer colorrectal es complejo y se han descrito efectos opuestos, ya que, por ejemplo, la regulación negativa de la señalización de p38 MAPK favorece la metástasis pulmonar de células de cáncer colorrectal previamente establecidas en el hígado, por un mecanismo que depende de la activación de ERK2 ^{11,15}.

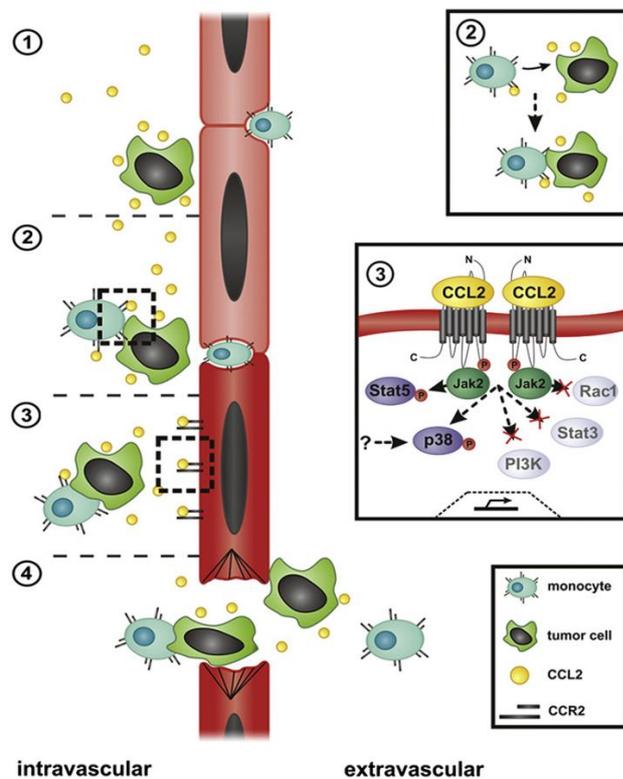


Figura 4. Modelo esquemático que representa la actuación del eje CCL2-CCR2. Muestra cómo las células tumorales que expresan CCL2 atraen monocitos (1 y 2), desencadenan la permeabilidad vascular (3) y migran a través del endotelio (4). La activación de CCR2 dependiente de células tumorales en el endotelio induce la fosforilación de JAK2, Stat5 y p38 MAPK, pero no PI3K, Stat3 y Rac1 ¹⁶.

Así, el eje CCL2-CCR2 es solo uno de los posibles utilizados por las células tumorales para conseguir la extravasación y la metástasis de células tumorales eficientes, cuya inhibición y la de sus dianas posteriores como p38MAPK puede presentarse como una estrategia potencial para prevenir terapéuticamente la metástasis mediada por CCL2 ¹⁶. Esta, junto a inmunoterapias, terapias estromales, terapias contra las células madre del cáncer y terapias dirigidas, constituyen los nuevos modelos terapéuticos en desarrollo para tratar la enfermedad avanzada y así contar con nuevas posibilidades y combinaciones más allá de la quimioterapia, que no resulta de gran utilidad en el tratamiento de la metástasis, como ya se ha mencionado

previamente¹⁷. Esto es porque, aunque la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico haya mejorado, existe una creciente necesidad de terapias eficaces y mejor toleradas, así como un mayor conocimiento de los mecanismos tumorales para poder actuar específicamente¹⁵.

2. Últimos descubrimientos sobre el papel de p38 δ MAPK en cáncer colorrectal

Además de la importante participación de p38 α en CCR, recientemente se ha descubierto la implicación de p38 δ , también muy relevante y muy relacionada con MKK3. La MAPK quinasa 3 o MKK3 es un activador de p38 MAPKs, que participa en diferentes funciones celulares tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, además de la respuesta frente a los fármacos. Es activada por doble fosforilación sobre Ser-189 y Thr-193 por parte de un conjunto de quinasas activadoras conocidas como MEKK1-4. De esta manera, en líneas celulares humanas de cáncer colorrectal (con KRAS, BRAF y TP53 y en diferentes estadios), así como colonocitos primarios, se han podido obtener resultados muy prometedores que se detallan a continuación.

