



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE  
CASTILLA Y LEÓN

**PAPEL DE LA TOLBUTAMIDA EN LAS  
CÉLULAS DE GLIOMA. EFECTO  
ANTIPROLIFERATIVO E IMPLICACIÓN EN LA  
TERAPIA GÉNICA SUICIDA**

TESIS DOCTORAL  
2008

**M<sup>a</sup> TERESA PAÍNO GÓMEZ**

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Características generales de los gliomas.</b>	<b>3</b>
1.1.1. Clasificación de los gliomas.	4
1.1.1.1. Astrocitomas.	5
I. Astrocitoma pilocítico.	5
II. Astrocitoma de bajo grado.	5
III. Astrocitoma anaplásico.	6
IV. Glioblastoma multiforme.	6
1.1.1.2. Oligodendrogliomas.	7
1.1.1.3. Ependimomas.	8
1.1.2. Alteraciones moleculares en los gliomas.	8
1.1.2.1. Alteraciones en el control de la transición G1-S del ciclo celular.	8
I. Vía p16/CDKs/Rb.	8
II. Vía p53/MDM2/p14.	11
1.1.2.2. Otras alteraciones moleculares.	12
1.1.3. Células madre en gliomas.	14
<b>1.2. Comunicación intercelular y proliferación celular.</b>	
<b>Implicación de las conexinas en los gliomas.</b>	<b>17</b>
1.2.1. Estructura de las <i>gap junctions</i> . La conexina 43.	17
1.2.2. Regulación de la permeabilidad de las <i>gap junctions</i> .	19
1.2.2.1. Tolbutamida.	21
1.2.2.2. cAMP.	22
1.2.2.3. Carbenoxolona.	23
1.2.3. Implicación de la conexina 43 en la proliferación de los gliomas.	24
1.2.4. Implicación de la conexina 43 en la migración e invasión de los gliomas.	26
<b>1.3. Canales de potasio sensibles a ATP (K-ATP).</b>	<b>29</b>
1.3.1. Estructura molecular de los canales de potasio sensibles al ATP.	29
1.3.2. Regulación de los canales de potasio sensibles al ATP.	31
1.3.2.1. Nucleótidos.	31
1.3.2.2. Sulfonilureas.	32
1.3.2.3. Diazóxido y pinacidilo.	33
1.3.3. Implicación de los canales de potasio sensibles al ATP en la proliferación.	33
<b>1.4. Abordaje terapéutico de los gliomas.</b>	<b>35</b>
1.4.1. Quimioterapia: temozolomida.	35
1.4.2. Terapias moleculares.	36
1.4.3. Terapia génica.	37
1.4.3.1. Tipos de vectores.	39
I. Vectores virales.	39
II. Vectores no virales.	41

<b>1.5. Terapia génica suicida.</b>	<b>43</b>
1.5.1. El sistema timidina kinasa del virus del herpes simple tipo I/ganciclovir (HSVtk/GCV).	43
1.5.2. El sistema citosina desaminasa/5-fluorocitosina (CD/5-FC)..	47
1.5.3. El efecto <i>bystander</i> . Implicación de las <i>gap junctions</i> en la terapia génica suicida.	48
<b>2. PLAN DE TRABAJO.</b>	<b>51</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS..</b>	<b>55</b>
<b>3.1. MATERIAL..</b>	<b>57</b>
3.1.1. Líneas celulares utilizadas..	57
3.1.2. Medios instrumentales..	57
3.1.3. Productos.	60
3.1.3.1. Productos utilizados en la preparación de los cultivos celulares.	60
3.1.3.2. Productos utilizados en los experimentos para la detección de proteínas específicas.	60
3.1.3.3. Productos utilizados en los experimentos de RT-PCR.	62
3.1.3.4. Productos utilizados en los experimentos de silenciamiento.	63
3.1.3.5. Productos utilizados en la construcción del plásmido pRFPHSVtk.	64
3.1.3.6. Productos utilizados en los experimentos de toxicidad del ganciclovir y estudio del efecto <i>bystander</i> .	67
3.1.3.7. Otros productos.	67
<b>3.2. MÉTODOS.</b>	<b>67</b>
3.2.1. Preparación de los cultivos celulares..	67
3.2.1.1. Composición de las disoluciones.	67
3.2.1.2. Preparación del cultivo de células de glioma.	68
3.2.2. Tratamientos celulares.	69
3.2.3. Determinación de la permeabilidad celular.	69
3.2.4. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo <i>Western</i> .	71
3.2.4.1. Extracción de las proteínas.	71
3.2.4.2. Cuantificación de las proteínas.	71
3.2.4.3. Preparación de los geles.	71
3.2.4.4. Preparación de las muestras para la electroforesis.	72
3.2.4.5. Electroforesis de las proteínas.	72
3.2.4.6. Electrotransferencia..	73
3.2.4.7. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana.	73
3.2.4.8. Inmunodetección.	73
3.2.5. Determinación de la expresión y localización de proteínas mediante inmunocitoquímica.	75
3.2.6. Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA ( <i>small interfering RNA</i> ).	76
3.2.7. Análisis del mRNA de proteínas específicas mediante RetroTranscripción seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).	78
3.2.7.1. Extracción del RNA total.	78

3.2.7.2. Retrotranscripción. . . . .	78
3.2.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). . . . .	79
3.2.8. Construcción del plásmido pRFPHSVtk. . . . .	80
3.2.8.1. Transformación bacteriana y extracción del DNA plasmídico. . . . .	80
3.2.8.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). . . . .	81
3.2.8.3. Electroforesis y purificación de DNA. . . . .	81
3.2.8.4. Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción. . . . .	82
3.2.8.5. Ligación de la secuencia de la HSVtk en el vector pIRES2-DsRed2. . . . .	82
3.2.8.6. Secuenciación de la HSVtk. . . . .	82
3.2.9. Transfección de las células de glioma y selección de clones. . . . .	83
3.2.10. Evaluación de la eficacia de la terapia génica suicida en células de glioma. . . . .	84
3.2.10.1. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT. . . . .	84
3.2.10.2. Evaluación de la toxicidad mediante cuantificación de núcleos. . . . .	85
3.2.10.3. Estudio de la apoptosis mediante tinción con anexina-V. . . . .	85
3.2.10.4. Estudio de la apoptosis mediante la técnica TUNEL. . . . .	86
3.2.11. Análisis estadístico de los resultados. . . . .	87
<b>4. RESULTADOS. . . . .</b>	<b>89</b>
<b>4.1. Estudio del efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la permeabilidad de las <i>gap junctions</i>, la expresión de la conexina 43 y la proliferación en las células de glioma. . . . .</b>	<b>91</b>
4.1.1. Estudio en la línea celular de glioma de rata C6. . . . .	91
4.1.1.1. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la permeabilidad de las <i>gap junctions</i> y sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6. . . . .	92
4.1.1.2. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 en células de glioma de rata C6. . . . .	95
4.1.1.3. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 en células de glioma de rata C6 que poseen la conexina 43 silenciada. . . . .	98
4.1.2. Estudio en las líneas celulares de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138. . . . .	100
4.1.2.1. Niveles de expresión de Ki-67 y de la conexina 43 en las líneas celulares de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138. . . . .	100
4.1.2.2. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la permeabilidad de las <i>gap junctions</i> y sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138.....	102
4.1.2.3. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27 en células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138. . . . .	110
4.1.2.4. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27 en células de glioma humano U373 que poseen la conexina 43 silenciada. . . . .	123
4.1.2.5. Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la proliferación de las células de glioma humano U373. . . . .	128

<b>4.2. Caracterización molecular y farmacológica del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP) en las células de glioma.</b>	<b>131</b>
4.2.1. Efecto de agentes activadores del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP) sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6 tratadas con tolbutamida y/o db-cAMP.	131
4.2.2. Caracterización molecular del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP) en las células de glioma.	133
<b>4.3. Estudio de la eficacia de la terapia génica suicida (timidina kinasa del virus del herpes simple/ganciclovir) en las células de glioma.</b>	<b>139</b>
4.3.1. Terapia génica suicida en células de glioma de rata C6.	140
4.3.1.1. Diseño de un modelo experimental de terapia génica suicida en células de glioma de rata C6.	140
I. Construcción del plásmido pRFPHSVtk, transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones.	140
IA. Clonación del gen HSVtk.	140
IB. Clonación del vector que contiene la RFP, pIRES2-DsRed2.	143
IC. Inserción de la secuencia de la HSVtk en el vector pIRES2-DsRed2.	144
ID. Transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones.	148
II. Estudio de la toxicidad del ganciclovir y determinación de la dosis óptima.	148
III. Estudio de la expresión de la timidina kinasa del virus del herpes simple.	152
4.3.1.2. Estudio del efecto <i>bystander</i> del db-cAMP en células de glioma de rata C6. Implicación de las <i>gap junctions</i> .	153
4.3.1.3 Estudio del efecto <i>bystander</i> de la tolbutamida en células de glioma de rata C6. Implicación de las <i>gap junctions</i> .	156
4.3.2. Terapia génica suicida en células de glioma humano U373.	159
4.3.2.1. Estudio de la toxicidad del ganciclovir en células de glioma humano U373.	159
4.3.2.2. Estudio del efecto <i>bystander</i> de la tolbutamida en células de glioma humano U373.	162
4.3.2.3. Estudio de la implicación de las <i>gap junctions</i> y de la conexina 43 en el efecto <i>bystander</i> de la tolbutamida en células de glioma humano U373.	169
<b>5. DISCUSIÓN.</b>	<b>177</b>
5.1. Efecto antiproliferativo de la tolbutamida en las células de glioma. Participación de la conexina 43.	179
5.2. Efecto <i>bystander</i> de la tolbutamida en la terapia génica suicida en las células de glioma.	188
<b>6. CONCLUSIONES.</b>	<b>195</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>199</b>



## ABREVIATURAS

**5-FC:** 5-fluorocitosina

**5-FU:** 5-fluorouracilo

**AGA-** ácido 18- $\alpha$ -glicirretínico

**AMPS:** persulfato de amonio

**CBX:** carbenoxolona

**CD:** citosina desaminasa

**CDK4/6:** kinasa dependiente de ciclinas 4/6

**CDKN2:** gen que codifica la proteína p16

**Cx:** conexina

**Cx43-siRNA:** siRNA de la conexina 43

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**db-cAMP:** dibutiril-cAMP

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EDTA:** ácido etilenglicol-bis-(b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético

**EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico

**ET-1:** endotelina-1

**FCS:** suero fetal de ternero

**GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GBM:** glioblastoma multiforme

**GCV:** ganciclovir

**HSVtk:** timidina kinasa del virus del herpes simple

**K-ATP:** canal de potasio sensible al ATP

**LB:** medio Luria Bertani

**LOH:** pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10 (*Loss Of Heterozygosity*)

**MDM2:** murine double minute

**MGMT:** O<sup>6</sup>-metilguanina-DNAmetiltransferasa

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio

**nt-siRNA:** siRNA sin diana (*non-target siRNA*)

**OMS:** organización mundial de la salud

**Pb:** par de bases

**PBS:** tampón fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PIP3:** fosfatidilinositol-trifosfato

**pIRES2-DsRed2:** plásmido que codifica la RFP

**PMSF:** fenilmetilsulfonilfluoruro

**pRFPHSVtk:** plásmido que codifica la RFP y la HSVtk

**PS:** fosfatidilserina

**PTEN:** homólogo de tensina y fosfatasa

**Rb:** retinoblastoma

**RB1:** gen del retinoblastoma

**RFP:** proteína roja fluorescente

**RT-PCR:** retrotranscripción seguida de PCR

**SDS:** dodecil sulfato sódico

**siRNA:** RNA de interferencia (*small interfering RNA*)

**SNC:** sistema nervioso central

**TBS:** tampón tris salino

**TdT:** transferasa terminal de deoxinucleótidos

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

**Tolbu:** tolbutamida

**TP53:** gen que codifica la proteína p53

**TUNEL:** *TdT-mediated dUTP-biotine Nick End Labeling*

**YP:** yoduro de propidio



“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía”.

**Mary Shelley (Frankenstein)**

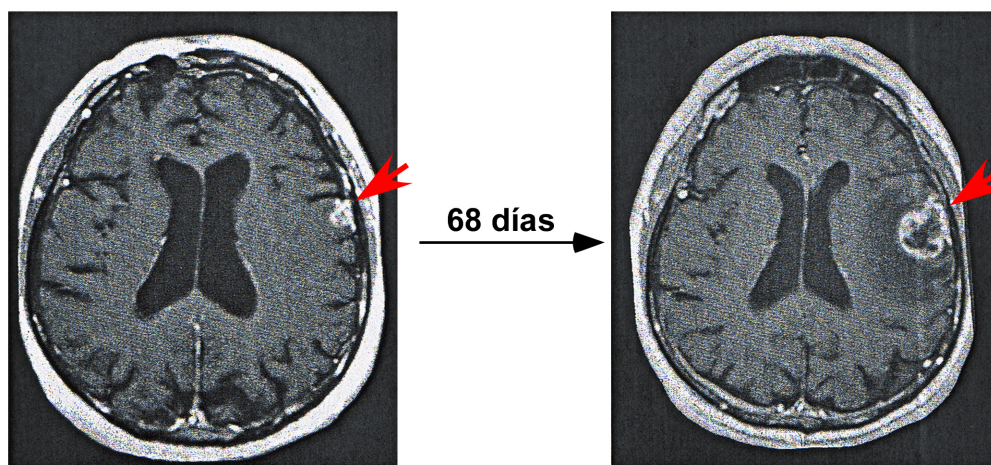




### 1.1. Características generales de los gliomas.

Los tumores cerebrales constituyen aproximadamente un 2% de todas las neoplasias malignas (Furnari *et al.*, 2007). En general, presentan un amplio espectro de efectos adversos y un mal pronóstico. Además, una proporción significativa de las neoplasias del Sistema Nervioso Central (SNC) afectan a niños, situándose en segundo lugar en términos de incidencia, después de las leucemias. Los estudios epidemiológicos muestran una considerable variabilidad geográfica en la incidencia de los tumores cerebrales, que generalmente tiende a ser más alta en los países industriales y desarrollados. Existe una controversia sobre el posible aumento en la incidencia de los tumores cerebrales en las últimas dos décadas, especialmente en las personas de edad avanzada, ya que, según algunos autores, este aparente incremento se debería, al menos en parte, a la introducción de técnicas de neuroimagen de alta resolución que mejorarían el diagnóstico clínico de las enfermedades neurológicas.

Los gliomas son los tumores cerebrales primarios más comunes. Éstos pueden derivar de tres tipos celulares: los astrocitos, los oligodendrocitos y las células endimarias. De todos ellos, el glioblastoma multiforme (GBM) es el que presenta mayor malignidad, representando el 29% de todos los tumores cerebrales primarios y el 50% de los gliomas (Stark *et al.*, 2005). A pesar de la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, el GBM tiene, en la mayoría de los casos, una rápida progresión (véase imagen 1), un desenlace fatal y la esperanza media de supervivencia es de menos de un año. El hecho de ser un tumor altamente infiltrativo hace muy difícil la resección total mediante cirugía y la alta tasa de recurrencia, una característica en la que se cree que interviene la población de células madre presente en estos tumores (véase más adelante el apartado 1.1.3.), da lugar a la ineficacia de los tratamientos radio y quimioterapéuticos disponibles en la actualidad. Todo ello hace necesario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que resulten más eficaces y selectivas.



**Imagen 1. Imagen de resonancia magnética de un glioblastoma primario.**

Una pequeña lesión cortical evoluciona rápidamente hacia una gran masa tumoral. Modificado de Stewart and Kleihues, 2003.

### 1.1.1. Clasificación de los gliomas.

La clasificación tradicional de los gliomas está basada en características histopatológicas. De esta forma, los signos histológicos principales en los que se basan los diferentes sistemas de clasificación, incluido el de la Organización Mundial de la Salud (OMS), son los siguientes (Gudinaviciene *et al.*, 2004):

- Atipia nuclear
- Actividad mitótica
- Proliferación vascular
- Necrosis

Estas características se hacen más evidentes cuanto mayor es el grado de malignidad del tumor aunque debido a la presencia heterogénea de las mismas en los gliomas, se hace necesario un sistema de clasificación y diagnóstico más objetivo, basado en las características moleculares de los diferentes gliomas. Por ello, actualmente se tiende a una clasificación basada en dichas características ya que

además, éstas pueden aportar datos acerca de cuál puede ser el tratamiento más efectivo.

Como se ha mencionado anteriormente, existen tres tipos de gliomas atendiendo al origen celular; éstos son los astrocitomas, los oligodendrogliomas y los ependimomas.

#### **1.1.1.1. Astrocitomas.**

Los astrocitomas son tumores compuestos principalmente por astrocitos anaplásicos y se clasifican en cuatro grados, (Kleihues *et al.*, 1993; Kleihues and Sobin, 2000) según su nivel de malignidad, de acuerdo con la OMS:

- I. Astrocitoma pilocítico (Grado I).
- II. Astrocitoma de bajo grado (Grado II).
- III. Astrocitoma anaplásico (AA) (Grado III).
- IV. Glioblastoma multiforme (GBM) (Grado IV).

La OMS publicó en 2007 una nueva revisión de la clasificación de los tumores del SNC (Furnari *et al.*, 2007) en la que se incluyen nuevas entidades patológicas así como variaciones de las ya existentes.

#### **I. Astrocitoma pilocítico.**

El astrocitoma pilocítico es el tumor cerebral más frecuente en los niños, con un pico de incidencia alrededor de los 10 años. El astrocitoma pilocítico es una lesión definida, quística, que se expande lentamente y que, muy rara vez, muestra tendencia a progresar hacia la anaplasia y, por lo tanto, se clasifica, según la OMS, como grado I (Kleihues *et al.*, 1993). El astrocitoma pilocítico suele localizarse en estructuras medias tales como el nervio óptico, el tercer ventrículo, el tálamo, el lóbulo medio temporal, el tallo cerebral y el cerebelo. Desde el punto de vista histológico, destaca la presencia de células bipolares, fusiformes o piloides, con una fibrilación densa. Las “fibras de Rosenthal” y los “cuerpos granulares” son marcadores histopatológicos de los astrocitomas pilocíticos.

#### **II. Astrocitoma de bajo grado.**

El astrocitoma de bajo grado ocurre principalmente en adultos jóvenes, con un pico de incidencia entre los 40 y los 50 años. Se caracteriza por ser una lesión con márgenes poco definidos, con tendencia a la infiltración y que aparece, principalmente, en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales. Las figuras mitóticas son muy raras o están ausentes. Microscópicamente, el astrocitoma de bajo grado varía desde un tumor bien diferenciado hasta una lesión pleomórfica y los núcleos presentan un aspecto redondo u ovalado.

### **III. Astrocitoma anaplásico.**

El AA presenta unas características intermedias entre el astrocitoma de bajo grado y el glioblastoma, con respecto a la edad de mayor incidencia y al grado de anormalidad macroscópica (Burger *et al.*, 1985). El AA presenta mayor pleomorfismo que el astrocitoma de bajo grado y las figuras mitóticas están presentes. Otra característica es la atipia nuclear. El AA tiene una rápida tendencia a progresar hacia el glioblastoma.

### **IV. Glioblastoma multiforme.**

El GBM es el más común y más maligno de los tumores cerebrales en adultos, constituyendo el 50% de todos los gliomas (Stark *et al.*, 2005). Este tipo de tumores fueron descritos por primera vez por Rudolf Virchow en 1863, recibiendo la denominación de “espongioblastoma”. Posteriormente se cambió el término por el de “glioblastoma”. El término “multiforme” hace referencia a la heterogeneidad celular que presentan. El GBM se localiza, en la mayoría de los casos, en los hemisferios cerebrales, en especial en los lóbulos frontal y temporal. Stark y col. mostraron en un estudio con 267 pacientes adultos con GBM que, en la mayoría de los casos, la localización es multilobular (Stark *et al.*, 2005), en parte debido a la migración de las células tumorales a través de estructuras mielinizadas, principalmente el cuerpo calloso, que proporcionan a la lesión un aspecto similar a una mariposa (Kettenmann and Ransom, 1995). Los principales síntomas que presentan los pacientes incluyen dolor de cabeza, cambios en la personalidad y elevada presión intracraneal.

