UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de
Bioquímica y Biología
Molecular I

Líneas de Investigación y Objetivos del Grupo

Modelo experimental celular de aterosclerosis temprana por medio de cultivos primarios de células de músculo liso arteriales. Regulación génica y control nutricional del metabolismo lipídico. Estudios sobre proliferación celular y apoptosis.

Introducción

La desdiferenciación y proliferación de la célula muscular lisa (SMC) en la íntima arterial, es uno de los cambios encontrados en las lesiones ateroscleróticas tempranas cuando la enfermedad es todavía reversible. El colesterol de la dieta es uno de los factores que pueden iniciar estos cambios y en este sentido el pollo hipercolesterolémico como modelo experimental ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio. También hemos estudiado la reversión producida por el aceite de pescado.

Modelo Experimental Celular

Tras una dieta rica en colesterol, hemos podido comprobar la transformación de las SMC procedentes de la aorta de estos animales en cultivo, en unas células que se muestran desdiferenciadas y muy proliferativas (expresado en las curvas de crecimiento de los cultivos y en la síntesis de DNA 4 veces superior en la fase S), acumulan el doble de colesterol intracelular después de 22 días en cultivo y además producen abundante matriz extracelular (ECM) rica en colágeno. Además, estas células después de 22 días en cultivo llegan a transformarse en células espumosas, proceso que se conoce como transdiferenciación. Hemos caracterizado los cultivos de SMC procedentes de pollos controles (SMC-C) y de pollo hipercolesterolémico (SMC-Ch), desarrollando un modelo experimental celular de aterosclerosis temprana para el estudio de los cambios en el estado de diferenciación de las SMC provocados por el colesterol de la dieta. También hemos caracterizado cultivos de SMC

Copyright© 2026 Universidad de Granada

procedentes de pollos alimentados con dieta rica en colesterol a los que se les retira el colesterol y se alimentan con una dieta rica en aceite de pescado (SMC-Ch-FO), comprobando la reversión en la expresión de genes de la apoptosis y la proliferación celular. Dado que el mantenimiento de ambos tipos de cultivos es exactamente el mismo, todos los cambios experimentados en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, la proliferación y la apoptosis han sido debidos al colesterol o al aceite de pescado de la dieta, incidiendo en el concepto de control nutricional de la expresión génica.

Resumen

Estudios previos en nuestro laboratorio utilizando este modelo experimental celular han demostrado las alteraciones en la síntesis de lípidos, asimismo hemos clonado y secuenciado un fragmento de cDNA de la enzima HMG-CoA reductasa de pollo y mediante RT-PCR competitivo, hemos podido comprobar alteraciones en la expresión de mRNA de la HMG-CoA reductasa de SMC-Ch con respecto a SMC-C. En nuestro modelo las células de los cultivos SMC-Ch internalizan más cantidad de LDL, acumulan y sintetizan más colesterol, por lo que carecen de inhibición feed-back de la HMG-CoA reductasa.

De los estudios comparativos realizados sobre la proliferación y la apoptosis en cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO podemos destacar que la expresión de proteínas antiapoptóticas / proapoptóticas en SMC muestran una relación Bcl-2 / Bax menor en SMC-Ch, por lo que estas células tendrían una mayor predisposición a la apoptosis. Sin embargo los cultivos SMC-Ch-FO muestran valores intermedios e incluso mayores. Los niveles de expresión del gen bcl-Xl medidos por medio de RT-PCR a tiempo real es menor. Hemos estudiado la expresión de los genes c-myc, bcl-2, bcl-Xl, p53 y caspasa-3 y hemos demostrado que la sustitución de la dieta rica en colesterol por una dieta enriquecida con aceite de pescado provoca en las SMC arteriales una reversión de los cambios inducidos por el colesterol, tal y como muestran los valores intermedios de proliferación, apoptosis y el balance entre proteínas antiapoptóticas / proapoptóticas. Además se produce una disminución en los niveles de expresión del gen c-myc tras estímulos apoptóticos y un aumento de expresión de los genes bcl-2 y p53 mostrando que el aceite de pescado ejerce una protección frente a la apoptosis en las SMC.