Por un lado, se ha demostrado la elevada y preferente expresión de MKK3 en las fases tardías del CCR, lo que se relaciona además con una menor supervivencia y un peor pronóstico de la enfermedad, en comparación con pacientes que presentan menores niveles de MKK3. Esto pone de manifiesto la importancia pronóstica y patobiológica de MKK3 en CCR.

Por otro lado, se comprueba cómo el silenciamiento de MKK3 a través de un sistema de RNAi inducible por doxiciclina, consigue una disminución del crecimiento celular y un aumento de la muerte celular por activación de autofagia en aquellas líneas celulares sensibles a la depleción de MKK3 y no en los colonocitos primarios. Es decir, que tanto la proliferación celular como la supervivencia dependen de la exacerbación de la cascada de señalización de MKK3.

En cuanto al papel del 5-FU (5-fluorouracilo), se ha visto que este activa la vía de señalización MKK3 en todas las líneas celulares de CCR, pero no en los colonocitos primarios. La exposición a 5-FU junto con el silenciamiento de MKK3 se traduce en un aumento del potencial quimioterapéutico (Figura 5), lo que ocurre incluso en las líneas insensibles a la autofagia inducida por el silenciamiento de MKK3. Esto indica la presencia de otros mecanismos responsables de dicho efecto y que MKK3 dificulta la respuesta al 5-FU.

Se ha descubierto que este otro mecanismo por el que el 5-FU ve comprometida su eficacia depende de la activación de p38 δ MAPK, lo que a su vez requiere de la activación de MKK3, que lo fosforila selectivamente. Así, se comprueba que la señalización de prosupervivencia mediada por MKK3/p38 δ MAPK disminuye la respuesta al 5-FU, entre otras cosas. Además, se respalda la idea de que dichas señales de prosupervivencia dependen también de la regulación positiva de otras proteínas activadas por p38 δ MAPK, como la proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 (ERCC1) en células de CCR (Figura 5).

Finalmente, se constata que la p38 δ MAPK mantiene la malignidad del tumor *in vivo* y su inhibición no solo frena el crecimiento tumoral, sino que además consigue efectos antitumorales por sí sola similares a los que se obtienen en combinación con 5-FU. En general,

el silenciamiento de p38 δ MAPK *in vivo* consigue los efectos que ya se habían descrito para MKK3: se induce autofagia, se inhiben las señales de supervivencia y se induce la muerte celular.

Con todo ello, se pone de manifiesto la importante participación de MKK3 en el desarrollo tumoral, así como de p38 MAPK. Mientras que en presencia de 5-FU la activación de p38 α MAPK produce apoptosis, la activación de la vía de MKK3/p38 δ MAPK/ERCC1 genera señales de supervivencia. Esto revela la necesidad de actuar específicamente frente a las diferentes isoformas de p38 MAPK para optimizar la terapia y obtener así los resultados esperados en los pacientes en tratamiento frente al CCR. Sin embargo, la selectividad requerida, así como la eficacia y seguridad son complicadas por el momento debido al carácter pleiotrópico de p38 MAPK, y es por ello, que se opta por el desarrollo de inhibidores de MKK3. En este caso concreto, se ha visto que el empleo de la quimioterapia junto con un inhibidor de MKK3 favorece la autofagia y la muerte celular (Figura 5), lo que representa una estrategia efectiva y potencialmente segura, ya que actuaría matando las células cancerosas específicamente. Además, puede ser de especial interés en pacientes con CCR en fase tardía, con niveles elevados de MKK3 y cuya opción terapéutica suele ser el tratamiento con 5-FU, esperando de esta combinación una estrategia prometedora para la mejora de los resultados terapéuticos en dichos pacientes ^{18,19}.