Desde el punto de vista histológico, el GBM presenta una amplia variedad de alteraciones, como son la necrosis, las hemorragias ocasionales, la prominente

proliferación vascular, la aparición de células gigantes, el polimorfismo nuclear o la elevada actividad mitótica. Según la clasificación hecha por Scherer en el año 1940, existen dos grandes tipos de GBM: el GBM primario y el GBM secundario (Ohgaki and Kleihues, 2007). Aunque morfológica y clínicamente ambos tipos de GBM son indistinguibles (Furnari *et al.*, 2007), en realidad constituyen dos entidades diferenciadas, puesto que afectan a pacientes con diferentes edades, se desarrollan a través de rutas genéticas distintas, presentan diferentes patrones de expresión de proteínas y RNA y sus respuestas a la radio y a la quimioterapia, varían (Ohgaki and Kleihues, 2007). En apartados posteriores se explicarán con más detalle las diferencias, a este nivel, que existen entre ambos tipos de GBM.

El GBM primario es mucho más frecuente que el GBM secundario y se caracteriza por la ausencia de un astrocitoma maligno preexistente, es decir, que surge *de novo*. La incidencia es mayor en personas de edad avanzada, concretamente el pico está entre los 60-70 años (Franco-Hernandez *et al.*, 2007), y el tiempo durante el cual progresa y se desarrolla la enfermedad es muy corto, alrededor de 1 año.

Por el contrario, el GBM secundario se desarrolla más lentamente y lo hace a partir de astrocitomas de menor grado, como el astrocitoma de bajo grado (grado II) o el astrocitoma anaplásico (grado III), que progresan durante un período de unos 4 ó 5 años hasta el GBM secundario. El mayor pico de incidencia en estos tumores está en torno a los 40-50 años (Franco-Hernandez *et al.*, 2007).

#### **1.1.1.2. Oligodendrogliomas.**

Los oligodendrogliomas se desarrollan a partir de células oligodendrogiales productoras de mielina o de sus precursores y se localizan, normalmente, en los hemisferios cerebrales de adultos, incluyendo a menudo los ganglios basales (Stewart, 2003). Los oligodendrogliomas presentan una infiltración difusa, apareciendo en la zona periférica focos de calcificación que son marcadores de este tipo de tumores. Histológicamente, las células muestran núcleos redondeados rodeados de un halo claro, por lo que se dice que presentan aspecto de “huevo frito”. Los oligodendrogliomas se incluyen, según la OMS, entre los tumores de grado II, mientras que los oligodendrogliomas anaplásicos, presentan grado III.

### **1.1.1.3. Ependimomas.**

Los ependimomas se desarrollan a partir de las células ependimarias que rodean los ventrículos y el canal central de la espina dorsal. Se manifiestan preferentemente en niños y adultos jóvenes (Stewart, 2003). Histológicamente, son celulares con típicas rosetas perivasculares.

### **1.1.2. Alteraciones moleculares en los gliomas.**

En la actualidad está totalmente aceptado que los procesos cancerígenos se desarrollan a través de una serie de alteraciones genéticas y moleculares que confieren a las células tumorales unas características especiales en lo referente a los procesos de proliferación, muerte celular, migración e invasión y angiogénesis, entre otros. El análisis de dichas alteraciones es fundamental a la hora de establecer el diagnóstico, el pronóstico y, por supuesto, dianas terapéuticas para diseñar tratamientos altamente selectivos y eficaces. En los apartados posteriores se resumen algunas de las principales alteraciones moleculares descritas hasta ahora en los gliomas y en las que están implicados reconocidos oncogenes y genes supresores de tumores, haciéndose especial hincapié en las diferencias existentes entre los GBMs primarios y secundarios. El esquema 1 representa un resumen de dichas alteraciones moleculares, así como de las principales características patológicas y del tiempo y modo de evolución de los GBMs primarios y secundarios.

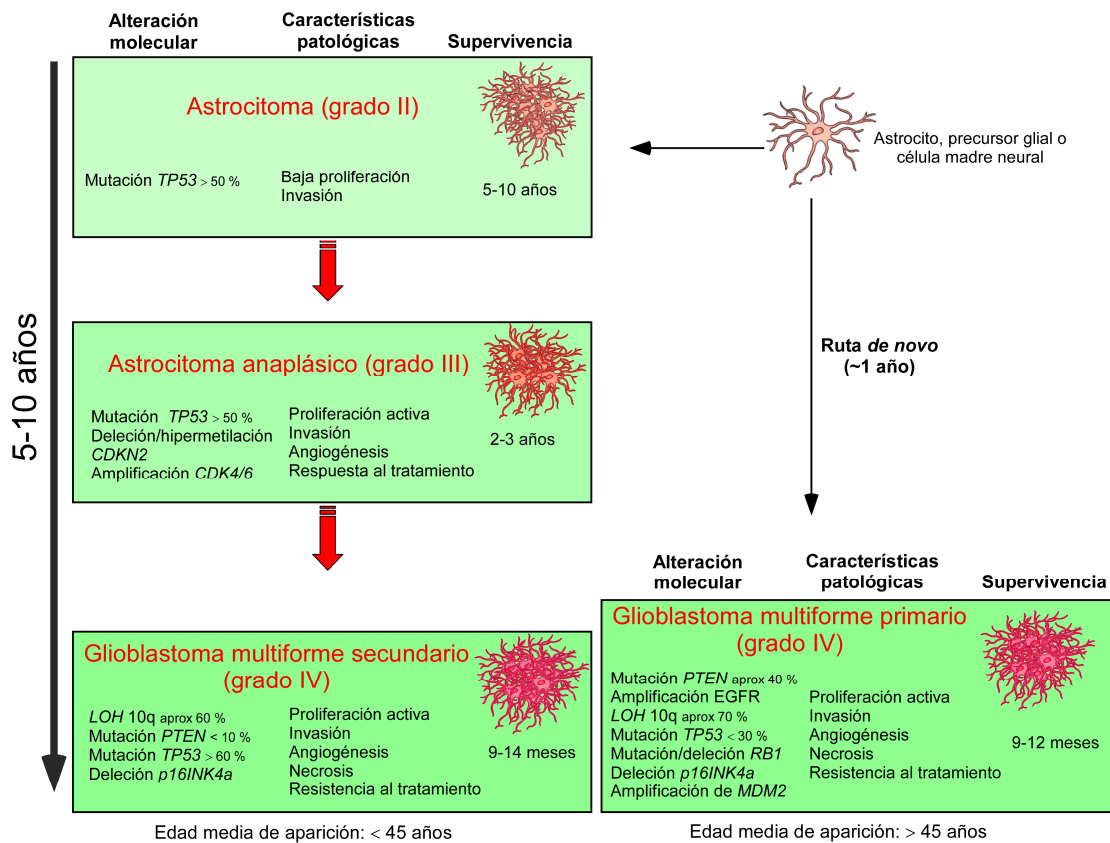
#### **1.1.2.1. Alteraciones en el control de la transición G1-S del ciclo celular.**

##### **I. Vía p16/CDKs/Rb.**

La proliferación celular está estrechamente regulada en puntos específicos del ciclo celular que controlan la síntesis de DNA (fases G1 y S) y la progresión de la mitosis (fases G2 y M). En nuestro trabajo presenta especial interés la regulación en el punto de transición entre las fases G1 y S. En el esquema 2 se representan, de forma resumida, las principales moléculas implicadas en dicha regulación. Así, se observa que las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), en concreto la CDK4/6 y la CDK2, fosforilan a la proteína retinoblastoma (Rb), que forma un complejo con el factor de transcripción E2F. Esta fosforilación promueve la separación del complejo, quedando



así libre el factor de transcripción E2F, el cual activa genes que promueven la síntesis de DNA (para revisión, véase: (Franco-Hernandez *et al.*, 2007; Ohgaki and Kleihues, 2007). Las ciclinas y las CDKs están bajo el control de inhibidores. Existen dos grupos principales de inhibidores de las CDKs y está descrito que muchos de ellos están alterados en los glioblastomas (Shapiro, 2002; Ueki *et al.*, 1996), tanto primarios como secundarios. Estos dos grupos de inhibidores están constituidos por la familia CIP/KIP, en la que se incluyen proteínas como p21 y p27, y la familia INK, en la que se incluyen proteínas como p16 y p19. Las principales alteraciones descritas en los gliomas en relación a esta vía, afectan a la expresión del Rb, de p16 y de la CDK4.

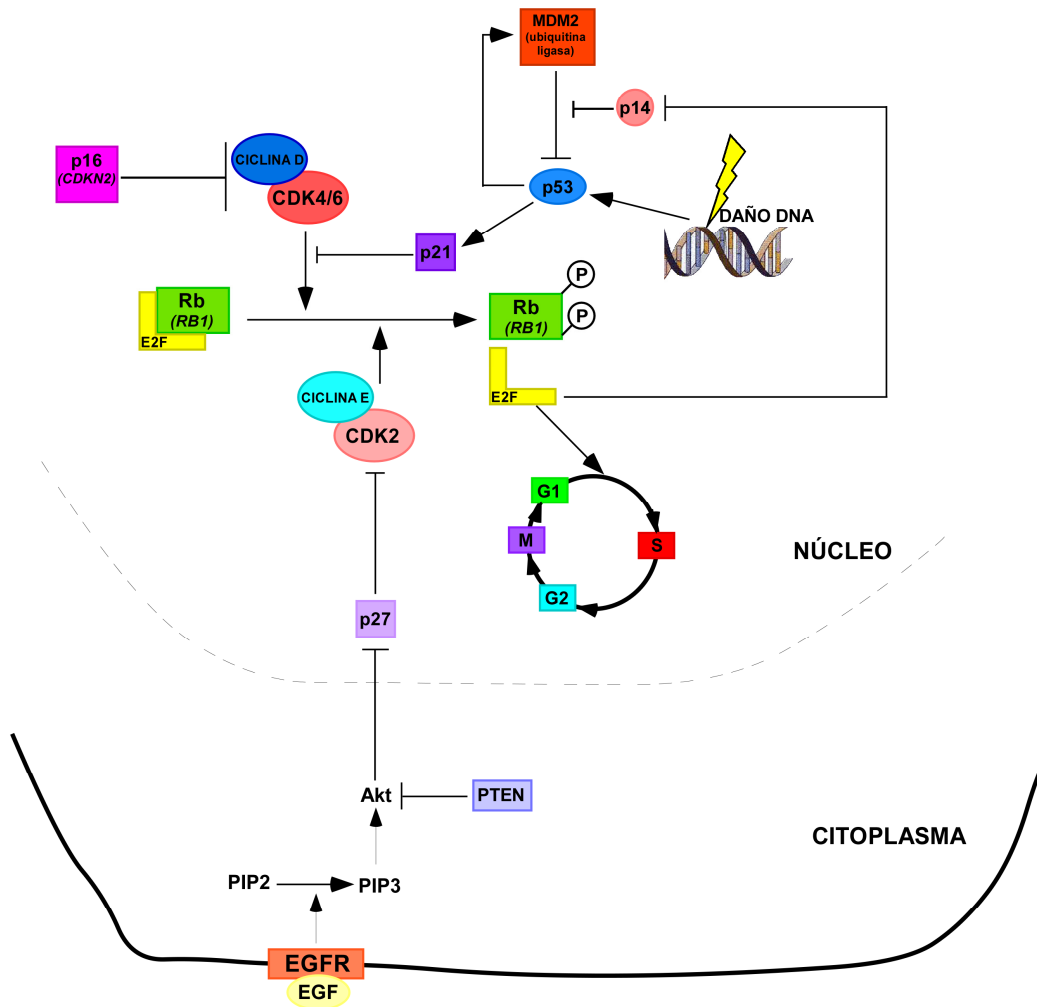


**Esquema 1. Alteraciones y modo de evolución de los glioblastomas primarios y secundarios.**

Aunque histológicamente son indistinguibles, los glioblastomas primarios y secundarios evolucionan de forma diferente, presentando diversas alteraciones genéticas y moleculares y apareciendo en diferentes grupos de edad. Modificado de Furnari y col. (2007). *TP53*: gen que codifica la proteína p53. *CDKN2*: gen que codifica la proteína p16. *CDK4/6*: kinasa dependiente de ciclinas 4/6. *LOH*: pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10. *PTEN*: gen que codifica el homólogo de tensina y fosfatasa. *EGFR*: receptor del factor de crecimiento epidérmico. *MDM2*: murine double minute 2. Modificado de Furnari *et al.*, 2007.

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad del Rb está controlada, entre otros, por CDK4 y p16. Esto implica que las alteraciones en los genes de estas proteínas dan lugar a la alteración de la funcionalidad del Rb, con la consiguiente desregulación del ciclo celular. Se ha descrito que las alteraciones en la funcionalidad de la proteína p16 vienen dadas, principalmente, por dos tipos de alteraciones en el gen que la codifica, *CDKN2*. Una de estas alteraciones es la delección de *CDKN2* (Schmidt *et al.*, 1994; Ueki *et al.*, 1996), que tiene lugar en GBMs y en AA, pero muy rara vez en astrocitomas de bajo grado, lo que sugiere que se trata de una alteración tardía en la progresión tumoral. La otra alteración es la hipermetilación del promotor de *CDKN2*, que impide la transcripción del gen (Costello *et al.*, 1996). Por otro lado, la alteración principal del gen de la CDK4 es su amplificación. Reifenberger y col. observaron en un estudio con muestras de 234 pacientes que esta alteración se producía en un 15 % de los gliomas de alto grado (Reifenberger *et al.*, 1994). Por otro lado, Schmidt y col. observaron que la amplificación del gen de la CDK4 se producía en más del 50 % de los glioblastomas que no poseían alteraciones en el gen *CDKN2*, lo que sugiere que las alteraciones en la regulación del ciclo celular a este nivel son fundamentales para el desarrollo de estos tumores (Schmidt *et al.*, 1994).

La alteración genética más frecuente del gen del Rb (*RB1*) consiste en la hipermetilación del promotor. Se ha comprobado que ésta es más frecuente en el GBM secundario que en el primario (Nakamura *et al.*, 2001c) (para revisión, véase: (Franco-Hernandez *et al.*, 2007). Por otro lado, Nakamura y col. observaron que en los AA y en los astrocitomas de bajo grado no aparece esta alteración, indicando, por lo tanto, que la alteración del Rb es un proceso tardío en la progresión de los astrocitomas (Nakamura *et al.*, 2001c). Además, las alteraciones en los genes de las proteínas p16 y Rb parecen ser mutuamente excluyentes (Ueki *et al.*, 1996).



**Esquema 2. Regulación de la transición G1-S del ciclo celular.**

MDM2: mouse double minute 2. CDK: kinasa dependiente de ciclinas. Rb: retinoblastoma. PTEN: homólogo de tensina y fosfatasa. PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. PIP3: fosfatidilinositol-3-fosfato. EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico. EGF: factor de crecimiento epidérmico.

## II. Vía p53/MDM2/p14.

La vía p53/MDM2/p14 es una vía implicada en la respuesta al estrés celular que va a provocar la activación de genes relacionados con el control del ciclo celular, la reparación del DNA y la apoptosis (para revisión, véase: (Franco-Hernandez *et al.*, 2007). La proteína p53, que es considerada una proteína supresora de tumores, actúa como factor de transcripción de gran variedad de genes. En el esquema 2 se puede

observar que, como respuesta al daño del DNA, p53 se activa e induce, entre otros, la transcripción del inhibidor de CDKs, p21 (Sherr and Roberts, 1999), ya mencionado en el apartado anterior. La proteína p53 también regula la transcripción del gen *MDM2*, cuyo producto actúa, a su vez, como una ubiquitina-ligasa de p53, impidiendo, por lo tanto, su función y estableciéndose así un ciclo regulador de retro-alimentación. Además, la proteína p14 es capaz de unirse a la proteína MDM2 impidiendo que ésta se una a p53, es decir impidiendo la degradación de p53. Teniendo en cuenta todo esto, la pérdida de la función normal de p53 puede producirse por la alteración del gen que la codifica, *TP53*, o bien de *MDM2* o de p14.

Las mutaciones en *TP53*, principalmente transiciones G:C→A:T, son más abundantes en los GBMs secundarios que en los GBMs primarios y han sido descritas también en astrocitomas de bajo grado y en AA (Ohgaki *et al.*, 2004) lo que sugiere que dicha mutación es un evento temprano en el desarrollo de los astrocitomas. Por otro lado, se ha observado que alrededor del 10 % de los GBMs primarios presentan amplificación de *MDM2*, cuando *TP53* no se encuentra alterado (Reifenberger *et al.*, 1993), lo cual representaría un mecanismo alternativo para escapar al control de p53. En cuanto a p14, Zolota y col. observaron diferencias significativas en la expresión de esta proteína entre los gliomas de bajo grado, con elevados niveles de expresión, y los gliomas de alto grado, con bajos niveles de expresión (Zolota *et al.*, 2008). Además, parece que la inactivación de p14 se produce por delección en homocigosis en los GBMs primarios y por hipermetilación del promotor en los GBMs secundarios (Nakamura *et al.*, 2001a).

#### **1.1.2.2. Otras alteraciones moleculares.**

Además de las alteraciones descritas en los apartados anteriores, existen otras muchas alteraciones moleculares, ampliamente descritas en la bibliografía, asociadas a los gliomas. A continuación se detallan algunas de ellas.

Una de las alteraciones más importantes es la pérdida del brazo largo del cromosoma 10 (LOH 10q, *Loss Of Heterozygosity*), que presenta una frecuencia similar en los GBMs primarios y en los GBMs secundarios (Ohgaki *et al.*, 2004). Además, la adquisición de esta alteración está asociada con la transición de los glioblastomas de bajo grado y los AA hasta GBMs (Fujisawa *et al.*, 1999).

En el cromosoma 10 están identificados varios genes supresores de tumores, entre los que cabe destacar PTEN (homólogo de tensina y fosfatasa) y MGMT (O<sup>6</sup>-metilguanina-DNAmetiltransferasa), los cuales intervienen en el control del ciclo celular y en la reparación del DNA. La inactivación de estos genes ha de producirse en homocigosis para que el gen pierda completamente su funcionalidad (Franco-Hernandez *et al.*, 2007).

PTEN es una proteína fosfatasa capaz de retirar el fosfato del fosfatidil inositol 3 fosfato (PIP3), deteniéndose así la señal de crecimiento celular (véase esquema 2). Se ha comprobado que las alteraciones en PTEN, fundamentalmente mutaciones o deleciones, son más frecuentes en GBMs primarios que en GBMs secundarios (Ohgaki *et al.*, 2004; Tohma *et al.*, 1998). Por otro lado, una de las principales características de los gliomas es la recurrencia que presentan debido a su alta capacidad para invadir el parénquima cerebral sano. Se ha descrito que las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) son capaces de degradar las proteínas de la matriz extracelular, creando espacios para la invasión (para revisión, véase (Demuth and Berens, 2004). En este sentido, se ha observado que la sobreexpresión de PTEN en células de glioma, además de cambiar la morfología celular, inhibe la proliferación y la invasión debido a que inactiva a las MMPs, gracias a su actividad fosfatasa (Koul *et al.*, 2001).

La MGMT es una enzima implicada en la reparación de los daños que se producen en el DNA debido a procesos de alquilación del oxígeno en posición 6 de la guanina del DNA. La metilación del promotor de la MGMT ha sido descrita de forma más frecuente en los GBMs secundarios que en los GBMs primarios y parece estar asociada a la transición G:C→A:T que se produce en *TP53* (véase apartado anterior) (Nakamura *et al.*, 2001b). Se ha observado que la metilación del promotor de la MGMT podría ser una característica importante desde el punto de vista terapéutico, puesto que parece que esta metilación proporcionaría una mayor sensibilidad al tratamiento con temozolomida (Esteller *et al.*, 2000; Hegi *et al.*, 2005), que se describirá en apartados posteriores.

Finalmente, entre los factores de crecimiento implicados en el proceso de evolución de los gliomas cabe destacar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), cuya alteración provoca la activación constitutiva del receptor en

ausencia de ligando. En una célula sana, cuando el ligando correspondiente se une a EGFR a través de su dominio extracelular, la PI3-kinasa es reclutada hasta la membrana donde produce la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato hasta fosfatidilinositol-trifosfato (PIP3). El PIP3 actuará como activador de diferentes moléculas, como la Akt, que, finalmente, aumentarán la proliferación celular e inhibirán moléculas que detienen la señal de proliferación, tales como el p27 (véase esquema 2).