Patente

Como se expone anteriormente, una de las características de las SMC oportunamente transformadas por una dieta rica en colesterol es la producción de abundante matriz extracelular (ECM). Lo que en un principio, para nuestro trabajo de investigación, no era más que un subproducto que dificultaba el despegue de las

Copyright© 2026 Universidad de Granada

células en el cultivo para su posterior utilización en un experimento, puede ser la matriz ideal para el cultivo de otras células animales y humanas ya que tras su preparación queda una matriz tridimensional con variedad y riqueza en composición y estructura de proteínas de la ECM, que libre de células y esterilizada puede ser utilizada como sustrato para cultivos celulares y, al ser totalmente natural, puede favorecer de forma extraordinaria la adhesión de las células a la placa de cultivo y por lo tanto aumentar la eficiencia y productividad del mismo. También puede favorecer la diferenciación celular controlando la composición de la matriz extracelular así como los factores de crecimiento adecuados. Hemos desarrollado una patente (NºP99/00210) sobre la producción de estas matrices tridimensionales naturales (Matricel) a partir de la ECM de cultivos de células SMC de aorta de pollo SMC-Ch y es objetivo del grupo el estudio de la regulación de su síntesis y remodelación así como su aplicación al cultivo de células troncales.

Efecto del colesterol y de inhibidores de la síntesis y remodelación de la matriz extracelular sobre la transdiferenciación a células espumosas de células de músculo liso arteriales en cultivo.

Introducción

En los organismos vivos las células se encuentran rodeadas de una red proteica que ellas mismas producen y moldean en el espacio intercelular. Esta red proteica es la matriz extracelular (ECM), la cual ejerce a su vez un gran control sobre los procesos de la célula a través de señales que regulan la actividad de quinasas citoplasmáticas, factores de crecimiento y canales iónicos, además de controlar la organización del citoesqueleto. La ECM no solo controla actividades enzimáticas concretas, sino que median procesos completos tan importantes para la célula como el progreso del ciclo celular (proliferación), la diferenciación y la supervivencia celular. El objetivo de esta línea de investigación se centra en analizar el papel de la ECM en las SMC en la formación de las células espumosas en un proceso aterósclerótico. El mecanismo molecular de la captación de lípidos en SMC y su transdiferenciación a células espumosas en un proceso aterosclerótico no está todavía clarificado por completo. La mayoría de los conocimientos que tenemos hasta ahora se han obtenido con macrófagos, sin embargo pensamos que las proteínas SREBPs, PPARs, LXR, ABCs, Rho y Ras deben jugar un papel fundamental también en SMC de la misma forma que ocurre en macrófagos. Otro factor que puede tener un papel importante en la formación de células espumosas derivadas de SMC es CD36, uno de los receptores scavenger de macrófagos responsable de más del 50% de la captación de lípidos. Se

Copyright© 2026 Universidad de Granada

ha demostrado que cultivos primarios de SMC humanos expresan constitutivamente CD36 y PPARγ así como que el tratamiento de los cultivos de estas células con agonistas de PPARγ, incrementa la expresión de CD36. Es por esto que el objetivo central de esta línea de investigación ha sido estudiar los mecanismos moleculares que regulan la formación de células espumosas en SMC a nivel de SREBPs, PPARs, LXR, ABCs, Rho, Ras y CD36.