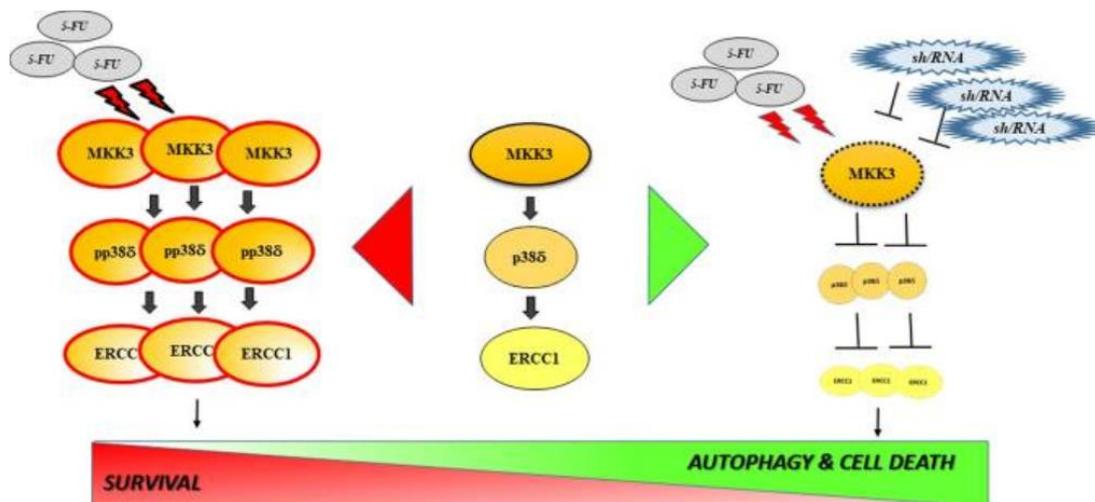


Figura 5. Diferente respuesta celular al 5-FU mediada por MKK3/p38 δ /ERCC1. A la izquierda se muestra cómo la señalización de prosupervivencia generada por MKK3/p38 δ /ERCC1 se intensifica en CCR en respuesta al 5-FU. En cambio, a la derecha se muestra cómo en presencia de un inhibidor de MKK3 se evita la activación de la señalización de prosupervivencia desencadenada por 5-FU, y se produce la autofagia y muerte celular de las células del CCR ¹⁹.

CONCLUSIONES

- p38 α presenta un papel dual en el cáncer colorrectal, ya que actúa como supresor tumoral en las células epiteliales intestinales normales y como inductor tumoral en las células transformadas. En la metástasis, promueve la migración y la invasión de las células tumorales, aunque su papel es complejo.