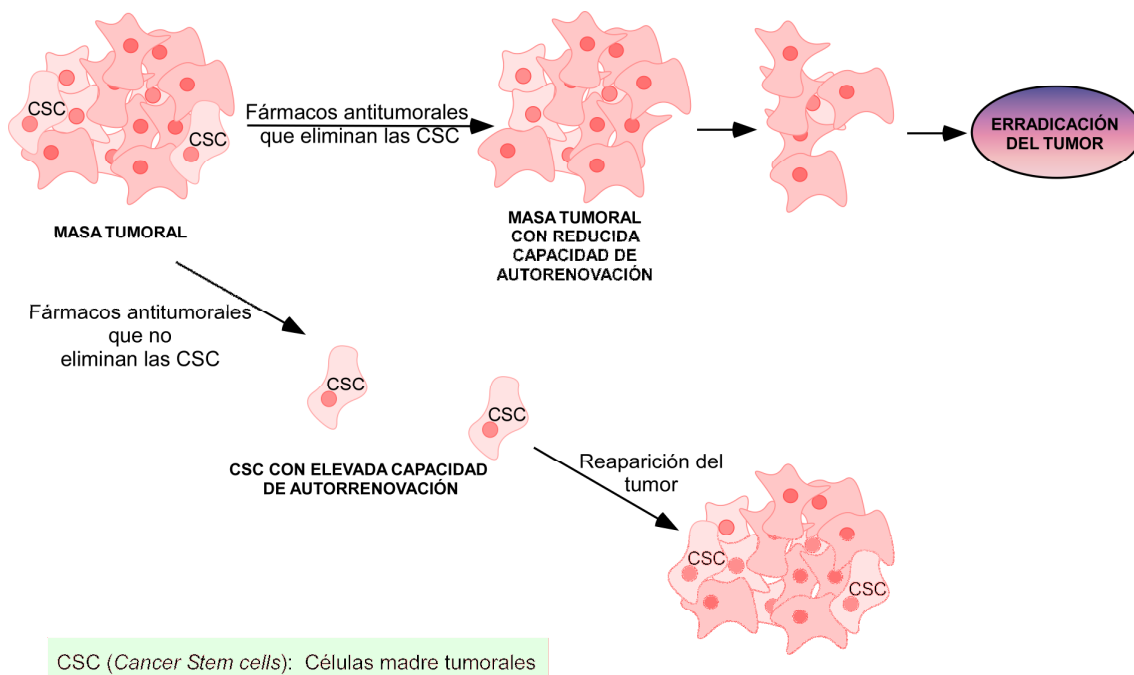
La amplificación del EGFR es muy poco frecuente en los astrocitomas de bajo grado y en los AA. Por otro lado, se ha observado que es más frecuente en los GBMs primarios que en los GBMs secundarios (Ohgaki *et al.*, 2004; Schlegel *et al.*, 1994) estableciéndose una cinética de proliferación celular más rápida en los GBMs que poseen el gen de EGFR amplificado (Schlegel *et al.*, 1994).

Otra de las alteraciones moleculares asociadas a los gliomas es la pérdida de la proteína que constituye las *gap junctions*, la conexina 43. Debido a la importancia que tiene en nuestro trabajo, el apartado 1.2.3. se dedica en exclusiva a la implicación de esta proteína en la proliferación de los gliomas.

### **1.1.3. Células madre en gliomas.**

Una nueva forma de entender la biología de los gliomas y de otros muchos tumores, propone como elemento clave las células madre tumorales. Lapidot y col. aislaron por primera vez en 1994 una subpoblación de células madre en la leucemia mieloide aguda (Lapidot *et al.*, 1994). Desde entonces, las células madre también han sido identificadas en tumores sólidos, incluidos los tumores cerebrales (Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2003). Las células madre tumorales (CSC, *Cancer Stem Cells*) poseen muchas de las características presentes en las células madre que se encuentran de forma normal en los tejidos, como por ejemplo las células madre neurales presentes en el sistema nervioso. Así, las CSC se presentan como células pluripotentes, pudiendo diferenciarse en los dos grandes linajes del sistema nervioso, el neuronal y el glial, y poseen una importante capacidad para autorrenovarse. Esta última característica es esencial puesto que, según plantea el modelo de las CSC, la capacidad de autorrenovación que poseen estas células es la principal responsable del fracaso de los tratamientos quimioterapéuticos que eliminan gran parte de la masa

tumoral, pero no consiguen eliminar las CSC (véase esquema 3). Además, se ha observado en estas células la existencia de genes de resistencia a múltiples fármacos que codifican proteínas transportadoras que bombean los fármacos al medio extracelular impidiendo así su efecto. Entre estos transportadores se encuentra el ABCG2 (*ATP-binding cassette half-transporter*), que es capaz de expulsar de la célula el colorante fluorescente Hoechst 33342. Esta característica permite la separación, mediante citometría de flujo, de las células que no incorporan dicho colorante, conocidas como *side-population*, del resto de la población tumoral que sí lo incorpora (Scharenberg *et al.*, 2002). Patrawala y col. comprobaron que la *side-population* es rica en células madre y que las células que constituyen esta población poseen mayor capacidad para producir tumores que el resto de la población tumoral (Patrawala *et al.*, 2005). Se ha descrito que las células madre constituyen un porcentaje celular muy pequeño con respecto a la población celular total, pero debido a la capacidad de autorrenovación, anteriormente descrita, resultan especialmente agresivas. Con respecto a esto, Patrawala y col. purificaron la *side-population* a partir de la línea de glioma humano U373, resultando ser ésta en torno al 0,1 % de la población total (Patrawala *et al.*, 2005). Por otro lado, Kondo y col. determinaron que, en la línea celular de glioma de rata C6, el porcentaje de células presente en la *side-population* era del 0,4 % con respecto a la población total (Kondo *et al.*, 2004). En ambos estudios se observó que la inyección de células de la *side-population* en ratones inmunodeprimidos era capaz de producir tumores de forma mucho más agresiva que las células que no formaban parte de la *side-population*, sugiriendo que, a pesar de su bajo porcentaje, las células madre resultan claves en el mantenimiento de los tumores. Por otro lado, aunque el método de la *side-population* está ampliamente extendido como método para la purificación de células madre, Zheng y col. demostraron, mediante ensayos de proliferación y de la capacidad formadora de clones, que la mayoría de las células de la línea celular de glioma de rata C6, son células madre (Zheng *et al.*, 2007b).



### Esquema 3. Las células madre tumorales como diana terapéutica.

Algunos tratamientos antitumorales eliminan gran parte de la masa tumoral pero no las CSC, y el tumor reaparece. Cuando los fármacos eliminan las CSC, la masa tumoral pierde su capacidad de autorrenovarse, lo que conduce a la erradicación del tumor. Modificado de Reya *et al.*, 2001.



## 1.2. Comunicación intercelular y proliferación celular. Implicación de las conexinas en los gliomas.

En los organismos multicelulares la actividad celular coordinada es crítica para mantener la homeostasis de los distintos órganos. En este sentido, la comunicación intercelular es fundamental para controlar procesos como la proliferación y la diferenciación de las células (Loewenstein and Kanno, 1966). En el SNC, los astrocitos se encuentran comunicados a través de las denominadas uniones comunicantes o *gap junctions*, formando una especie de red sincitial que mantiene la homeostasis. Las *gap junctions* son, por tanto, especializaciones de la membrana que contienen canales de comunicación intercelular (Bennett, 1977), que median el movimiento de iones y moléculas pequeñas entre las células.

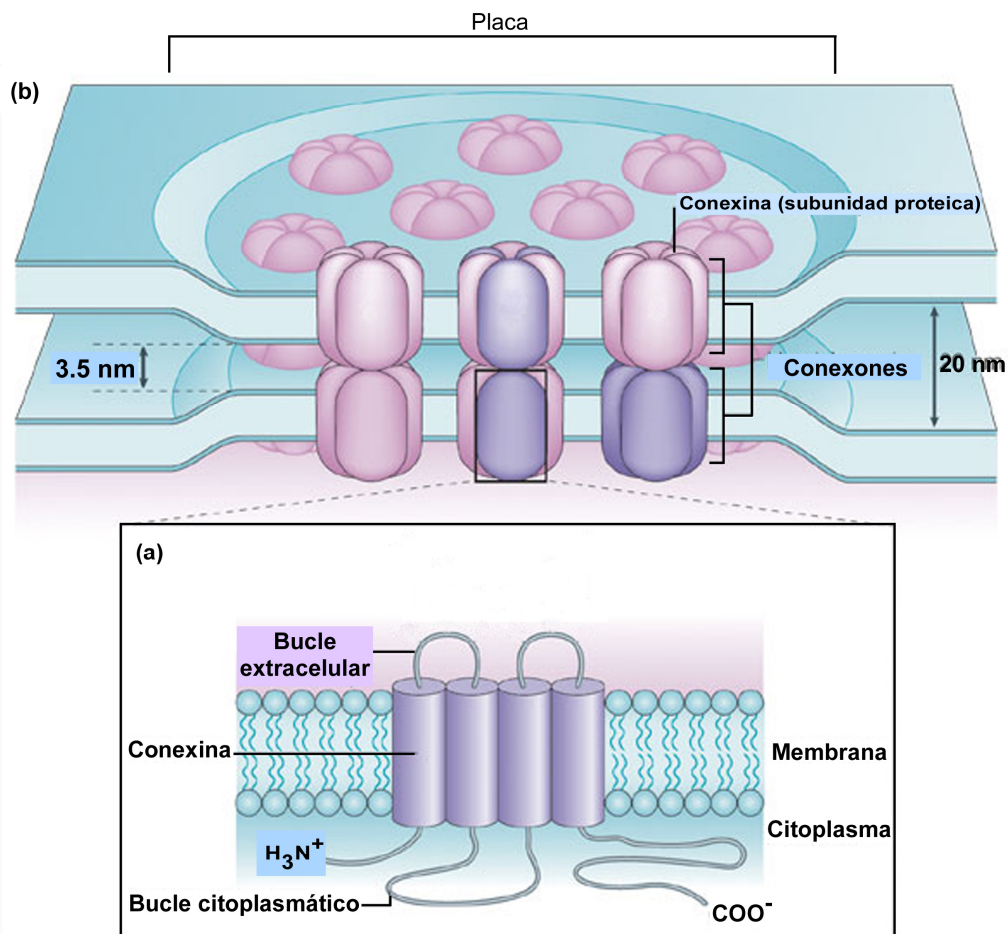
Se ha comprobado que las *gap junctions* pueden intervenir en la modulación del ciclo celular y, por lo tanto, en la proliferación celular. De hecho, tanto el cierre de las *gap junctions* como la fosforilación de las conexinas, las proteínas que las constituyen, tienen lugar en estadios concretos del ciclo celular. Así, durante la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial, se produce una marcada disminución de la expresión de la conexina 32 y de la densidad de las *gap junctions* en la fase S del ciclo celular (Kren *et al.*, 1993). Por otro lado, la fosforilación de la conexina 43 en su extremo carboxilo terminal se ha relacionado con la disminución de la permeabilidad de las *gap junctions*. En este sentido, se ha observado que durante la mitosis se produce una disminución de la comunicación intercelular, debido a la fosforilación de la conexina 43 por la kinasa p34<sup>Cdc2</sup> (Kanemitsu *et al.*, 1998; Lampe *et al.*, 1998).

### 1.2.1. Estructura de las *gap junctions*. La conexina 43.

Las *gap junctions* son estructuras de comunicación intercelular, presentes en casi todos los animales. La mayoría de las células en todos los tejidos se comunican a través de estas estructuras. Las conexinas son proteínas que constituyen el componente fundamental de las *gap junctions* en los mamíferos. Existen varios tipos de conexinas, habiéndose observado que, en los astrocitos, la mayoritaria es la conexina 43 (Dermietzel *et al.*, 1991; Giaume *et al.*, 1991a). Estructuralmente, se ha demostrado que las conexinas presentan cuatro dominios hidrofóbicos transmembrana, dos dominios extracelulares y tres dominios intracelulares que

incluyen los extremos amino y carboxilo terminal (Kumar and Gilula, 1996) (véase Esquema 4a). El dominio carboxilo terminal es bastante variable, posee sitios de fosforilación y es responsable de la regulación de las conexinas (Delmar *et al.*, 2004), mientras que el extremo amino terminal está más conservado y es el responsable del ensamblaje y formación de los canales de comunicación (Kardami *et al.*, 2007).

La unidad estructural de las *gap junctions* se denomina conexón. Cada conexón es una estructura hexamérica, constituida por 6 conexinas ensambladas de tal modo que forman un canal con características hidrofílicas, que atraviesa la bicapa lipídica y sobresale de la membrana plasmática. Cuando los conexones de dos células adyacentes se asocian, constituyen el canal de las *gap junctions*, de tal forma que ambos citoplasmas quedan conectados y las membranas plasmáticas separadas por un espacio (*gap*, en inglés; véase esquema 4b) (Kumar and Gilula, 1996) de unos 3,5 nm. Los canales forman agrupaciones en la membrana plasmática, denominadas placas. Las *gap junctions* constituyen, por lo tanto, canales de comunicación intercelular que permiten la transferencia de iones y pequeñas moléculas hidrofílicas con una masa molecular no superior a 1,5 KDa, como, por ejemplo, el cAMP, el inositol-trifosfato o la glucosa (Sáez *et al.*, 1989; Taberner *et al.*, 1996) (para revisión, véase: (Giaume *et al.*, 1997; Loewenstein, 1987).



**Esquema 4. Estructura de las gap junctions.**

Modificado de Söhl *et al.*, 2005



### 1.2.2. Regulación de la permeabilidad de las *gap junctions*.

La permeabilidad de las *gap junctions* puede ser regulada a corto y a largo plazo. La regulación a largo plazo tiene que ver con el control a nivel transcripcional o bien, con las modificaciones post-transcripcionales, de las cuales la más importante es la fosforilación (Lampe and Lau, 2000). Este tipo de regulación está relacionada con los cambios en el número de canales que componen las *gap junctions*, así como con los cambios en la velocidad de internalización de las conexas y su degradación. Se ha observado que la conexina 43 se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso, se

transporta al aparato de Golgi y, por último, es trasladada a la membrana plasmática donde constituye las *gap junctions* (Lampe and Lau, 2000). Una de las características más inusuales de las conexinas, respecto a otras proteínas de membrana, es su corta vida media. Mientras que otras proteínas de membrana poseen vidas medias que superan las 24 horas, Laird y col. observaron, en un estudio con cardiomiocitos, que la vida media de la conexina 43 oscilaba entre 1 y 2 horas (Laird *et al.*, 1991).

Por otro lado, la regulación a corto plazo ocurre en cuestión de minutos y está relacionada con el paso rápido del estado abierto al cerrado y viceversa. La permeabilidad de las *gap junctions* puede ser controlada por distintas sustancias, tanto endógenas como exógenas. En el grupo de los reguladores endógenos se encuentran diferentes agentes, como la endotelina-1 (ET-1) (Giaume *et al.*, 1992), el ácido oleico (Lavado *et al.*, 1997), la noradrenalina (Giaume *et al.*, 1991b) o el ácido retinoico (Bex *et al.*, 1995; Pitts *et al.*, 1986). Además, diversas señales intracelulares son capaces de regular la permeabilidad de las *gap junctions*, tales como el cAMP (De Mello, 1984), el ácido araquidónico (Martinez and Saez, 1999), los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Granda *et al.*, 1998), el óxido nítrico (Bolaños and Medina, 1996) o el ATP intracelular (Vera *et al.*, 1996).

En el grupo de los reguladores exógenos se engloban sustancias como anestésicos volátiles (etomidato, propofol, halotano, enflurano) (Mantz *et al.*, 1993), el ácido 18- $\alpha$ -glicirretínico (AGA) y la carbenoxolona (CBX) (Davidson *et al.*, 1986; Guan *et al.*, 1996), además de sulfonilureas como la tolbutamida (Granda *et al.*, 1998; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001) y la glibenclamida (Granda *et al.*, 1998; Hasselblatt *et al.*, 2003; Velasco *et al.*, 2000). La tabla 1, muestra un resumen de los diferentes reguladores de las *gap junctions*. A continuación se detallan algunos aspectos relevantes referentes a tres reguladores de las *gap junctions* que han sido empleados en este trabajo: la tolbutamida, el cAMP y la carbenoxolona.

	 <b>AUMENTAN LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR</b>	 <b>INHIBEN LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR</b>
ENDÓGENOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>•cAMP (De Mello, 1984)</li> <li>•ATP intracelular (Vera y col., 1996)</li> <li>•Ácido retinoico (Bex y col. 1995)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Endotelina-1 (Giaume y col., 1992)</li> <li>•Ácido oleico (Lavado y col., 1997)</li> <li>•Noradrenalina (Giaume y col., 1991)</li> <li>•Ácido araquidónico (Martínez y Sáez, 1999)</li> <li>•Ca<sup>2+</sup> intracelular (Granda y col., 1998)</li> <li>•Óxido nítrico (Bolaños y Medina, 1996)</li> </ul>
EXÓGENOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Tolbutamida (Granda y col., 1998)</li> <li>•Glibenclamida (Granda y col., 1998)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ácido 18-<math>\alpha</math>-glicirretínico y carbenoxolona (Davidson y col., 1986)</li> <li>•Anestésicos volátiles (Mantz y col., 1993)</li> <li>•Ácido retinoico (Pitts y col., 1986)</li> </ul>

**Tabla 1. Regulación de la permeabilidad de las *gap junctions*.**

### 1.2.2.1. Tolbutamida.

La tolbutamida es una sulfonilurea que, tradicionalmente, ha sido usada para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Brown *et al.*, 1956; Seino and Miki, 2003). En trabajos previos de nuestro laboratorio se puso de manifiesto que la tolbutamida aumenta la permeabilidad de las *gap junctions*. Así, Granda y col. observaron que la tolbutamida revertía parcialmente el efecto inhibitor del Ca<sup>2+</sup> sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en los astrocitos. Según estos autores, este efecto estaba relacionado con el mecanismo de acción de la tolbutamida como inhibidora de los canales de potasio sensibles al ATP (K-ATP) (Granda *et al.*, 1998). Por su parte, Velasco y col. observaron que la tolbutamida también disminuía, en los astrocitos, el efecto inhibitor sobre las *gap junctions* de otros agentes tales como el ácido oleico, el ácido araquidónico, la endotelina-1, el AGA y el octanol, sugiriendo que la inhibición de los canales K-ATP, promovida por las sulfonilureas, previene el cierre de las *gap junctions* en los astrocitos, independientemente del mecanismo de acción del agente inhibitor (Velasco *et al.*, 2000). Además, el efecto de la tolbutamida sobre la permeabilidad de las *gap junctions* parece ser independiente del Ca<sup>2+</sup> y estar relacionado con la despolarización de la membrana (Velasco *et al.*, 2000).

Sánchez-Álvarez y col. observaron que la tolbutamida promovía en las células de glioma de rata C6, cuya comunicación intercelular es muy baja, un aumento de la permeabilidad de las *gap junctions* y de la expresión de la conexina 43 (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001).

El hecho de que un inhibidor de los canales K-ATP, como es la tolbutamida, aumente la permeabilidad de las *gap junctions*, junto con el hecho de que activadores de dicho canal, como el diazóxido o el pinacidilo, inhiban dicha permeabilidad (Velasco *et al.*, 2000), sugiere que la apertura y cierre del canal de K-ATP puede controlar la permeabilidad de las *gap junctions*, probablemente al modificar el potencial de membrana. En apartados posteriores se ampliarán las características de estos canales.

#### **1.2.2.2. cAMP.**

El aumento de la concentración intracelular de cAMP puede afectar a procesos celulares muy diferentes. El cAMP se genera por la unión de ligandos extracelulares a los receptores acoplados a proteína G en la membrana plasmática, lo que provoca la activación de la adenilato ciclasa. La mayoría de los efectos del cAMP en las células eucariotas están mediados por la proteína kinasa A (PKA) (Taylor *et al.*, 1990). La PKA es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C). En ausencia de cAMP el complejo R<sub>2</sub>C<sub>2</sub> es catalíticamente inactivo. La unión del cAMP a la subunidad reguladora libera las subunidades catalíticas, las cuales presentan actividad enzimática intrínseca. La PKA activada puede, entonces, fosforilar residuos específicos de serina y de treonina de las proteínas diana y modificar su actividad (para revisión, ver: (Dell'Acqua and Scott, 1997).

Numerosos trabajos avalan el efecto del cAMP sobre la comunicación intercelular a través de las *gap junctions*. Así, se ha demostrado que el aumento de los niveles intracelulares de cAMP puede incrementar la comunicación en diferentes tipos de células (Burt and Spray, 1988; De Mello, 1984), aunque en algunos casos puede tener efectos inhibidores (Cole and Gardfield, 1986; Hampson *et al.*, 1992) mientras que en otros no produce ninguna modificación (Kwak and Jongsma, 1996; Martínez *et al.*, 2002). Una explicación plausible a esta variedad en el efecto del cAMP podría ser

que existen diferencias en los mecanismos de señalización entre los distintos tipos de células. Además, la expresión de las diferentes conexinas puede responder de forma variable al incremento de los niveles de cAMP.