Resumen

La homeostasis del colesterol se mantiene a través de la regulación coordinada de las rutas que dan lugar a la captación de colesterol por la célula, su almacenaje, la síntesis de novo y su salida de la célula. La desregulación de estas rutas promueve la formación de células espumosas por acumulación de lípidos. En respuesta a la entrada de lipoproteínas, la regulación del metabolismo del colesterol celular se efectúa en parte por medio del receptor de hormona nuclear PPARα y PPARγ (peroxisome proliferator activated receptor) y por LXR (liver X receptor), factores de transcripción activados por ligando que actúan sobre genes involucrados en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas. La principal fuente de ligandos endógenos para estos receptores son derivados de ácidos grasos y los oxisteroles derivados de la ruta de biosíntesis del colesterol o del colesterol de las lipoproteínas. Esta ruta proporciona además metabolitos del mevalonato, no esteroles, involucrados en la síntesis de isoprenoides y de las proteínas isopreniladas derivadas de ellos que se han asociado principalmente a la regulación del ciclo celular. Se ha demostrado en macrófagos que estos intermediarios isoprenoides afectan a PPARα y PPARγ y a la activación de LXRα, lo que sugiere que pueden tener un papel en la regulación de la homeostasis de lípidos y potencialmente en la formación de células espumosas.

Las estatinas, inhibidores específicos de la HMG-CoA reductasa, los inhibidores específicos de farnesil transferasas (manumicina A) y geranil-geranil transferasas (GTI-298) producen una fuerte inhibición en la síntesis de colágeno en cultivos de SMC arteriales. Este efecto revierte al añadir al medio de cultivo mevalonato y geranil geranil pirofosfato. Además, las estatinas, manumicina A y GTI-298 inhiben la expresión del gen del colágeno tipo I a nivel del promotor. El efecto observado por las estatinas en las SMC a nivel del gen del colágeno tipo I, está mediado por una alteración en la isoprenilización de proteínas en la célula y la activación de Rho A. Las tetraciclinas poseen propiedades no inherentes a su actividad bactericida que le confieren propiedades anti-ateroscleróticas tales como la inhibición de la proliferación y la migración celular, así como la inhibición de hiperplasia de la íntima. Con relación a la ECM, aunque el efecto inhibitorio sobre la actividad de las metaloproteinasas (MMPs) en las SMC arteriales en cultivo está bien descrito, poco se sabe sobre el efecto de este fármaco sobre la producción de ECM por las SMC.

Copyright© 2026 Universidad de Granada

Nuestros resultados demuestran que la doxiciclina inhibe la síntesis y la expresión de proteínas de ECM, particularmente a nivel de la síntesis de colágeno y de la expresión de los genes que codifican para colágeno I, II, III, MMP-2 y fibronectina. Además, muestran que la doxiciclina inhibe la producción y la remodelación de la ECM en un mecanismo dependiente de la isoprenilación de proteínas y la activación de Rho A.

El aporte de colesterol tanto in vivo como in vitro, produce un fuerte incremento de la producción de matriz extracelular en cultivos de SMC. Este efecto es dependiente de la isoprenilación de proteínas y de la activación de proteínas G de membrana. Tanto las estatinas como la doxiciclina inhiben la producción y la remodelación de matriz extracelular en cultivos de SMC, esta inhibición es dependiente de la isoprenilación de proteínas y por tanto de la activación de proteínas G de membrana. Además, las estatinas incrementan la expresión del gen pparγ y disminuyen la expresión de los genes srebp-1 y lxr, lo que podría explicar efectos de las estatinas. El efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) sobre la expresión de genes responsables de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular en cultivos de SMC varía según el tipo de PUFA y del gen. Así, el EPA y el DHA incrementan la expresión del gen col1α2 y el AA la disminuye. La expresión de los genes col2α1, col3α1, fibronectina y mmp2, disminuye. Además, los PUFAs inhiben la activación de Rho A y la expresión del gen srebp-1, e inducen la expresión del gen pparγ.

La inhibición de la síntesis de proteínas de la ECM en las SMC debe estar íntimamente relacionada con la disminución del engrosamiento de la intima en la aterosclerosis ya que este proceso, además del incremento de la proliferación, transdiferenciación y migración de las SMC, requiere el aumento de la síntesis de ECM que le sirva de andamiaje para que las células puedan crecer y migrar.