- La combinación de inhibidores de p38 α , junto a otras combinaciones de terapias dirigidas e inmunoterapias, puede resultar prometedor para el tratamiento del cáncer colorrectal, aunque todavía se requiere una mayor investigación. Se busca la especificidad de isoforma de p38 MAPK, de vía de señalización y del estadio.
- El microambiente tumoral es clave tanto en el desarrollo del cáncer como en la generación de metástasis, por lo que su conocimiento puede ser muy relevante para la obtención de terapias específicas.
- Recientemente, se ha puesto de manifiesto la importante participación de p38 δ en el cáncer colorrectal, proponiéndose como parte de un mecanismo cuya activación compromete la eficacia del 5-FU.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kim EK, Choi E. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2010; 1802(4): 396-405. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009
2. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010; 429(3): 403-417. doi: 10.1042/BJ20100323
3. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2007; 1773(8): 1358-1375. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.03.010
4. Martínez-Limón A, Joaquin M, Caballero M, Posas F, de Nadal E. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(6): 1913. doi: 10.3390/ijms21061913
5. Cuenda A. p38 MAPK alternativas, nuevos actores en la inflamación. *Divulgación científica de la SEBBM.* 2016. doi: 10.18567/sebbmdiv_ANC.2016.01.1
6. Escós A, Risco A, Alsina-Beauchamp D, Cuenda A. p38 γ and p38 δ Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs), New Stars in the MAPK Galaxy. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4: 31. doi: 10.3389/fcell.2016.00031
7. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2015; 1: 15065. doi: 10.1038/nrdp.2015.65
8. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(1): 197. doi: 10.3390/ijms18010197
9. Cáncer colorrectal. *MedlinePlus – Información de Salud de la Biblioteca Nacional de Medicina.* Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000262.htm>
10. Gupta J, del Barco Barrantes I, Igea A, Sakellariou S, Pateras IS, Gorgoulis VG et al. Dual Function of p38 α MAPK in Colon Cancer: Suppression of Colitis-Associated Tumor Initiation but Requirement for Cancer Cell Survival. *Cancer Cell.* 2014; 25(4): 484-500. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.019
11. Gupta J, Nebreda AR. Roles of p38 α mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J.* 2015; 282(10): 1841-1857. doi: 10.1111/febs.13250
12. Grossi V, Peserico A, Tezil T, Simone C. p38 α MAPK pathway: A key factor in colorectal cancer therapy and chemoresistance. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(29): 9744-9758. doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9744
13. Gupta J, Igea A, Papaioannou M, Lopez-Casas PP, Llonch E, Hidalgo M et al. Pharmacological inhibition of p38 MAPK reduces tumor growth in patient-derived

- xenografts from colon tumors. *Oncotarget*. 2015; 6(11): 8539-51. doi: 10.18632/oncotarget.3816
14. Igea A, Nebreda AR. The Stress Kinase p38 α as a Target for Cancer Therapy. *Cancer Res*. 2015; 75(19): 3997-4002. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0173
 15. Pancione M, Giordano G, Parcesepe P, Cerulo L, Coppola L, del Curatolo A et al. Emerging Insight into MAPK Inhibitors and Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Curr Med Chem*. 2017; 24(14): 1383-1402. doi: 10.2174/0929867324666170227114356
 16. Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M, Weber A et al. Endotelial CCR2 Signaling Induced by Colon Carcinoma Cells Enables Extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK Pathway. *Cancer Cell*. 2012; 22(1): 91-105. doi: 10.1016/j.ccr.2012.05.023
 17. Tauriello DVF, Calon A, Lonardo E, Batlle E. Determinants of metastatic competency in colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2017; 11(1): 97-119. doi: 10.1002/1878-0261.12018
 18. Stramucci L, Bossi G. Approaching the challenges of MKK3/p38delta MAPK targeting for therapeutic purpose in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019; 38(504). doi: 10.1186/s13046-019-1513-4
 19. Stramucci L, Pranteda A, Stravato A, Azzurra Amoreo C, Pennetti A, Grazia Diodoro M et al. MMK3 sustains cell proliferation and survival through p38DELTA MAPK activation in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2019; 10(842). doi: 10.1038/s41419-019-2083-2
 20. Arechederra M, Priego N, Vázquez-Carballo A, Sequera C, Gutiérrez-Uzquiza A, Cerezo-Guisado MI et al. p38 MAPK Down-regulates Fibulin 3 Expression through Methylation of Gene Regulatory Sequences. Role in migration and invasion. *J Biol Chem*. 2015; 290(7): 4383-4397. doi: 10.1074/jbc.M114.582239
 21. Priego N, Arechederra M, Sequera C, Bragado P, Vázquez-Carballo A, Gutiérrez-Uzquiza A et al. C3G knock-down enhances migration and invasion by increasing Rap1-mediated p38 α activation, while it impairs tumor growth through p38 α -independent mechanisms. *Oncotarget*. 2016; 7(29): 45060-45078. doi: 10.18632/oncotarget.9911