Los estudios realizados en la línea celular de glioma de rata C6 y en otras células tumorales, que se caracterizan por presentar bajos niveles de comunicación (Naus *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1991), demuestran que el tratamiento con análogos del cAMP es capaz de producir un aumento de la comunicación intercelular (Atkinson *et al.*, 1995; Azarnia *et al.*, 1981 Burghardt, 1995, 243; Ghosh and Singh, 1997; Paulson *et al.*, 2000; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). También se ha observado que el tratamiento con agentes que aumentan los niveles intracelulares de cAMP, como la forskolina, aumenta la comunicación a través de las *gap junctions* (Mehta *et al.*, 1996). Se han propuesto diferentes teorías para explicar el efecto del cAMP, como el aumento del tráfico de las conexinas desde el compartimento intracelular hasta la membrana plasmática (Ghosh and Singh, 1997; Paulson *et al.*, 2000), la estimulación de la expresión génica de la conexina 43 (Mehta *et al.*, 1992) y la fosforilación de la conexina 43 (Nnamani *et al.*, 1994). De hecho, se sabe que la conexina posee sitios susceptibles de fosforilación por kinasas dependientes de cAMP, concretamente los residuos de serina 364 y 365, localizados en el extremo C-terminal citoplasmático de la proteína (Shah *et al.*, 2002).

### 1.2.2.3. Carbenoxolona.

La carbenoxolona (CBX) es un derivado hidrosoluble del ácido 18- $\alpha$ -glicirretínico (AGA). Algunos autores proponen que los derivados del ácido glicirretínico, tales como la CBX, inhiben las *gap junctions* al unirse directamente a las conexinas e inducir, de este modo, el cierre del canal (Davidson and Baumgarten, 1988). Existen indicios que avalan la teoría de que estos compuestos se intercalan en la membrana plasmática y se unen a los conexones de las uniones comunicantes, induciendo un cambio conformacional que resulta en el cierre del canal (Davidson and Baumgarten, 1988; Goldberg *et al.*, 1996) sin afectar a la síntesis de proteínas ni a su localización (Goldberg *et al.*, 1996). Por su parte, Sagar y col. observaron que la CBX inhibe las *gap junctions* mediante un mecanismo dependiente de la proteína kinasa A (Sagar and Larson, 2006).

### 1.2.3. Implicación de la conexina 43 en la proliferación de los gliomas.

En el apartado 1.1.2. se describieron una gran variedad de alteraciones moleculares presentes en los gliomas, entre ellas, la de la conexina 43. En este sentido, se ha demostrado que en un gran número de tumores, incluidos los gliomas, los niveles de expresión de la conexina 43, así como el grado de comunicación intercelular, son muy bajos (Holden *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1999; Laird *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2001; Soroceanu *et al.*, 2001), lo cual constituye una alteración molecular de interés para nuestro trabajo. Además, se ha observado que el grado de malignidad de los gliomas está inversamente relacionado con el nivel de expresión de la conexina 43, siendo éste muy bajo en los astrocitomas anaplásicos (grado III) e indetectable en los glioblastomas multiformes (grado IV) (Huang *et al.*, 1999; Soroceanu *et al.*, 2001). Por tanto, se sugiere que la pérdida de la comunicación intercelular es uno de los procesos implicados en la formación de tumores cerebrales malignos (Soroceanu *et al.*, 2001).

La conexina 43 se considera una proteína supresora de tumores porque en las células tumorales la inducción de la expresión de este gen trae como consecuencia una disminución de la velocidad de proliferación y la desaparición del fenotipo neoplásico (Hirschi *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 1991; Mesnil *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1991) (para revisión, ver: (Kardami *et al.*, 2007; Naus, 2002; Yamasaki, 1990; Yamasaki *et al.*, 1999)). De hecho, cuando las células de glioma de rata C6 se cocultivan con células de esta misma línea transfectadas con el cDNA de la conexina 43, se inhibe la proliferación de la línea celular C6 (Zhu *et al.*, 1992). Los mecanismos que explican la acción de la conexina 43 como proteína supresora de tumores son variados, según los diversos autores. Así, algunos autores han observado que el efecto antiproliferativo de la conexina 43 está relacionado con su capacidad para aumentar la comunicación intercelular a través de las *gap junctions* (Loewenstein, 1992; Mehta *et al.*, 1986; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001), mientras que otros consideran que dicho efecto es independiente de la comunicación (Dang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 1998; Moorby and Patel, 2001; Zhang *et al.*, 2003a) y está relacionado con la fosforilación de la conexina 43 y con su capacidad para interactuar con otras proteínas. En este sentido, Moorby y col. postulan que la conexina 43 posee un efecto antiproliferativo relacionado con el extremo carboxilo terminal de la proteína, caracterizado por la abundancia de residuos fosforilables (Moorby and Patel, 2001).

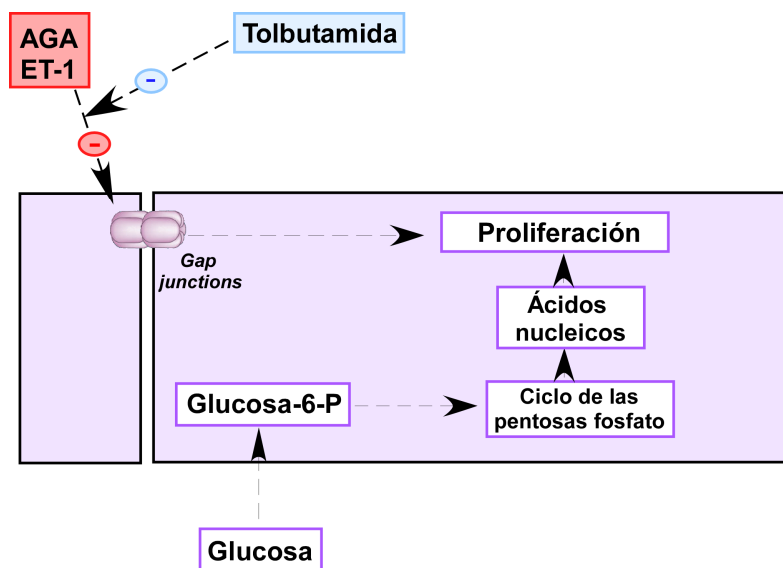


Además, el extremo carboxilo terminal posee varios dominios específicos de interacción con otras proteínas, entre las que cabe destacar la *zonula occludens-1* (ZO-1) (Toyofuku *et al.*, 1998) y la proteína tirosina kinasa c-Src (Giepmans *et al.*, 2001), ambas implicadas en la regulación de la proliferación celular. Otra de las proteínas que interacciona con la conexina 43, es CCN3 (NOV, *Nephroblastoma overexpressed*), una proteína de la familia CCN, con efecto antiproliferativo. Así, se ha observado que la conexina 43 aumenta los niveles de expresión de CCN3, la cual, además, es capaz de unirse al extremo carboxilo terminal de la conexina 43 (Fu *et al.*, 2004; Gellhaus *et al.*, 2004).

La conexina 43 también puede ejercer su función supresora de tumores modificando la expresión de genes relacionados con la proliferación y el fenotipo tumoral. En este sentido, se ha observado que la conexina 43 promueve el aumento del inhibidor de CDKs, p27, de forma dependiente de las *gap junctions* (Zhang *et al.*, 2001), y de forma independiente, a través de la inhibición de la expresión de la proteína Skp2, una ubiquitina de p27 (Zhang *et al.*, 2003a). Koffler y col. observaron que al transfectar líneas celulares de pulmón y de hígado con el cDNA de la conexina 43 aumentaba la expresión de p27 y disminuía la de ciclina D1 (Koffler *et al.*, 2000). Por otra parte, la transfección de células tumorales con la conexina 43 inhibe la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y de su receptor, importantes factores angiogénicos (Qin *et al.*, 2002).

Otro factor que explica la relación existente entre la comunicación intercelular y/o la conexina 43 con la proliferación, es el hecho de que determinadas moléculas que promueven el aumento de la expresión de la conexina 43 y de la comunicación, disminuyen la proliferación celular. En este sentido, los resultados previos de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que la tolbutamida y el db-cAMP aumentan la expresión de la conexina 43 y la comunicación intercelular en la línea de glioma de rata C6, lo cual viene acompañado de una disminución en la proliferación de estas células tumorales (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001), así como de una disminución en la actividad de la hexokinasa (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2005). Además, en nuestro laboratorio también se ha puesto de manifiesto que el cierre de las *gap junctions* en los astrocitos, promovido por inhibidores de la comunicación como la endotelina-1 (ET-1) o el ácido 18- $\alpha$ -glicirretínico (AGA), promueve el aumento de la captación de glucosa y de la síntesis de ribosa-5- fosfato, destinada a la proliferación celular, y que la

tolbutamida, al promover la apertura de las *gap junctions*, previene estos fenómenos (Tabernero *et al.*, 2001) (véase esquema 5). De hecho, la tolbutamida previene en los astrocitos el aumento del receptor de glucosa, GLUT-1, y de la enzima que cataliza la fosforilación de la glucosa, la hexokinasa tipo I, que promueven la ET-1 y la CBX (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2004).



**Esquema 5. Efecto de la tolbutamida sobre la proliferación en astrocitos.**

AGA: ácido 18-a-glicirretínico. ET-1: endotelina-1. Modificado de Tabernero *et al.*, 2001.

Por otro lado, Shao y col. observaron, en células mamarias, que el silenciamiento de la conexina 43 estaba acompañado del desarrollo de un fenotipo tumoral altamente agresivo, caracterizado por una mayor capacidad de proliferación y migración, así como por el aumento en la expresión de moléculas angiogénicas (Shao *et al.*, 2005).

#### 1.2.4. Implicación de la conexina 43 en la migración e invasión de los gliomas.

Una característica fundamental que presentan los gliomas, responsable en gran parte del fallo de los tratamientos que se aplican actualmente, es la recurrencia. Las células que constituyen la masa tumoral en los gliomas tienen gran capacidad para migrar e invadir el parénquima cerebral sano, dando lugar a tumores con bordes difusos, difíciles de resear quirúrgicamente. Los componentes que participan en los procesos de migración e invasión en los gliomas son variados. Así, se ha observado la participación de proteínas de la matriz extracelular como la vitronectina (Gladson and Cheresch, 1991; Gladson *et al.*, 1995), de moléculas de superficie como las integrinas (para revisión véase: (D'Abaco and Kaye, 2007), de las células de la microglía (Bettinger *et al.*, 2002) o de los canales iónicos (Sontheimer, 2004).

Se ha descrito la participación de la conexina 43 en los procesos de migración e invasión en los gliomas. Según Oliveira y col. la invasión del parénquima ocurre de una forma no destructiva, estableciéndose relaciones de cooperación entre las células sanas y las células tumorales, de forma similar a la migración de las células precursoras neurales a través de la glia radial durante el desarrollo embrionario (Oliveira *et al.*, 2005). Según estos autores, la cooperación entre los astrocitos y las células de glioma se establece a través de las *gap junctions*, puesto que la carbenoxolona inhibe los procesos de migración (Oliveira *et al.*, 2005). En la línea celular de glioma de rata C6, se ha observado que la sobreexpresión de la conexina 43 está relacionada con el incremento de su capacidad de adhesión y, por lo tanto, de migración (Lin *et al.*, 2002). Además, el intercambio a través de las *gap junctions* de metabolitos, como la glucosa o el ATP, con los astrocitos, proporcionaría una mayor energía para la dispersión de las células de glioma (Lin *et al.*, 2002). Por otro lado, también ha sido descrita la relación inversa entre la capacidad para establecer *gap junctions* y la capacidad de migración. De esta forma, se ha observado que la capacidad de una célula de glioma para migrar más allá de la masa tumoral es directamente proporcional a su capacidad para romper la comunicación intercelular con las células tumorales vecinas (McDonough *et al.*, 1999).



### 1.3. Canales de potasio sensibles a ATP (K-ATP).

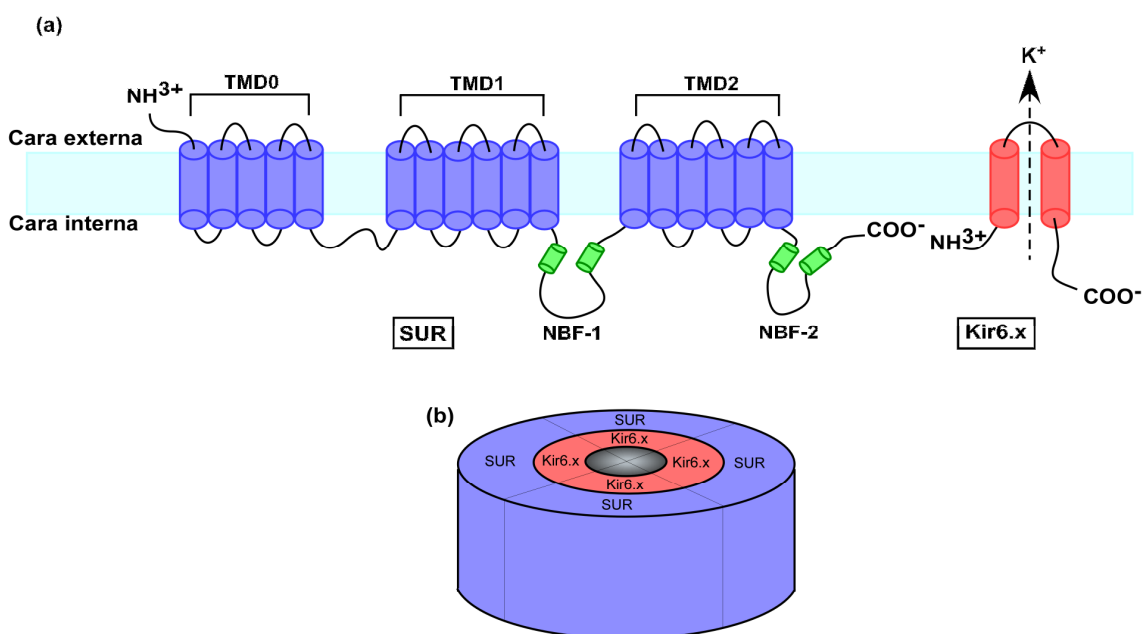
Los canales de potasio sensibles al ATP (K-ATP), que pertenecen a la familia de los canales rectificadores de potasio, acoplan el estado metabólico de la célula con el potencial de membrana. De hecho, estos canales son responsables de la regulación del potencial de membrana negativo que presentan las células. Los canales K-ATP fueron descubiertos por primera vez en el corazón (Noma, 1983), aunque posteriormente se ha comprobado que están ampliamente distribuidos por muchos tejidos (Ashcroft and Ashcroft, 1990), incluyendo el páncreas, los músculos liso y esquelético y el cerebro (Amoroso *et al.*, 1990). Se cree que estos canales juegan un papel importante en la respuesta celular a situaciones de estrés como pueden ser la hiperglucemia, la hipoglucemia, la isquemia o la hipoxia (Seino and Miki, 2003; Yokoshiki *et al.*, 1998). Estos canales juegan también un papel muy importante en las células  $\beta$  del páncreas, en las cuales el aumento del ATP intracelular promueve el cierre de los canales, con la consiguiente despolarización de la membrana. Esto da lugar a la apertura de canales de calcio voltaje dependientes que, a su vez, promueven la exocitosis de la insulina (Seino and Miki, 2003).

#### 1.3.1. Estructura molecular de los canales de potasio sensibles al ATP.

Los canales K-ATP son complejos hetero-octaméricos formados por dos tipos de subunidades: las subunidades Kir6.x, que constituyen el poro del canal, es decir, el canal propiamente dicho y las subunidades SUR, que constituyen el elemento regulador y que son receptores de las sulfonilureas, un grupo de fármacos tradicionalmente utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Brown *et al.*, 1956; Seino and Miki, 2003). En los mamíferos, se han descrito dos tipos de subunidades Kir6.x (Kir6.1 y Kir6.2) y otros dos tipos de subunidades SUR (SUR1 y SUR2) (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999), éstas últimas pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) (Higgins, 1992). Además SUR2 presenta dos variantes, SUR2A y SUR2B, procedentes del *splicing* alternativo, las cuales difieren únicamente en 42 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Se ha comprobado que el extremo carboxilo terminal de SUR2B es similar al de SUR1. Tanto las subunidades Kir6.x como las SUR son proteínas transmembrana (véase esquema 6a). En concreto, Kir6.1 (Inagaki *et al.*, 1995b) y Kir6.2 (Inagaki *et al.*, 1995a) poseen dos dominios transmembrana, quedando los extremos amino y carboxilo en el lado citosólico. Por su

parte, SUR1 y SUR2 poseen tres dominios transmembrana, denominados TMD0, TMD1 y TMD2, cada uno de ellos formado, a su vez, por varias regiones transmembrana (TMs) (Conti *et al.*, 2001). Éstas últimas poseen, además, dos bucles de unión de nucleótidos, denominados NBF-1 y NBF-2, en el lado citosólico, en el que también se encuentra el extremo carboxilo terminal. El extremo amino terminal, por su parte, se encuentra en la cara externa de la membrana.

El hetero-octámero que constituye los canales K-ATP está formado por la unión de cuatro subunidades SUR y de cuatro subunidades Kir6.x (véase esquema 6b). En cada tejido, la unión específica de Kir6.1 ó Kir6.2 con SUR1 ó SUR2, da lugar a canales K-ATP específicos de tejido, que poseen diferentes propiedades electrofisiológicas así como diferente sensibilidad farmacológica a las múltiples moléculas que pueden actuar sobre este canal (Seino and Miki, 2003). No obstante, Kir6.2 es el que está presente en la mayoría de los tejidos, asociándose con SUR1 en páncreas y cerebro, con SUR2A en el corazón y el músculo esquelético y con SUR2B en el cerebro y el músculo liso (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Inagaki *et al.*, 1996; Isomoto *et al.*, 1996). En el músculo liso vascular se ha detectado la presencia de Kir6.1 y SUR2B (Proks *et al.*, 2002).



**Esquema 6. Estructura molecular del canal de potasio sensible al ATP.**

Modificado de Seino *et al.*, 2003. TMD: dominio transmembrana. NBF: bucle de unión a nucleótidos.

### 1.3.2. Regulación de los canales de potasio sensibles al ATP.

Existen dos grupos principales de moléculas reguladoras de los canales K-ATP: los activadores o abridores del canal y los inhibidores. Cada uno de estos grupos incluye moléculas con diferentes estructuras y mecanismos de acción. Dentro de los activadores se incluyen, entre otros, algunos nucleótidos, el diazóxido, el pinacidilo, el minoxidilo o el cromakalim. Por otro lado, dentro de los inhibidores existen dos grupos: los que interactúan con Kir6.2 y los que interactúan con SUR. Dentro del primer grupo se encuentran, entre otros, los antimaláricos como la quinina y la mefloquina (Gribble *et al.*, 2000), mientras que, las sulfonilureas como la tolbutamida o la glibenclamida y los derivados de tipo benzamido, como la meglitinida, cierran el canal K-ATP uniéndose a SUR (Gribble *et al.*, 1997b; Proks *et al.*, 2002).

#### 1.3.2.1. Nucleótidos.

Como su propio nombre indica, los canales de potasio sensibles al ATP se ven afectados por la presencia de esta molécula. En concreto, el ATP es un inhibidor de estos canales. Previamente se ha mencionado que la subunidad SUR posee dos bucles de unión a nucleótidos, NBF-1 y NBF-2. Sin embargo, se ha demostrado que el elemento del canal responsable de la sensibilidad de éste al ATP es Kir6.2. De hecho, Tucker y col. demostraron que, en ausencia de SUR1, el truncado de Kir6.2, resultado de la eliminación de los aminoácidos 26-36 de la región carboxilo terminal, daba lugar a corrientes de K<sup>+</sup> que eran inhibidas por ATP (Tucker *et al.*, 1997). No obstante, estos mismos autores observaron que la sensibilidad del canal al ATP era aún mayor en presencia de SUR1 (Tucker *et al.*, 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que el Mg-ADP estimula el canal K-ATP debido a la interacción con la subunidad SUR (Gribble *et al.*, 1997a; Shyng *et al.*, 1997). Según Ueda y col. cuando la relación ATP/ADP disminuye, el ATP se une al bucle NBF-1 y el Mg-ADP se une al bucle NBF-2. De esta forma, el estado conformacional en el que se encuentra SUR1 hace que su interacción con Kir6.2 reduzca la afinidad de esta proteína por el ATP, abriéndose, por lo tanto, el canal (Ueda *et al.*, 1999). Por otro lado, cuando la relación ATP/ADP aumenta, el Mg-ADP se disocia de su unión a NBF-2, liberándose el ATP de su unión a NBF-1 y promoviéndose el cierre de los canales (Ueda *et al.*, 1999). Según Zingman y col. la

subunidad SUR es una ATPasa que une e hidroliza el Mg-ATP. La energía que se desprende de la hidrólisis del ATP hace que SUR cambie de estado conformacional, pasando de la forma inactiva, en la que el poro del canal está cerrado, a la forma activa, en la que el canal está abierto (Zingman *et al.*, 2001).