Estudio de la correlación de la respuesta clínica a gemcitabina y a erlotinib en pacientes con adenocarcinoma de páncreas y la expresión génica por microarrays en células de tejido y de sangre periférica.

Introducción

La gemcitabina es un fármaco standard para el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas (PDAC) avanzado. El mecanismo de acción de la gemcitabina implica su metabolización intracelular a nucleósido difosfato y trifosfato, ambos con actividad citotóxica al inhibir la síntesis de DNA, induciendo la apoptosis. Erlotinib es un

Copyright© 2026 Universidad de Granada

inhibidor de HER1, familia de EGFR, componentes clave de la vía de transmisión de señales alterada relacionada con la aparición y crecimiento de numerosos tipos de cáncer. Su mecanismo de acción se ejerce a nivel de la inhibición de la actividad de la tirosina quinasa de los HER1 y la transmisión de señales iniciada por activación de estos receptores, bloqueando así la proliferación de las células tumorales.

Resumen

El objetivo de esta línea de investigación es determinar el efecto de los tratamientos con gemcitabina y erlotinib sobre la expresión de genes que controlan la proliferación y la apoptosis en células de adenocarcinoma de páncreas y en sangre periférica. El perfil de expresión génica se está estudiando con bioarrays a partir de RNA total de sangre periférica obtenido con Blood RNA y purificado con kit RNAeasy de Quiagen. La validación de los resultados se realiza por PCR cuantitativa a tiempo real. Hemos comprobado el efecto de la gemcitabina en la proliferación y en la viabilidad de cultivos celulares. El tratamiento resulta en una inhibición de la proliferación y una inducción apoptótica, (ensayos de MTT, análisis del ciclo celular, incorporación de BrdU y apoptosis por Anexina-V). Se ha realizado un PCR Array de 84 genes implicados en la transformación y la tumurogénesis, 29 genes están reprimidos dos veces y sólo 3 están inducidos dos veces en células tratadas con gemcitabina respecto al control. También se han realizado Western blots y análisis de proteínas apoptóticas mediante array de anticuerpos.

Perfil de expresión génica: Se estudia el perfil de expresión génica en células tisulares y sanguíneas de pacientes con cáncer de páncreas por microarray y se compara con el que se obtiene en individuos sanos. Una vez identificados los genes candidatos en el cáncer de páncreas, se estudia la respuesta a tratamiento con gemcitabina sola o la combinación de gemcitabicina y erlotinib, para esto se comparan los perfiles de expresión antes y después de 15 días de tratamiento. La eficacia se mide por parámetros clínicos que indican progresión o no del tumor (criterios RECIST). Se quiere identificar el perfil de expresión que determine el pronóstico de la evolución del cáncer de páncreas y la respuesta o resistencia al tratamiento.

Perfil de expresión de proteínas: Se estudia el perfil de expresión de proteínas en suero de pacientes con cáncer de páncreas por Arrays de Proteínas (microarrays de anticuerpos) y se compara con el perfil que se obtiene en individuos sanos. Una vez identificadas las proteínas presentes en el suero de pacientes con cáncer de páncreas, se estudia la respuesta a tratamiento con gemcitabina sola o la combinación de gemcitabicina y erlotinib, para esto se comparan los perfiles proteicos antes y después de 15 días de tratamiento. La eficacia se mide por parámetros clínicos que indican progresión o no del tumor (criterios RECIST). Se

Copyright© 2026 Universidad de Granada

quiere identificar el perfil de expresión que pueda determinar el pronóstico de la evolución del cáncer de páncreas y la respuesta o resistencia al tratamiento, con objeto de considerar los tratamientos individualizados.

Los resultados que demuestran la presencia de una o varias proteínas marcadoras son apoyados con otros estudios complementarios tales como mecanismos de actuación, rutas de señalización celular y validación con estudios de expresión de los genes que codifican para dichas proteínas marcadoras. Estos estudios se realizan en cultivos celulares

Copyright© 2026 Universidad de Granada