### 1.3.2.2. Sulfonilureas.

Las sulfonilureas, como la tolbutamida y la glibenclamida entre otras, son agentes inhibidores del canal K-ATP. De hecho, uno de los componentes de este canal es el receptor de sulfonilureas, SUR. No obstante, se ha observado que las sulfonilureas presentan dos vías de inhibición del canal K-ATP: a través de Kir6.2, la cual es una inhibición de baja afinidad, y a través de SUR1, la cual es una inhibición de alta afinidad (para revisión, véase: (Proks *et al.*, 2002)). Se ha observado que la inhibición a través de Kir6.2 se lleva a cabo de forma independiente de SUR1 (Gribble *et al.*, 1997b). Sin embargo, aunque el bloqueo de alta afinidad es debido a SUR1, dicho bloqueo es sólo posible cuando SUR1 es coexpresado con Kir6.2 (Gribble *et al.*, 1997b). De hecho, al truncar la región N-terminal de Kir6.2 no se afecta la inhibición de la tolbutamida a través de Kir6.2 pero sí se afecta la inhibición de alta afinidad a través de SUR1 (Reimann *et al.*, 1999). Por otro lado, aunque la subunidad Kir6.2 es la más abundante en casi todos los tejidos, incluido el cerebro, (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Inagaki *et al.*, 1996; Isomoto *et al.*, 1996), en algunos casos se ha descrito que las sulfonilureas bloquean las corrientes de K<sup>+</sup> en canales K-ATP constituidos por la subunidad Kir6.1, por ejemplo en células gliales de Müller (Skatchkov *et al.*, 2002).

Ashfield y col. observaron que los residuos 1035-1277 de SUR1 son esenciales para el bloqueo de alta afinidad del canal K-ATP por parte de la tolbutamida y están relacionados con la diferente sensibilidad que presentan las sulfonilureas por SUR1 y SUR2A (Ashfield *et al.*, 1999). Además, estos mismos autores observaron que la Ser 1237, situada en el dominio transmembrana TMD2 de SUR1, es esencial para la unión de las sulfonilureas (Ashfield *et al.*, 1999).

La diferente respuesta de las sulfonilureas en su unión a SUR1 y SUR2A también ha sido objeto de estudio. Gribble y col. observaron que, la tolbutamida y la glibenclamida eran más efectivas en las células  $\beta$  del páncreas, que poseen canales Kir6.2/SUR1, que en las células cardiacas, con canales Kir6.2/SUR2A (Gribble *et al.*,



1998). Además, se ha observado que, mientras la tolbutamida únicamente bloquea con alta afinidad los canales constituidos por SUR1, la glibenclamida es capaz de inhibir tanto los constituidos por SUR1 como los constituidos por SUR2 (Gribble *et al.*, 1998). Esto es debido a que la subunidad SUR1 posee motivos de dos tipos, de tipo sulfonilurea y de tipo benzamido, mientras que SUR2 únicamente posee motivos benzamido, que están presentes en la glibenclamida pero no en la tolbutamida (para revisión véase: (Proks *et al.*, 2002).

### **1.3.2.3. Diazóxido y pinacidilo.**

Los abridores del canal K-ATP (KCOs, *potassium channel openers*) constituyen un grupo variado de moléculas entre las que se encuentran el diazóxido y el pinacidilo. La apertura de los canales K-ATP promueve la hiperpolarización de la membrana plasmática y la reducción de la actividad eléctrica (Seino and Miki, 2003). Se ha observado que, dependiendo del tipo de subunidad SUR que constituya el canal, existe diferente sensibilidad a los KCOs. Así, se ha comprobado que los 42 aminoácidos altamente conservados del extremo carboxilo terminal de SUR1 y SUR2B, son importantes para la activación por parte del diazóxido (Isomoto *et al.*, 1996), mientras que el pinacidilo es capaz de activar los canales constituidos tanto por la subunidad SUR2A como por SUR2B (Inagaki *et al.*, 1996; Isomoto *et al.*, 1996).

### **1.3.3. Implicación de los canales de potasio sensibles al ATP en la proliferación.**

Los canales rectificadores de potasio (Kir) son responsables del mantenimiento del potencial de membrana altamente negativo que presentan las células gliales (Ransom and Sontheimer, 1995). Se ha demostrado que durante el desarrollo de las células gliales, se producen profundos cambios en la expresión de los canales Kir, de forma que, a medida que se avanza en el proceso de diferenciación hacia los astrocitos aumenta la expresión de estos canales (Macfarlane and Sontheimer, 1997). Por el contrario, Bordey y col. observaron en astrocitomas de bajo grado, que éstos carecían de corrientes rectificadoras de potasio (Bordey and Sontheimer, 1998). En esta misma línea, Olsen y col. estudiaron las corrientes de potasio en varias líneas de glioma de grados III y IV, verificando la ausencia de las mismas (Olsen and Sontheimer, 2004). Mediante estudios de detección de proteínas pudieron comprobar que determinadas subunidades de tipo Kir estaban presentes en las células de glioma,

aunque con una localización diferente a la de las células sanas, puesto que los canales parecían estar localizados en el núcleo y no insertados en la membrana plasmática (Olsen and Sontheimer, 2004).

Diversos autores han descrito el efecto antiproliferativo de los inhibidores del canal K-ATP en diferentes tipos de tumores, como el de mama (Abdul *et al.*, 2003; Woodfork *et al.*, 1995), el de vejiga (Wondergem *et al.*, 1998) o el de hígado (Malhi *et al.*, 2000). En este sentido, se ha observado que la glibenclamida promueve la acumulación de las células en la fase G0/G1 y la reducción de las fases S y G2/M (Wondergem *et al.*, 1998; Woodfork *et al.*, 1995), inhibiéndose, así, la síntesis de DNA (Malhi *et al.*, 2000). Además, también se ha descrito que los abridores del canal K-ATP, como el minoxidilo (Abdul *et al.*, 2003) o el diazóxido (Wondergem *et al.*, 1998), estimulan la proliferación.

#### **1.4. Abordaje terapéutico de los gliomas.**

A diferencia de lo que ocurre con otros tipos de tumores, los gliomas se caracterizan por no desarrollar metástasis a larga distancia. El hecho de estar físicamente delimitados por la cavidad craneal hace difícil la diseminación del tumor. Sin embargo y, como ya se ha mencionado previamente, la capacidad de infiltración que presentan los hace muy poco susceptibles de una resección quirúrgica completa. A pesar de ello, la cirugía, en muchos casos seguida de sesiones de radioterapia, sigue siendo hoy en día la primera elección en el abordaje terapéutico de los gliomas.

Con respecto a los tratamientos quimioterapéuticos empleados en los gliomas, uno de los más extendidos es la temozolomida. Por otro lado, son muchas las investigaciones que se están llevando a cabo con el fin de desarrollar nuevos fármacos y estrategias farmacológicas que permitan un tratamiento más eficaz para esta devastadora enfermedad. Como se ha presentado en los apartados anteriores, son muchas las alteraciones moleculares que presentan los gliomas, algunas de ellas incluso específicas de un determinado grado de la enfermedad. Por esta razón, y con el objetivo de alcanzar tratamientos más selectivos y eficaces, muchos de los nuevos fármacos y estrategias farmacológicas tienen como diana estas moléculas alteradas en los gliomas. Además, la introducción de la terapia génica en los ensayos clínicos para el tratamiento de los gliomas, aporta una nueva estrategia a la hora de alcanzar, de forma específica, las células tumorales sin afectar a las células sanas. En los apartados posteriores se expone una síntesis de algunas de las estrategias farmacológicas empleadas y estudiadas, hoy en día, en la terapia de los gliomas, haciendo especial hincapié, debido al interés que tiene para nuestro trabajo, en una de ellas: la terapia génica suicida.

##### **1.4.1. Quimioterapia: temozolomida.**

La quimioterapia en los gliomas se usa generalmente como un tratamiento adyuvante a la cirugía y a la radioterapia, aplicándose con posterioridad a estos tratamientos o, en algunos casos, de forma concomitante con la radioterapia. Uno de los obstáculos a superar por los fármacos usados en el tratamiento de los tumores cerebrales, es la barrera hemato-encefálica (BHH), que separa la sangre del tejido cerebral. Por esta razón, en muchos casos se emplean sistemas que reparten

directamente el fármaco en la zona del tumor o, incluso, en algunos casos, se emplean sustancias que permeabilizan la BHH (Castro *et al.*, 2003).

Uno de los fármacos orales más usados en el tratamiento de los gliomas de nuevo diagnóstico es la temozolomida (Simpson and Galanis, 2006). No obstante, su efectividad en el caso de gliomas recurrentes no parece ser muy alta (Simpson and Galanis, 2006). La temozolomida es una agente metilante que atraviesa muy bien la BHH y que tiene una baja toxicidad. Su mecanismo de acción consiste en la metilación del oxígeno en posición 6 de la guanina del DNA. Por otro lado, como se explicó en el apartado 1.1.2.2., la O<sup>6</sup>-metilguanina-DNAmetiltransferasa (MGMT) es una enzima capaz de reparar los daños que se producen en el DNA debido a procesos de metilación. En este sentido, se ha observado que la inactivación de la MGMT promovida por la metilación de su promotor, implica una mayor efectividad del tratamiento con temozolomida (Esteller *et al.*, 2000; Hegi *et al.*, 2005).

#### **1.4.2. Terapias moleculares.**

Las alteraciones moleculares presentes en los gliomas proporcionan a las células tumorales una mayor capacidad de proliferación, de formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y de invasión. Las moléculas y estrategias terapéuticas que tienen como diana las alteraciones moleculares encontradas en los gliomas son muy variadas. Por esta razón, únicamente se explicarán algunos ejemplos representativos para cada una de estas dianas: proliferación, angiogénesis e invasión.

El gefitinib y el erlotinib, son moléculas capaces de inhibir la proliferación, al inhibir el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), sobreexpresado en muchos gliomas (Ohgaki *et al.*, 2004; Schlegel *et al.*, 1994). Existen diversos ensayos clínicos para comprobar la eficacia de estas moléculas (Rich *et al.*, 2004) (para revisión, véase: (Simpson and Galanis, 2006).

Los gliomas se encuentran entre los tumores sólidos más altamente vascularizados, lo que implica una angiogénesis activa. El factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF) es una de las moléculas mejor conocidas por su implicación en la angiogénesis, razón por la cual se han desarrollado inhibidores de esta molécula. De entre todos ellos destaca el bevacizumab que, en monoterapia, no

parece demasiado eficaz, pero que sí lo es en combinación con otras terapias, como el irinotecán, un inhibidor de la topoisomerasa I (Vredenburgh *et al.*, 2007). Se ha demostrado que las células madre tumorales presentes en los gliomas, de forma similar a las células madre neurales, se localizan en nichos vasculares que proporcionan a estas células un aporte continuo de nutrientes (Gilbertson and Rich, 2007), por lo que la inhibición de la angiogénesis, de forma conjunta con fármacos citotóxicos, podría ser útil en la eliminación de las células madre tumorales (Folkens *et al.*, 2007) y, por tanto, en la erradicación completa del tumor (véase esquema 3).

Otra característica de los gliomas es su elevada capacidad de invasión, habiéndose observado que las integrinas, entre otras moléculas, están implicadas en este proceso (para revisión véase: (D'Abaco and Kaye, 2007). La cilengitida es un pentapéptido cíclico que inhibe a las integrinas, actuando, por lo tanto, como un inhibidor del proceso de invasión. En un ensayo en fase I desarrollado en pacientes con gliomas recurrentes, Nabors y col. demostraron que el fármaco era bien tolerado (Nabors *et al.*, 2007). Actualmente se están desarrollando ensayos en fase II, que proporcionarán el rango de dosificación adecuado. En los últimos años, destacan los estudios realizados respecto al uso de los cannabinoides en el tratamiento de los gliomas.

Destacan los descubrimientos realizados en los últimos años respecto al valor terapéutico de los cannabinoides en los gliomas, puesto que se ha demostrado que actúan atacando varias de las alteraciones presentes en los estos tumores. Así, se ha observado que inhiben la proliferación (Sanchez *et al.*, 2001), la angiogénesis (Blazquez *et al.*, 2004) y la invasión (Blazquez *et al.*, 2008), además de promover la diferenciación de las células madre tumorales presentes en los gliomas (Aguado *et al.*, 2007).

#### **1.4.3. Terapia génica.**

Como ya se ha indicado, debido a las características intrínsecas de los gliomas, su tratamiento resulta complicado y, en realidad, no se ha conseguido todavía ninguna terapia que resulte verdaderamente efectiva. Por otro lado, teniendo en cuenta que la terapia ideal sería la que consiguiera alta efectividad con baja toxicidad,

en la actualidad muchos investigadores están centrando su atención en el estudio de la terapia génica para el tratamiento de los tumores, incluidos los gliomas.

La terapia génica se puede definir como la introducción de material genético en las células de un organismo con fines terapéuticos. Una de las principales ventajas de la terapia génica aplicada a los tumores, con respecto a la quimioterapia convencional, es que resulta más selectiva y, por lo tanto, menos tóxica. Los elementos fundamentales de la terapia génica son dos: el vector utilizado para introducir el gen de interés en las células diana y el propio gen, razón por la cual las investigaciones actuales se centran en estos dos elementos. Las estrategias propiamente dichas de terapia génica son múltiples y, entre ellas, se pueden citar:

- La introducción de genes inmunomoduladores.

Está descrito que los tumores, incluidos los gliomas, secretan el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), lo que les permite escapar al sistema inmune. En este sentido, se ha desarrollado un oligodesoxinucleótido antisentido contra TGF- $\beta$ , denominado AP 12009, que se ha mostrado eficaz en pacientes con glioma (Schlingensiepen *et al.*, 2006).

- La introducción de genes inhibidores de la angiogénesis.

Además de las moléculas inhibitoras de la angiogénesis, se han utilizado genes antisentido contra el VEGF (Saleh *et al.*, 1996).

- La introducción de RNAs de interferencia que bloquean determinados oncogenes o moléculas sobreexpresadas en los tumores.

Como ejemplo, en este sentido se puede citar la inhibición de la telomerasa. La telomerasa es una ribonucleoproteína con actividad enzimática, que evita el acortamiento progresivo de los telómeros y que está asociada a la inmortalidad de la célula. Así, mientras que en los tejidos sanos del cerebro no se detecta actividad de la telomerasa, ésta se detecta frecuentemente en los gliomas existiendo, en general, una asociación entre el grado de malignidad del tumor y su actividad telomerasa (Komata *et al.*, 2002). Teniendo esto en cuenta, se ha observado que la inhibición de la actividad telomerasa mediante oligonucleótidos antisentido, afecta a la viabilidad y crecimiento de las células

de glioma (Kondo *et al.*, 1998; Mukai *et al.*, 2000), sin afectar a las células sanas (Mukai *et al.*, 2000).

- La terapia génica suicida, ...etc.

Debido al interés que tiene en nuestro trabajo, así como al amplio número de estudios realizados al respecto, en apartados posteriores se ampliarán las características de la terapia génica suicida.

#### **1.4.3.1. Tipos de vectores.**

Uno de los primeros problemas a superar en la puesta a punto de las diferentes estrategias de terapia génica es encontrar el sistema adecuado que permita llevar a cabo el proceso de transfección. Esto implica que el vector empleado sea capaz de conseguir un elevado grado de transfección en la población tumoral, con unos efectos secundarios mínimos. Con este objetivo se han desarrollado diferentes tipos de vectores.

#### **I. Vectores virales.**

La utilidad de los virus como vectores para el reparto de genes se basa en su capacidad natural para introducir y mediar la expresión de genes en las células infectadas. No obstante, es importante que la utilización de los mismos sea segura, con el fin de que no produzcan infección en el organismo hospedador, para lo cual deben ser eliminados los genes implicados en la replicación viral y en la activación de la respuesta inmune. Existen diferentes tipos de vectores virales, entre los cuales los más utilizados son los retrovirus, los adenovirus, los virus adenoasociados y el virus del herpes simple.

- Los retrovirus poseen un genoma diploide de tipo RNA. El retrovirus entra en la célula hospedadora a través de una proteína de superficie que se une a un receptor celular y, una vez dentro, su RNA es transcrito por una retrotranscriptasa hasta DNA de doble cadena, el cual es integrado posteriormente en el DNA de la célula huésped. Los retrovirus utilizados en terapia génica han sido modificados, eliminándose en ellos los genes *gag*, *pol* y

*env*, implicados en la replicación del virus, reduciéndose así, además, la respuesta inmunitaria en el hospedador (para revisión véase: (Castro *et al.*, 2003; Kanzawa *et al.*, 2003). Desafortunadamente, la integración desarrollada por los vectores retrovirales es aleatoria, lo cual implica la posibilidad de que se produzcan mutaciones insercionales, que alteren la expresión normal de un gen o activen oncogenes. Además, la utilidad de estos vectores está restringida a las células en división, lo cual supone una limitación en el tratamiento de los gliomas puesto que, generalmente, los niveles de división celular en las zonas más internas de la masa tumoral son bastante reducidos. La eficacia de la transfección ha sido mejorada con el desarrollo de vectores lentivirales, que son capaces de transfectar tanto las células en división como las quiescentes (Naldini *et al.*, 1996). En un estudio *in vivo*, en el que se utilizaron lentivirus para transfectar células de glioma con el siRNA de la telomerasa, Zhao y col. demostraron la eficacia de estos vectores (Zhao *et al.*, 2007).

- Los adenovirus poseen una doble cadena de DNA. Entran en la célula hospedadora por endocitosis y, una vez dentro, se translocan al núcleo, donde comienza la expresión de los genes virales. Dos de las diferencias fundamentales con respecto a los retrovirus son su capacidad de infectar, no sólo células en división, sino también células quiescentes y que la expresión de los genes ocurre sin la integración en el genoma del hospedador. Un aspecto importante es la duración de la expresión del transgen. Los resultados obtenidos por diferentes autores son variables, obteniéndose desde una expresión transitoria (Yang *et al.*, 1994) hasta una expresión persistente del transgen, con una duración media de 6-12 meses (Dewey *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000). Una expresión transitoria del transgen implicaría un tratamiento repetitivo con el vector adenoviral que, a su vez, daría lugar a otro de los inconvenientes principales de este tipo de vectores: la elevada inmunogenicidad que presentan (Yang *et al.*, 1994). Con el objetivo de superar los inconvenientes de los vectores adenovirales se han desarrollado los denominados virus “dependientes de ayudante”, esto es, virus de alta capacidad, que pueden incluir hasta 35 Kb, pero que, al no poseer todos los genes virales esenciales, necesitan de un “virus ayudante”. Gracias al desarrollo de estos virus se ha conseguido una expresión estable del transgen



en diferentes tejidos, incluyendo el nervioso, con una baja inmunogenicidad (Thomas *et al.*, 2000; Zou *et al.*, 2000).

- Los virus adenoasociados (AAVs) pertenecen a la familia de los *parvovirus* y contienen una cadena de DNA de hebra sencilla. Una de sus principales ventajas es que se trata de virus no patógenos para el hombre y que poseen un mecanismo de replicación no autónomo, que depende de otros virus, tales como los adenovirus o el virus del herpes simple. Los AAVs son capaces de infectar las células independientemente del momento del ciclo celular en el que se encuentren, presentan una baja inmunogenicidad y se integran de forma estable en el genoma de la célula hospedadora dando lugar a una expresión duradera del gen de interés (Park *et al.*, 2008a). El inconveniente principal de los AAVs es que presentan una capacidad limitada como vectores, de aproximadamente 5 Kb. El uso de AAVs en la terapia génica contra el cáncer se encuentra todavía en ensayos preclínicos. Mizuno y col. observaron una regresión de los gliomas humanos trasplantados en el cerebro de ratones “nude” gracias al uso de AAVs recombinantes (Mizuno *et al.*, 1998).
- El virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) es un patógeno que posee un largo DNA de doble cadena de, aproximadamente, 150 Kb. Es capaz de infectar tanto células en división como quiescentes. La mayor parte del genoma del HSV-1 es redundante, lo cual permite delecionar grandes fragmentos que pueden ser sustituidos por fragmentos de DNA de hasta 50 Kb, sin afectar al crecimiento viral (Wang *et al.*, 2000).

## II. Vectores no virales.

Los vectores no virales presentan la ventaja, sobre los virales, de poseer menor inmunogenicidad y menor citotoxicidad aunque, por otro lado, tienen la desventaja de presentar una menor eficiencia en la transfección, razón por la cual en la mayoría de ensayos clínicos se utilizan vectores virales. Dentro de los vectores no virales se incluyen, entre otros, el DNA plasmídico desnudo, los liposomas y las células madre neurales.

La transfección de las células con DNA plasmídico desnudo se ha estudiado en diferentes tejidos, entre ellos el cerebral. Así, la inyección directa de DNA plasmídico en el cerebro de ratones dio lugar a la transfección de las células nerviosas, aunque con el inconveniente de una expresión muy poco duradera del transgen (Schwartz *et al.*, 1996). Utilizando una técnica diferente para administrar el plásmido, la inyección intraarterial dirigida, Barnett y col. consiguieron transfectar tumores cerebrales con un gen antiangiogénico, obteniendo una reducción del 80 % en el volumen del tumor (Barnett *et al.*, 2004).

Otro modo de administrar el DNA plasmídico es acomplejarlo con lípidos catiónicos para formar liposomas. Muchos genes terapéuticos, incluido el de la timidina kinasa del virus del herpes simple tipo 1 (HSVtk-1, HSVtk) (Véase apartado 1.5.), han sido transfectados con éxito en diferentes tumores, incluidos los gliomas, mediante la utilización de liposomas catiónicos (Yoshida *et al.*, 2001).

En los últimos años se ha demostrado que las células madre neurales (*NSC*, *Neural Stem Cells*) presentan un tropismo específico hacia tumores del SNC, lo que ha planteado su posible utilización como vectores en la terapia de dichos tumores (para revisión, véase: (Dwain *et al.*, 2006). Así, se ha observado en modelos de meduloblastoma, que la inyección en el fluido cerebroespinal de *NSC* modificadas con vectores retrovirales portadores del gen de la citosina desaminasa (véase apartado 1.5.2.), daba lugar a la migración de las *NSC* hacia la masa tumoral, donde desarrollaban el efecto antitumoral (Shimato *et al.*, 2007). También se han realizado estudios en gliomas, observándose que las *NSC* son atraídas por las células de glioma, de forma que migran tanto hacia el núcleo del tumor (Jeon *et al.*, 2008) como hacia las células que han migrado mas allá de la masa tumoral (Kim *et al.*, 2005).

### 1.5. Terapia génica suicida.

La terapia génica suicida tiene tres componentes principales: el profármaco que será activado, la enzima necesaria para la activación y el sistema de distribución o vector. Básicamente, esta terapia consta de dos pasos: la transfección de las células tumorales con el gen de una enzima (gen suicida) capaz de activar un profármaco y, posteriormente, la administración del profármaco que alcanzará las células transfectadas y será convertido en el correspondiente metabolito tóxico. Esta terapia, por lo tanto, presenta la ventaja principal de conseguir un efecto localizado y, así, evitar los efectos secundarios sistémicos, típicos de la quimioterapia convencional.

Existe una larga lista de combinaciones enzima/profármaco que están siendo desarrolladas para su aplicación en la terapia génica suicida. No obstante, algunas de las que más han sido y están siendo investigadas son las combinaciones de la timidina kinasa del virus del herpes simple tipo I con ganciclovir (HSVtk/GCV) y de citosina desaminasa con 5-fluorocitosina (CD/5-FC). Puesto que el interés de nuestro trabajo se centra en la primera, se hará únicamente una breve referencia a la segunda.

#### 1.5.1. El sistema timidina kinasa del virus del herpes simple tipo I/ganciclovir (HSVtk/GCV).

El sistema de terapia génica suicida más extendido es el que utiliza como enzima activadora la timidina kinasa del virus del herpes simple tipo I (HSVtk) (Moolten, 1986) y como profármaco el ganciclovir (GCV), un análogo acíclico de la desoxiguanosina (véase imagen 2), que tradicionalmente se ha utilizado para el tratamiento y prevención de las infecciones por citomegalovirus (Keating, 1999). La HSVtk transforma el GCV en la forma monofosforilada, GCV-P. Posteriormente, la guanilato kinasa de la célula convierte el GCV-P en GCV-PP (Brady *et al.*, 1996) y, a continuación, diferentes kinasas inespecíficas de la célula lo transforman en el metabolito tóxico, es decir, la forma trifosforilada o GCV-PPP, que se incorpora al DNA de las células en división, impidiendo la incorporación de su análogo fisiológico, la desoxiguanosina-trifosfato (dGTP) y, por tanto, impidiendo la elongación de la cadena de DNA (Mesnil and Yamasaki, 2000) (véase imagen 2 y esquema 7). El hecho de que las células tumorales se dividan de forma más activa que las células sanas, junto con

el hecho de que sólo las células que poseen la HSVtk fosforilan el GCV, proporciona selectividad a esta terapia.

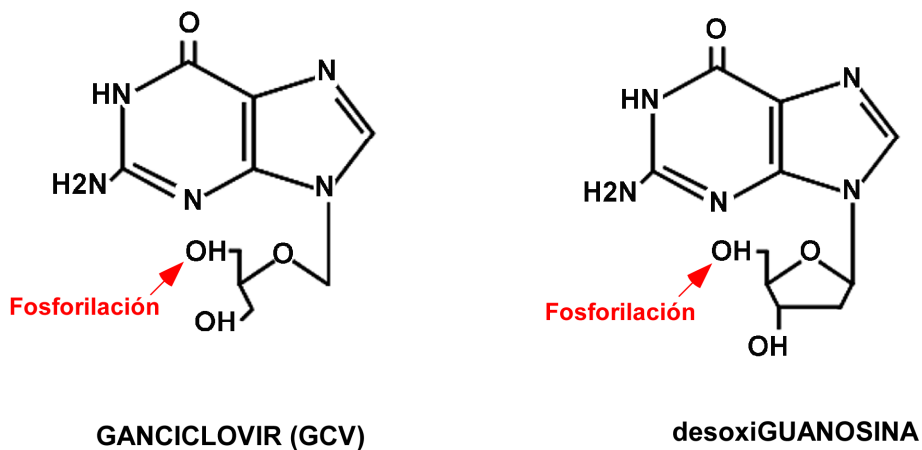
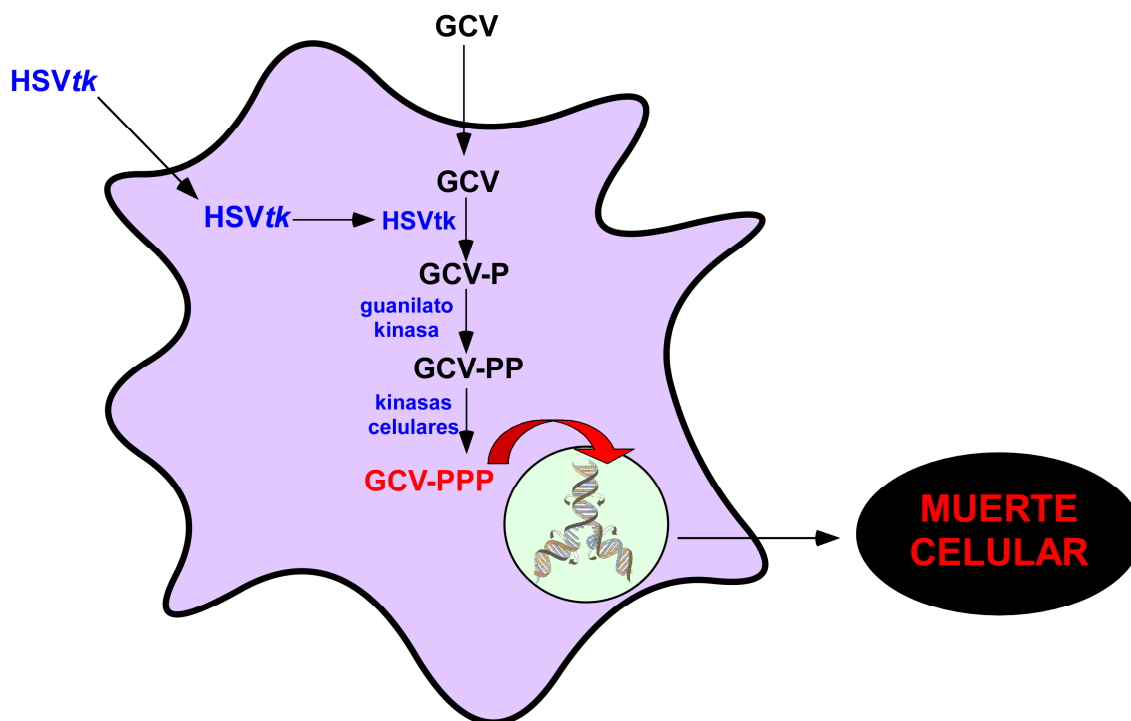


Imagen 2. Estructura del ganciclovir y la desoxiguanosina y sus sitios de fosforilación.



Esquema 7. Mecanismo de la terapia génica suicida.

Diversos estudios parecen indicar que la muerte de las células transfectadas con el gen de la HSVtk y posteriormente tratadas con GCV se produce por apoptosis (Beltinger *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2005; Hamel *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 1998). Wei y col demostraron que, en células de melanoma transfectadas con la HSVtk el tratamiento con GCV producía un retraso en la fase S, seguido de una parada en fase G2, lo que conduciría a las células a la posterior apoptosis o muerte celular programada. En el mecanismo también intervendría la inhibición de la DNA polimerasa por parte del principal producto del metabolismo del GCV, el GCV-PPP, así como la incorporación del mismo a la cadena de DNA en crecimiento (Wei *et al.*, 1998). Se ha sugerido que el GCV promueve la apoptosis a través de Bcl-2 y de forma independiente de p53 (Craperi *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2005), en diferentes líneas de glioma, entre ellas, la de glioma de rata C6. No obstante, Huang y col. observaron en esta misma línea celular, que la combinación del sistema HSVtk/GCV con la transfección del gen de p53 promovía una mayor eficacia en el tratamiento de los gliomas que la aplicación única del sistema HSVtk/GCV (Huang *et al.*, 2007). Este hecho sugiere que las modificaciones en el protocolo de la terapia génica suicida así como la combinación de la misma con otras terapias, puede mejorar la eficacia en el tratamiento de los tumores. De hecho, puesto que la eficacia de la terapia génica suicida se ve limitada por la baja eficacia de transfección y el reducido efecto *bystander* (véase apartado 1.5.3), son muchos los estudios dirigidos a introducir modificaciones en esta terapia con el objetivo de mejorarla. En este sentido, se ha observado que la estimulación del sistema inmune mediante la transfección de citoquinas tales como el interferón  $\gamma$  y el factor estimulador de colonias (GM-CSF) (Yang *et al.*, 2005) o el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Zhang *et al.*, 2004), mejora la eficacia del sistema HSVtk/GCV. Por otro lado, diversos estudios han utilizado un péptido derivado de la proteína Tat, una proteína procedente del virus de inmunodeficiencia humano, que posee señales de localización nuclear para crear proteínas de fusión Tat-HSVtk, que mejoran la eficacia de la terapia génica (Cao *et al.*, 2006; Cascante *et al.*, 2005). La coexpresión de la HSVtk con la guanilato kinasa, otra de las enzimas implicadas en el metabolismo del GCV, también ha resultado eficaz (Akyurek *et al.*, 2001; Willmon *et al.*, 2006). Es importante destacar, asimismo, la implicación de las conexinas en la mejora de la eficacia de la terapia génica suicida. No obstante, por ser éste un tema de especial interés para nuestro trabajo se le dedica un apartado independiente (véase apartado 1.5.3.).

Por otro lado, algunos tipos celulares se han mostrado resistentes al efecto del GCV. En este sentido, Tomacic y col. demostraron que la reparación, por parte de la DNA polimerasa  $\beta$ , del GCV incorporado en el DNA, está implicada en la resistencia al GCV que presentan algunas células de mamífero (Tomicic *et al.*, 2001). Además, la existencia en las células de elementos de multiresistencia a fármacos que bombean los fármacos al medio extracelular, puede ser una causa de ineficacia de los tratamientos. En este sentido, Park y col. observaron mediante el silenciamiento del gen de multiresistencia a fármacos, MDR1, en combinación con el sistema HSVtk/GCV, que la acumulación de GCV y la sensibilidad de las células tumorales a este fármaco era mayor (Park *et al.*, 2008b).

La eficacia del sistema HSVtk/GCV ha sido demostrada *in vitro* en diferentes tipos de cáncer, como el carcinoma de endometrio (Ural *et al.*, 2000), el carcinoma de mama (Carystinos *et al.*, 1999), el tumor pancreático (Cascante *et al.*, 2007) o los gliomas (Ammerpohl *et al.*, 2004; Asklund *et al.*, 2003; Izquierdo *et al.*, 1996; Robe *et al.*, 2000), entre otros, siendo éstos últimos uno de los principales tipos de tumores en los que se ha desarrollado esta terapia. Además, la terapia génica suicida también se ha mostrado eficaz *in vivo*. Así, dicha eficacia ha sido demostrada en ratones con gliosarcomas, observándose la utilidad de los vectores retrovirales y adenovirales en la transfección de la HSVtk (Vincent *et al.*, 1996). Miura y col. demostraron, también en ratones con gliosarcomas, que la utilización de dispositivos de silicona para la liberación controlada del GCV resultaba más eficaz que la administración intraperitoneal del mismo, después de la transfección con la HSVtk (Miura *et al.*, 2002).

Es importante señalar que aunque los estudios de investigación básica y preclínica han dado resultados alentadores en el campo de la terapia génica suicida aplicada a los gliomas, los ensayos clínicos realizados hasta el momento, no han resultado del todo prometedores, a pesar de ser bien tolerados (Sandmair *et al.*, 2000; Smitt *et al.*, 2003). En un ensayo en fase III con vectores retrovirales, el único realizado hasta el momento, Rainov y col. observaron una gran variabilidad en la respuesta de los pacientes, sin encontrar una mejora significativa en la supervivencia (Rainov, 2000). Debido a la baja eficacia de transfección que se consigue con los vectores disponibles en la actualidad (Rainov and Ren, 2003), se están haciendo esfuerzos con objeto de mejorar la eficacia de los mismos. Por sus características

intrínsecas, ya descritas previamente, los vectores adenovirales parecen ser más efectivos que los vectores retrovirales. De hecho, en el primer ensayo clínico de terapia génica suicida realizado con vectores adenovirales, Sandmair y col. observaron, en pacientes con glioma, una mayor supervivencia al emplear vectores adenovirales en comparación con el uso de vectores retrovirales (Sandmair *et al.*, 2000). Quizás el ensayo clínico con más éxito hasta el momento, fue el desarrollado por Immonen y col. en 2004, en el que la aplicación del sistema HSVtk/GCV mediante la utilización de vectores adenovirales en pacientes con glioma, prolongó la supervivencia de los pacientes tratados con respecto al grupo control, una media de 32 semanas (Immonen *et al.*, 2004). No obstante, los niveles de transfección alcanzados con los vectores adenovirales son, en general, todavía demasiado bajos, razón por la cual se están estudiando posibles modificaciones de estos vectores que permitan mayores porcentajes de transfección. Una de estas modificaciones consiste en el desarrollo de vectores capaces de reconocer receptores sobreexpresados en células tumorales pero no en células sanas, con lo que, se consigue un tropismo de los vectores hacia las células tumorales y se aumenta la eficacia de transfección (Zheng *et al.*, 2007a).

### **1.5.2. El sistema citosina desaminasa/5-fluorocitosina (CD/5-FC).**

La CD es una enzima que está presente de forma ubicua en las bacterias y en los hongos pero no en las células de mamífero. Esta enzima desamina el antifúngico 5-FC hasta 5-fluorouracilo (5-FU), el cual induce la muerte celular al inhibir tanto la síntesis de DNA como la de RNA. Se ha sugerido la existencia de un efecto sinérgico debido a la coexpresión de la CD y la HSVtk, tanto *in vitro* (Aghi *et al.*, 1998; Boucher *et al.*, 2006) como *in vivo*, en tumores de ratones “nude” (Rogulski *et al.*, 1997) tratados con 5-FC y GCV. El mecanismo puede ser una potenciación de la fosforilación del GCV por parte de la HSVtk después del tratamiento con 5-FC (Aghi *et al.*, 1998). Además, se ha observado que cuando las células son tratadas con el sistema CD/5-FC se reducen los niveles de desoxiguanosina-trifosfato (dGTP), el análogo fisiológico del GCV-PPP, lo cual implica que, a la hora de tratar las células, el sistema HSVtk/GCV aumente la cantidad de GCV-PPP y, por lo tanto, aumente la inhibición de la proliferación (Boucher *et al.*, 2006).

### **1.5.3. El efecto *bystander*. Implicación de las *gap junctions* en la terapia génica suicida.**

A pesar de que con los vectores disponibles en la actualidad solamente consigue alcanzarse un bajo porcentaje de la población tumoral, en algunos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha observado que, cuando un porcentaje bajo de la población tumoral, en torno al 10 %, está transfectado con el gen suicida, se consigue erradicar toda o gran parte de la población tumoral (Freeman *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2007). Este hecho ha sugerido que las células transfectadas y capaces de metabolizar el profármaco son capaces de inducir la muerte de las células no trasfectadas. A este fenómeno se le ha denominado “efecto *bystander*” (Caruso *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 1993).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el efecto *bystander*. Así, se ha sugerido la implicación de un componente inmunológico. Gagandeep y col. demostraron que el tratamiento con el sistema HSVtk/GCV en ratones con carcinoma de colon, provocaba una regresión total del tumor en los ratones inmunocompetentes pero no en los inmunodeprimidos (Gagandeep *et al.*, 1996), lo que sugiere que es necesario que el sistema inmune del hospedador esté intacto para que el efecto *bystander* se desarrolle. Además, se ha observado que después del tratamiento con el sistema HSVtk/GCV, se produce en la zona tratada una infiltración de linfocitos T CD4+ y CD8+ y de macrófagos, además de un aumento de los niveles de diferentes interleukinas (Gagandeep *et al.*, 1996; Vile *et al.*, 1997). Teniendo en cuenta estos datos, diversos autores han combinado el sistema HSVtk/GCV con la terapia inmunogénica, obteniendo una mayor eficacia en el tratamiento de los tumores (Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Por otro lado, también se ha sugerido que las células muertas podrían liberar determinados factores así como vesículas apoptóticas portadoras del GCV-PPP, que difundirían hasta las células no portadoras del gen suicida, ejerciendo un efecto tóxico sobre éstas (Freeman *et al.*, 1993).

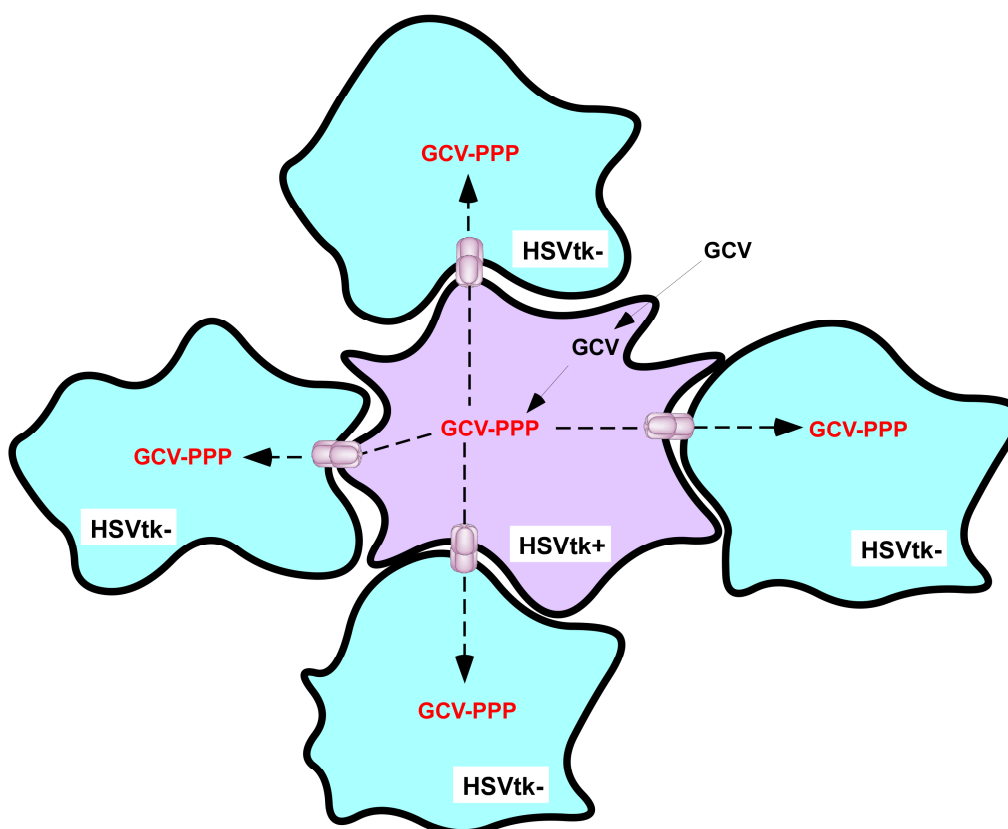
No obstante, de todos los posibles mecanismos sugeridos para explicar este fenómeno, uno de los más relevantes, especialmente en el caso del sistema HSVtk/GCV, es el paso del GCV-PPP a través de las *gap junctions*, desde las células HSVtk positivas hasta las células HSVtk negativas (Asklund *et al.*, 2003; Fick *et al.*, 1995; Mesnil *et al.*, 1996) (para revisión, véase: (Mesnil and Yamasaki, 2000) (véase



esquema 8). De hecho, el empleo de agentes que cierran las *gap junctions*, como el AGA, disminuye el efecto *bystander* (Asklund *et al.*, 2003). Los metabolitos fosforilados del GCV no atraviesan la membrana por difusión, a diferencia de lo que ocurre en el sistema CD/5-FC, donde el 5-FU atraviesa las membranas por difusión y el efecto *bystander* es independiente de las *gap junctions* (Kuriyama *et al.*, 1998). Por lo tanto, la expresión de la conexina 43 y el establecimiento de la comunicación intercelular a través de las *gap junctions*, puede ser importante a la hora de desarrollar un potente efecto *bystander* en el sistema de terapia génica suicida HSVtk/GCV. No obstante, puesto que, como ya se ha mencionado en apartados anteriores, en las células tumorales los niveles de expresión de la conexina 43 son muy bajos (Holden *et al.*, 1997; Laird *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2001), es necesario establecer protocolos terapéuticos que potencien la comunicación a través de las *gap junctions*. En este sentido, diversos autores han observado que al transfectar las células tumorales con el gen de la conexina 43, aumenta la eficacia del sistema HSVtk/GCV (Dilber *et al.*, 1997; Elshami *et al.*, 1996; Jimenez *et al.*, 2006; Marconi *et al.*, 2000; Sanson *et al.*, 2002), aunque ésta no parece ser la mejor alternativa debido, nuevamente, a la baja eficacia de transfección. Por esta razón, la estimulación farmacológica de la comunicación intercelular parece ser una mejor alternativa.

Como se mostró en apartados previos, se ha demostrado que el cAMP es capaz de promover el aumento de la permeabilidad de las *gap junctions* en diferentes tipos celulares (Atkinson *et al.*, 1995; Azarnia *et al.*, 1981 Burghardt, 1995, 243; Ghosh and Singh, 1997; Paulson *et al.*, 2000; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). Teniendo esto en cuenta, se ha observado que el cAMP es capaz de mejorar la eficacia de la terapia génica suicida en líneas celulares de coriocarcinoma (Kunishige *et al.*, 1998), de mama (Carystinos *et al.*, 1999) o de glioma (Robe *et al.*, 2000), a través de la estimulación de las *gap junctions*, puesto que dicho efecto es revertido por agentes que bloquean la comunicación como el AGA (Robe *et al.*, 2000). Además, el efecto se hace más patente cuando el porcentaje de células que contienen la HSVtk es bajo (Carystinos *et al.*, 1999; Robe *et al.*, 2000), lo cual se aproxima a los porcentajes de transfección obtenidos *in vivo* con los vectores actuales. Por otro lado, Matono y col. observaron que el cAMP no promovía el efecto *bystander* en células de cáncer de esófago (Matono *et al.*, 2003), lo que pone de manifiesto la importancia de las características intrínsecas de cada línea celular.

Se ha observado, además, que el 4-fenilbutirato, un inhibidor de la histona desacetilasa, aumenta la expresión de la conexina 43 y la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioblastoma (Asklund *et al.*, 2004). Este hecho ha llevado a demostrar que tanto el 4-fenilbutirato (Ammerpohl *et al.*, 2004) como otros inhibidores de la histona desacetilasa, como el n-butirato (Robe *et al.*, 2004), potencian el efecto *bystander* a través de las *gap junctions*. Finalmente, también se ha descrito en estudios *in vitro* que los retinoides aumentan la permeabilidad de las *gap junctions* y el efecto *bystander* (Chen *et al.*, 2008; Park *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002) e *in vivo* (Chen *et al.*, 2008), observándose nuevamente una mayor magnitud del efecto *bystander* con bajos porcentajes de células HSVtk positivas (Chen *et al.*, 2008).



**Esquema 8. Mecanismo del efecto *bystander* a través de las *gap junctions*.**

GCV: ganciclovir. GCV-PPP: ganciclovir trifosfato. HSVtk: timidina kinasa del virus del herpes simple.

“Es de importancia para quien desee alcanzar una certeza en su investigación, el saber dudar a tiempo”.

**Aristóteles**





Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas en la Introducción y con objeto de conocer el papel de la tolbutamida en las células de glioma, el Plan de Trabajo quedó establecido como sigue:

**1º**-Estudio del efecto de la tolbutamida sobre la proliferación de las células de glioma de rata y de glioma humano con diferentes grados de malignidad. Estudio de la participación de la comunicación intercelular y de la conexina 43 en este efecto.

**2º**-Caracterización del canal de potasio sensible al ATP en células de glioma de rata y de glioma humano.

**3º**-Estudio del efecto *bystander* de la tolbutamida en un modelo de terapia génica suicida en células de glioma de rata y de glioma humano.



“La ciencia humana consiste más en destruir errores que en descubrir verdades”.

**Sócrates**







### 3.1. MATERIAL.

#### 3.1.1. Líneas celulares utilizadas.

Se empleó la línea celular de glioma de rata C6, proporcionada por el Prof. Christian Giaume del Collège de France, París, Francia. Es una línea celular con características de glioblastoma multiforme (grado IV) (Auer *et al.*, 1981).

Se empleó la línea celular de glioma humano U373 MG (U373), proporcionada por el Prof. Dr. Fernando Valdivieso del Instituto de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta línea está clasificada como astrocitoma-glioblastoma (grado III) (Gonzalez-Aguero *et al.*, 2007).

Se empleó la línea celular de glioma humano T98-G, que procedió de la casa comercial *American Type Culture Collection* (ATCC) y que está clasificada por ésta como glioblastoma multiforme (grado IV).

Se empleó la línea celular de glioma humano SW 1088 (HTB12), que procedió de la casa comercial *American Type Culture Collection* (ATCC) y que está clasificada por ésta como astrocitoma (grado III).

Se empleó la línea celular de glioma humano Hs 683 (HTB138), que procedió de la casa comercial *American Type Culture Collection* (ATCC). Según la casa comercial, esta línea no resulta tumorigénica en ratones inmunodeprimidos pero sí lo es en medio semisólido. Según diversos autores está clasificada como glioma de bajo grado (grado II) (Konduri *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2001).

#### 3.1.2. Medios instrumentales.

- Las pesadas se realizaron en una balanza modelo 1207 MP2 y en un granatario modelo 1216 MP (Sartorius GmbH, Göttingen, Alemania).
- El pH se determinó con un medidor de protones, marca Crison (Selecta, Barcelona, España).

- El espectrofotómetro utilizado fue de la marca Hitachi, Modelo U-2000. Las cubetas fueron de plástico, de 1 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz (Elkay, Boston, U.S.A.).
- Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman de mesa, modelo TJ-6, en una ultracentrífuga Beckman, modelo L8-M (Beckman Instruments, Palo Alto, U.S.A.) y en una centrífuga Eppendorf, modelo Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).
- El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo milli-RO plus 10 y una unidad de agua ultrapura milli-Q plus 185 (Millipore Ibérica, Madrid, España).
- El material de vidrio se esterilizó mediante calor seco, durante un mínimo de 10 horas, en una estufa termostatzada a 170°C, modelo S-20 (Selecta).
- El agua y el resto de los utensilios que requerían asepsia se esterizaron por medio de calor húmedo en un autoclave modelo-437 (Selecta).
- Se utilizaron botellas de dióxido de carbono suministradas por la Sociedad Castellana de Oxígeno (Valladolid, España).
- La cabina de flujo laminar utilizada fue un modelo TC 48 (Gelaire Flow Laboratories, McLean, U.S.A).
- Se utilizó un baño termostatzado a 37°C, modelo Precistern (Selecta), un baño modelo Haake Fisons D8 con termostato acoplado (Haake, Berlín, Alemania) y un bloque térmico para el calentamiento de tubos en seco (Selecta).
- Las células se mantuvieron en cultivo en los incubadores de CO<sub>2</sub> modelo IR 1500 Automatic CO<sub>2</sub> incubator (Gelaire Flow Laboratories) o Galasy CO<sub>2</sub> (RS Biotech, Northants, Reino Unido).
- Las células se observaron periódicamente con un microscopio de contraste de fases, modelo Willovert II pH (Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Alemania) y se contaron con la ayuda de una cámara cuentaglóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania).
- Para los experimentos con moléculas fluorescentes se empleó un microscopio invertido de fluorescencia, modelo Eclipse T2000 (Nikon Europe B.V., Badhoevedrop, Holanda) y un microscopio Nikon, modelo LWD 0,52.

- Las imágenes se captaron utilizando cámaras de vídeo digitales, modelos Leica DC 100 y Leica DC 350 F (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) conectadas al microscopio.
- Para los análisis de transferencia tipo *Western* se utilizó un sistema de electroforesis vertical y un sistema de electrotransferencia modelo "Mini Trans-Blot Transfer Cell" conectado a una fuente de alimentación modelo "PowerPac 300" (Bio-Rad Laboratories, Madrid, España).
- Para llevar a cabo las reacciones de PCR y RT-PCR se utilizó un termociclador modelo GeneCycler (Bio-Rad) y un Mastercycler Realplex<sup>4</sup> de Eppendorf.
- Los viales de plástico de 0,2 ml para PCR se adquirieron en Biotools (Biotools-B&M Labs S.A., Madrid, España).
- El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo Gel Doc 2000 (Bio-Rad), perteneciente al Instituto de Microbiología Bioquímica (CSIC/Universidad de Salamanca, España).
- Para el revelado de las películas de autorradiografía se utilizaron la máquina de revelado modelo M35 X-OMAT processor de Kodak (Rochester, New York, EEUU) y la máquina de revelado modelo Medical X-Ray Processor de Kodak.
- La secuenciación del inserto correspondiente al gen *HSVtk* se realizó en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Edificio Departamental, Salamanca, España).
- Para la realización del ensayo colorimétrico con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se utilizó un fotómetro de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EEUU) y un fotómetro de microplacas Appliskan (Thermo Electro Corporation).
- El material empleado en los cultivos fue estéril. Así, los medios de cultivo y los tampones utilizados se esterilizaron a través de filtros de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore Ibérica). Para pequeños volúmenes de soluciones estériles se utilizaron filtros de jeringa de 0,2 µm de diámetro de poro, Acrodisc Pall Gelman Laboratory, Michigan, U.S.A). Las células se sembraron en placas estériles procedentes de la casa comercial Nunc (Nunclon, Roskilde, Dinamarca) y de la casa comercial TPP (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland).
- Para la selección de los oligonucleótidos empleados en la PCR y RT-PCR se utilizó el programa informático *oligo* 4.0. Para capturar las imágenes visualizadas en el microscopio se utilizó un programa informático TCS-SP

(Leica Microsystems). Las imágenes se analizaron con el programa informático *Scion Image*.

### **3.1.3. Productos.**

#### **3.1.3.1. Productos utilizados en la preparación de los cultivos celulares.**

- El medio de cultivo procedió de la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) y es del tipo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco).
- El suero fetal de ternero (Fetal Calf Serum, FCS) procedió de la casa Gibco (Invitrogen, Barcelona, España).
- La poli-L-lisina con la que se recubrió el fondo de las placas de cultivo se adquirió en Sigma-Aldrich.
- La tripsina/EDTA procedió de Gibco.
- La penicilina G, la estreptomycinina y la anfotericina B utilizadas para la preparación de los medios de cultivo procedieron de la casa Sigma-Aldrich.
- El DMSO utilizado para congelar las células se adquirió en la casa comercial Fluka (Sigma-Aldrich).

#### **3.1.3.2. Productos utilizados en los experimentos para la detección de proteínas específicas.**

- Los inhibidores de proteasas: antipaína, amastatina, aprotinina, leupeptina, bestatina, inhibidor de tripsina y fluoruro de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) procedieron de la casa Sigma-Aldrich.
- El reactivo de Bradford para la cuantificación de proteínas, la solución de 30% acrilamida/Bis (29:1) para la preparación de los geles de electroforesis y el marcador de peso molecular de proteínas procedieron de la casa Bio-Rad.
- El marcador de proteínas de alto peso molecular se adquirió en Invitrogen (Carlsbad, California, EEUU).
- La N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) y el persulfato amónico (AMPS) utilizados en la preparación de los geles de electroforesis procedieron de la casa Sigma-Aldrich.
- Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro adquiridas en Bio-Rad.

- El metanol utilizado en la preparación del tampón de transferencia en los experimentos de *Western* y en la permeabilización de la membrana celular en las inmunocitoquímicas, así como el paraformaldehído utilizado para fijar las células en las inmunocitoquímicas procedieron de la casa Merck (Darmstadt, Alemania)
- El anticuerpo contra la conexina 43, utilizado en los experimentos de *Western blot*, procedió de la casa comercial Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EEUU) y es un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón.
- El anticuerpo contra la proteína marcadora de proliferación, Ki-67, utilizado en los experimentos de *Western blot* y de inmunocitoquímica, se adquirió en la casa comercial Sigma-Aldrich y es un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón.
- En los experimentos de *Western blot* contra la proteína p21 se utilizó el anticuerpo policlonal desarrollado en conejo procedente de la casa comercial Oncogene (San Diego, California, EEUU), que también se utilizó en las inmunocitoquímicas, así como el anticuerpo monoclonal de ratón adquirido en la casa comercial Becton Dickinson.
- El anticuerpo contra la proteína p27, utilizado en los experimentos de *Western blot*, se adquirió en la casa comercial Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EEUU) y es un anticuerpo monoclonal de ratón. En las inmunocitoquímicas contra esta proteína se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo procedente de la casa comercial Abcam (Cambridge, Reino Unido).
- Los anticuerpos contra las proteínas Kir6.1 y Kir6.2 fueron desarrollados en conejo y procedieron de la casa Sigma-Aldrich.
- Los anticuerpos utilizados como control de carga en los experimentos de *Western blot* fueron el anticuerpo monoclonal de ratón contra la  $\alpha$ -tubulina procedente de Sigma-Aldrich, el anticuerpo monoclonal de ratón contra la  $\alpha$ -actinina procedente de Chemicon (Temecula, CA, EEUU) y el anticuerpo monoclonal de ratón contra la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) procedente de Applied Biosystems (Foster City, CA, EEUU).
- Los anticuerpos secundarios contra ratón y contra conejo, conjugados con peroxidasa, utilizados en los experimentos de *Western blot*, se adquirieron en la casa comercial Santa Cruz Biotechnology.

- Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594 y anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488, utilizados en las inmunocitoquímicas, se adquirieron en la casa comercial Invitrogen.
- Para la detección de la señal correspondiente a las proteínas de interés, se empleó un kit de quimioluminiscencia suministrado por Santa Cruz Biotechnology o un kit de quimioluminiscencia de alta sensibilidad (*Super Signal West Dura Extended Duration Substrate*) suministrado por la casa Pierce Biotechnology (Rockford, IL, U.S.A.).
- Las películas de autorradiografía utilizadas para la detección de la quimioluminiscencia fueron películas médicas de Rayos-X de la casa Fujifilm (Madrid, España).
- Para montar las placas se utilizó el kit *SlowFade Gold antifade reagent* suministrado por la casa comercial Invitrogen, que evita la pérdida de fluorescencia.

### **3.1.3.3. Productos utilizados en los experimentos de RT-PCR.**

- El reactivo para la extracción del RNA (*Trizol<sup>®</sup> Reagent*) procedió de Invitrogen.
- El inhibidor de RNAsas, así como la DNAsa utilizada para digerir el DNA presente en las muestras de RNA, procedieron de Ambion (Austin, TX, EEUU).
- El dietilpirocarbonato (DEPC), que inactiva las RNAsas, utilizado para preparar el H<sub>2</sub>O-DEPC fue suministrado por Sigma-Aldrich. El bromuro de etidio utilizado para marcar el DNA también procedió de Sigma-Aldrich.
- La retrotranscriptasa, el ditiotreitól (DTT), los *random primers* y los desoxirribonucleótidos-trifosfato (dNTPs) fueron suministrados por la casa comercial Invitrogen.
- Los reactivos y productos utilizados en la preparación de soluciones y tampones para Biología Molecular, estaban libres de DNAsas y RNAsas y procedían de la casa Sigma-Aldrich.
- Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de RT-PCR, cuyo objetivo fue la detección del mRNA de interés en cada caso, procedieron de la casa SIGMA Genosys (Haverhill, Suffolk, Reino Unido) y fueron los que se detallan en la tabla 2.

- La DNA polimerasa utilizada para la amplificación del cDNA procedió de Biotools.
- La agarosa utilizada para la preparación de los geles procedió de la casa Pronadisa (Torrejón de Ardoz, Madrid, España).
- Como marcadores de tamaño de DNA, se utilizaron el marcador de 100 pb de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU) y el marcador de alto peso molecular de Invitrogen.

PROTEÍNA	OLIGONUCLEÓTIDOS
<b>SUR1 (RATA)</b>	<i>Cadena sentido:</i> 5-gcgactctgcttgccctcg-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-gaaactgtgtctgggctgg-3'
<b>SUR2 (RATA)</b>	<i>Cadena sentido:</i> 5'-gttg aagaat atgtcaaatctc-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-agtatcgactccactaaaata-3'
<b>Kir6.1</b>	<b>RATA</b> <i>Cadena sentido:</i> 5'-ttgggttgagggaagaatg-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-acaggggctacgctatca-3' <b>HUMANO</b> <i>Cadena sentido:</i> 5'-ttgggttgagggaaggatg-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-ctggtgctgcacagaggcac-3'
<b>Kir6.2</b>	<b>RATA</b> <i>Cadena sentido:</i> 5'-ggctcctagtgcctgcacca-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-ccacagccactgcgcttgcg-3' <b>HUMANO</b> <i>Cadena sentido:</i> 5'-atgctgtcccgaaggcat-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-tagtcacttgacctaattggag-3'
<b>HSVtk</b>	<i>Cadena sentido:</i> 5'-atggcttcgtaccccgcc-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-tcagttagcctccccatc-3'
<b>RFP</b>	<i>Cadena sentido:</i> 5'-atggcctcctccgagaacg-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-ctacaggaacaggtggtg-3'
<b>β-ACTINA</b>	<i>Cadena sentido:</i> 5'-gagcaccctgtgctcaccgagg-3' <i>Cadena antisentido:</i> 5'-gtggtgtgaagctgtagccacgct-3'

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en los experimentos de RT-PCR.**

### 3.1.3.4. Productos utilizados en los experimentos de silenciamiento.

- La Lipofectamina 2000<sup>®</sup> utilizada para la transfección de los siRNA, así como el medio Opti-MEM<sup>®</sup>, procedieron de la casa comercial Invitrogen.
- Los siRNA utilizados para el silenciamiento de la conexina 43 (Cx43) procedieron de la casa comercial BioNova científica S.L. (Madrid, España) y tienen las siguientes secuencias:

cadena sentido: 5'-GCUGGUUACUGGUGACAGATT-3'

cadena antisentido: 5'-UCUGUCACCAGUAACCAGCTT-3'

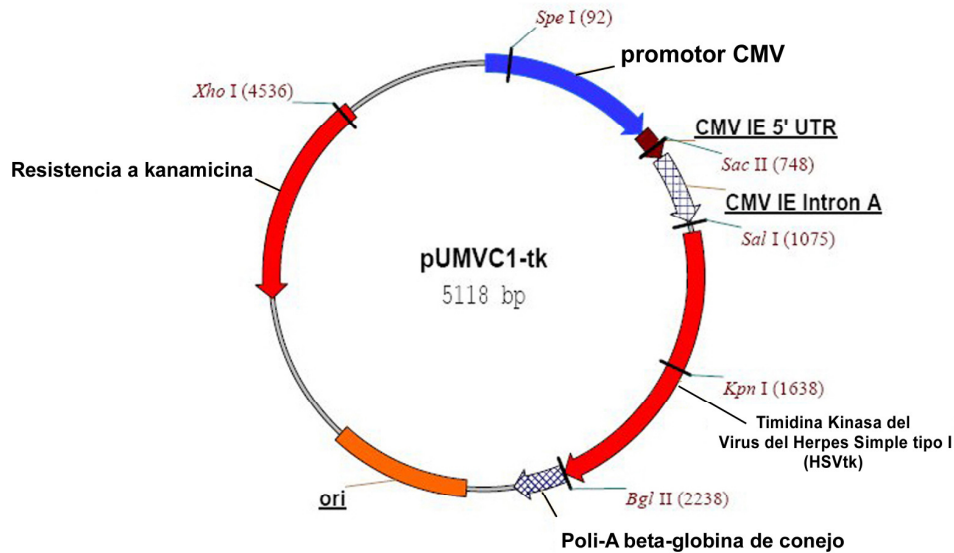
- El siRNA sin diana (*non target*-siRNA o nt-siRNA), utilizado como control negativo, procedió de la casa comercial Ambion.

### 3.1.3.5. Productos utilizados en la construcción del plásmido pRFPHSVtk.

- Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR se adquirieron en Sigma-Genosys. En apartados posteriores se indican sus secuencias.
- Para la amplificación del DNA se utilizó la polimerasa Triple Master<sup>®</sup>, procedente de la casa Eppendorf, que permite amplificar la secuencia de interés con alta fidelidad.
- Para la purificación del DNA lineal se utilizó el kit *GenElute Gel Extraction*<sup>®</sup>, procedente de la casa comercial Invitrogen.
- La triptona y el extracto de levadura para la elaboración del medio de bacterias procedieron de la casa Scharlau (Chemie, S.A. Barcelona, España). La kanamicina, utilizada para la selección de *E. coli*, procedió de la casa Sigma-Aldrich. El antibiótico G418, utilizado para la selección de las células eucariotas, procedió de Promega (Madison, WI, EEUU).
- Las enzimas de restricción *Bam*HI, *Xho*I, *Hind*III y *Eco*RI se adquirieron en la casa comercial Promega. La ligasa T4 procedió de Roche Diagnostics (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España).
- Los productos utilizados para la purificación del DNA plasmídico fueron de las casas Promega o MOBIO (Solana Beach, CA. U.S.A.).
- El vector pUMVC1-tk (véase imagen 3) procedió de la casa comercial Vector Core (Ann Arbor, MI, EEUU). Contiene, entre otras, la secuencia codificadora



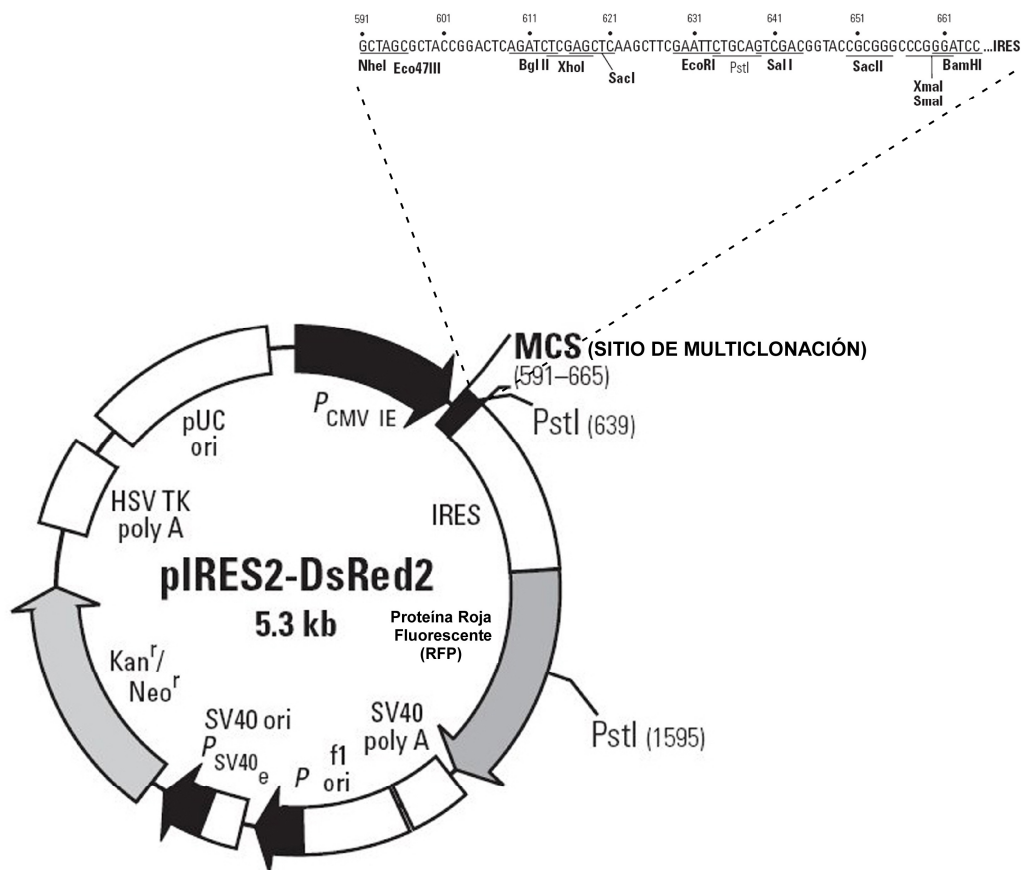
del gen de la timidina kinasa del virus del herpes simple tipo I (HSVtk) y una secuencia de resistencia a kanamicina. Posee un tamaño de 5118 pb.



**Imagen 3. Estructura del plásmido pUMVC1-tk.**

- El vector pIRES2-DsRed2 (véase imagen 4) procedió de Clontech (Palo Alto, CA, U.S.A.). Presenta, entre otras, las siguientes características:
  - El promotor del citomegalovirus (CMV) humano.
  - Un sitio de multiclonación (MCS), con sitios de restricción para diferentes enzimas.
  - Una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*).
  - El gen de la proteína roja fluorescente (RFP), DsRed2.
  - La señal de poliadenilación SV40.
  - Un origen de replicación para células eucariotas (SV40 *ori*) y otro para células eucariotas (pUC *ori*).

- Un gen de resistencia a neomicina que permite la selección en células eucariotas utilizando el antibiótico geneticina. También posee el gen de resistencia a kanamicina que permite la selección en células procariontas.
- Tiene un tamaño de 5,3 Kb.



**Imagen 4. Estructura del plásmido pIRES2-DsRed2.**

- El bromuro de etidio, los dNTPs, la agarosa, los marcadores de tamaño de DNA así como los reactivos y productos utilizados para preparar las distintas soluciones y tampones fueron los mismos que se indican en el apartado 3.1.3.3.

### **3.1.3.6. Productos utilizados en los experimentos de toxicidad del ganciclovir y estudio del efecto *bystander*.**

- El 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) procedieron de Sigma-Aldrich.
- El kit de anexina-V, utilizado para medir apoptosis, procedió de Molecular Probes (Eugene, OR, USA) o de Immunostep (Salamanca, España).
- Los productos utilizados para la detección de apoptosis mediante la técnica TUNEL, procedieron de la casa Roche Diagnostics.

### **3.1.3.7. Otros productos.**

- La tolbutamida, el dibutirilcAMP (db-cAMP), la carbenoxolona y el ganciclovir procedieron de la casa Sigma-Aldrich.
- El diazóxido y el pinacidilo procedieron de Sigma-Aldrich.
- La glucosa utilizada para suplementar el cultivo de las células HTB138 procedió de Sigma-Aldrich.

## **3.2. MÉTODOS.**

### **3.2.1. Preparación de los cultivos celulares.**

#### **3.2.1.1. Composición de las disoluciones.**

Las disoluciones empleadas se prepararon con H<sub>2</sub>O ultrapura estéril. Se ajustó el pH a 7,2 y se esterilizaron por filtración (tamaño de poro 0,22 µm).

Medio de cultivo, pH 7,2

DMEM + FCS 10% (v/v)

Penicilina G	50 U/ml
Estreptomicina	37,5 U/ml
Anfotericina B	10 <sup>-4</sup> mg/ml

Tampón fosfato salino (PBS), pH 7,2

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 mM
Penicilina G	50 U/ml
Estreptomicina	37,5 U/ml
Anfotericina B	10 <sup>-4</sup> mg/ml

**3.2.1.2. Preparación del cultivo de células de glioma.**

Las células de glioma de rata C6 y las células de glioma humano U373, T98-G, HTB12 y HTB138 se cultivaron según el método descrito previamente por Tabernero y col. (Tabernero *et al.*, 1996). Las células se cultivaron en placas petri en medio de cultivo, a pH 7,2, con dos cambios de medio por semana y se mantuvieron en un incubador a 37°C, con un 5% CO<sub>2</sub>, según el tiempo establecido en cada caso. A partir de ese momento se procesaron para los distintos experimentos o se sembraron a menor densidad. De forma específica, en el caso de las células de glioma C6 y HTB138, las placas se recubrieron con poli-L-lisina (1 µg/cm<sup>2</sup>) para facilitar su adhesión, así como en los experimentos de *scrape loading* para todas las células de glioma. Además, según especificaciones del proveedor, el medio de cultivo de las células HTB138 se suplementó con glucosa 20 mM.

Para la resiembra de las células de glioma, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con tripsina/EDTA durante 1 minuto a 37 °C. Se recogieron en DMEM + FCS 10% (v/v), para finalizar la tripsinización y se centrifugaron durante 5 minutos a 500 x g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio de cultivo. Se cuantificó el número de células empleando una cámara de

Neubauer y se procedió a su resiembra a la densidad celular adecuada según el tipo de experimento.

La congelación de las células de glioma se llevó a cabo en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , manteniendo las células en crioviales, con un medio crioprotector consistente en FCS + DMSO 8% (v/v).

### 3.2.2. Tratamientos celulares.

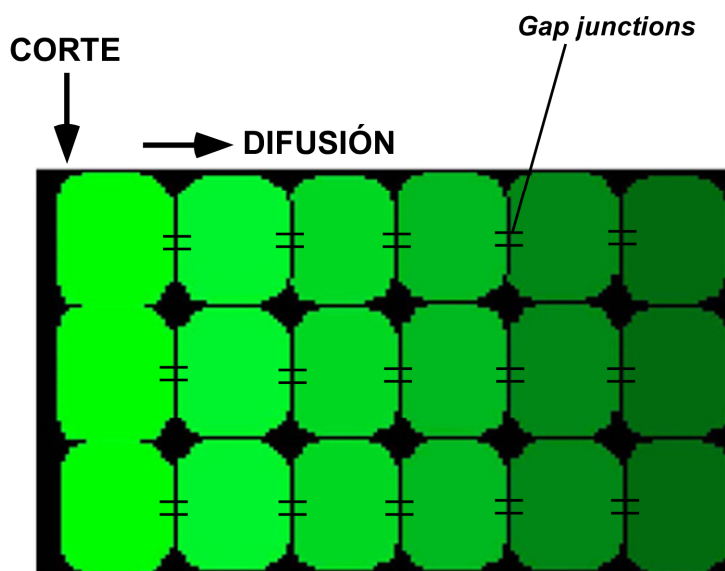
En los experimentos de *scrape loading* y de detección de la conexina 43, así como de las diferentes proteínas implicadas en el ciclo celular (Ki-67, p21 y p27), las células se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la confluencia. Llegado este punto, se incubaron con DMEM en ausencia de suero durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se añadió medio fresco, en ausencia de suero, que contenía los diferentes tratamientos celulares. Las concentraciones de los tratamientos fueron las siguientes: tolbutamida  $400\ \mu\text{M}$ , dibutilil-cAMP (db-cAMP)  $1\ \text{mM}$ , diazóxido  $300\ \mu\text{M}$  y pinacidilo  $500\ \mu\text{M}$ . Las células se adquirieron con dichos tratamientos a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y, posteriormente, se procesaron para los diferentes experimentos.

En los experimentos para evaluar la toxicidad del GCV, las células se incubaron en presencia de DMEM + FCS 10 %, con GCV  $0-200\ \mu\text{M}$ , durante 1, 2, 3, 4 ó 5 días, al cabo de los cuales se estudiaron los efectos mediante el método correspondiente. En el caso de las células de glioma de rata C6 se repitió la dosis de GCV pasados dos días desde la primera dosis. En los experimentos para estudiar el efecto *bystander*, las células se preincubaron con db-cAMP  $1\ \text{mM}$  o con tolbutamida  $400\ \mu\text{M}$ , 24 horas antes del tratamiento con GCV  $100\ \mu\text{M}$ . En el momento de añadir el GCV  $100\ \mu\text{M}$ , se repitió la dosis de tolbutamida  $400\ \mu\text{M}$  y se añadió el tratamiento con carbenoxolona  $50\ \mu\text{M}$  donde correspondiera.

### 3.2.3. Determinación de la permeabilidad celular.

La permeabilidad de las uniones comunicantes o *gap junctions* se determinó mediante la técnica conocida como *scrape loading*, según el método descrito por El-Fouly y col. (El-Fouly *et al.*, 1987), con algunas modificaciones (Tabernerero *et al.*,

2001). En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y se realizaron varios lavados con solución externa, pH 7,2 (NaCl 130 mM, KCl 2,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y HEPES 10 mM), incubando las células con el medio del último lavado durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados con solución sin-Ca<sup>2+</sup> (con la misma composición que la solución anterior pero sin CaCl<sub>2</sub>), incubándose las células con el medio del último lavado durante 2 minutos. Después, la placa se incubó con el colorante fluorescente amarillo de Lucifer disuelto en la solución sin-Ca<sup>2+</sup> (1 mg/ml) durante 2 minutos. En presencia del colorante y con ayuda de un bisturí, se realizó suavemente un corte sobre la monocapa de células en el centro de la placa. Este tratamiento permite la entrada del amarillo de Lucifer en el interior celular, puesto que la ruptura de la célula viene seguida de una rápida vesiculación de la membrana plasmática. El amarillo de Lucifer es una molécula cuyo tamaño molecular es lo suficientemente pequeño (457 Daltons) como para difundir libremente a través de las *gap junctions*. Sin embargo, es incapaz de difundir a través de la membrana plasmática (El-Fouly *et al.*, 1987). Consecuentemente, una vez que el amarillo de Lucifer ha penetrado en la célula, difundirá hacia las células adyacentes exclusivamente a través de las *gap junctions* (véase esquema 9).



Esquema 9. Fundamento de la técnica de *Scrape loading*.

### **3.2.4. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo *Western*.**

La separación electroforética de las proteínas presentes en las muestras se realizó mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS (SDS-PAGE).

#### **3.2.4.1. Extracción de las proteínas.**

Las proteínas procedentes de las células en cultivo se recogieron en solución de extracción de proteínas (Tris 5 mM, SDS 2%, EDTA 2 mM y EGTA 2 mM), que contenía PMSF 1 mM, antipaína 0,5 µg/ml, amastatina 0,5 µg/ml, leupeptina 0,5 µg/ml, bestatina 0,5 µg/ml, inhibidor de tripsina 0,5 µg/ml y aprotinina 3 U/ml. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 20800 x *g* durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante y se mantuvo a -80°C hasta el momento de su utilización.

#### **3.2.4.2. Cuantificación de las proteínas.**

Para determinar la concentración de proteínas presentes en las muestras, se siguió el método de Bradford (Bradford, 1976). Una pequeña alícuota de la muestra de proteínas se diluyó 1000 veces en agua ultrapura. De esa dilución se tomó un volumen de 800 µl y se añadieron 200 µl de reactivo de Bradford (BioRad, producto especificado en el apartado 3.1.3.2.). Se agitó la mezcla en el vórtex y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se procedió a medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteínas se determinó utilizando una recta patrón realizada con disoluciones de albúmina sérica bovina (1-25 µg/ml) a las que se añadió una concentración de SDS igual a la de las muestras (0,002% p/v).

#### **3.2.4.3. Preparación de los geles.**

Se utilizaron geles de poliacrilamida con grosores de 0,75 ó 1,5 mm.

gel de concentración (4%) en H<sub>2</sub>O ultrapura estéril

Tris-HCl, pH 6,8	0,125 M
acrilamida/Bis	4% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)
persulfato de amonio (AMPS)	0,05% (p/v)
N,N,N',N'-tetrametilendiamino (TEMED)	0,1% (v/v)

gel de separación en H<sub>2</sub>O ultrapura estéril

Tris-HCl, pH 8,8	0,375 M
acrilamida/Bis	7,5% (v/v), 10% (v/v) ó 12% (v/v)
SDS	0,1% (p/v)
persulfato de amonio (AMPS)	0,05% (p/v)
N,N,N',N'-tetrametilendiamino (TEMED)	0,1% (v/v)

**3.2.4.4. Preparación de las muestras para la electroforesis.**

Una vez calculada la concentración de proteínas en las muestras, entre 60-90 µg de proteínas se resuspendieron en un volumen equivalente de tampón de carga (Tris-HCl 0,08 M pH 6,8, SDS al 4% (p/v), glicerol al 40% (v/v), azul de bromofenol, 0,125 M y 1,4-ditiotreitol 6 mM). Se hirvió la mezcla durante 5 minutos y, tras realizar una rápida centrifugación, se mantuvieron en hielo hasta el momento de la carga. El tampón utilizado para la electroforesis (preparado en H<sub>2</sub>O ultrapura) fue: Tris 0,025 M, glicina 0,19 M a pH 8,6 con SDS al 0,1% (p/v). Las muestras se cargaron en los distintos pocillos del gel, incluyendo en uno de ellos, un marcador adecuado de pesos moleculares de proteínas.

**3.2.4.5. Electroforesis de las proteínas.**

Se realizó a temperatura ambiente, a un voltaje de 100 V, aproximadamente. El tiempo que duró la electroforesis varió, dependiendo de la proteína de interés, entre los 90 minutos y las 3 horas.



### 3.2.4.6. Electrotransferencia.

Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Para ello, se aplicó un voltaje de 60 V durante 2 horas a temperatura ambiente o de 40 V durante 12 horas a 4  $^{\circ}\text{C}$ . De esta forma, las proteínas pasan a la membrana atraídas por la carga eléctrica positiva, quedando inmobilizadas en la membrana en la misma posición que ocupaban en el gel.

#### Tampón de transferencia, pH 8,6 (en H<sub>2</sub>O ultrapura)

Tris	0,025 M
glicina	0,19 M
SDS	0,02% (p/v)
metanol	20%

### 3.2.4.7. Visualización de las proteínas y bloqueo de la membrana.

La presencia de proteínas en la membrana se visualizó mediante tinción con Rojo Ponceau al 10% (v/v). A continuación, la membrana se bloqueó, durante 1 hora a temperatura ambiente, con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v).

### 3.2.4.8. Inmunodetección.

Para detectar la proteína de interés en cada caso, la membrana se incubó con el anticuerpo primario desarrollado contra dicha proteína, durante un mínimo de 12 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$ . Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

- El anticuerpo monoclonal de ratón contra la conexina 43, diluído (1:100) en Tampón Tris salino (TBS) + Tween 20 al 0,1% (v/v) + leche al 5% (p/v).
- El anticuerpo monoclonal de ratón contra Ki-67, diluído (1:400) en TBS + Tween 20 al 0,1% (v/v) + leche al 2% (p/v).
- El anticuerpo policlonal de conejo contra p21, diluído (1:100) en solución de anticuerpos.
- El anticuerpo monoclonal de ratón contra p21, diluído (1:250) en solución de anticuerpos.

- El anticuerpo monoclonal de ratón contra p27, diluído (1:100) en solución de anticuerpos.

Tampón Tris salino (TBS), pH 7,5

Tris-base	20 mM
NaCl	500 mM

Solución de anticuerpos

Lisina	0,1 M
FCS	10 % (v/v)
Azida sódica en PBS	0,02 % (p/v)

Posteriormente, se realizaron varios lavados con TBS que contenía Tween 20 al 0,1% (v/v). Después, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, descrito en el apartado 3.1.3.2., durante 1 hora a temperatura ambiente. La dilución del anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de ratón fue 1:5000 en TBS + Tween 20 al 0,1% (v/v) y la del anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de conejo fue 1:10000 en TBS + Tween 20 al 0,1% (v/v). Ambos anticuerpos secundarios estaban conjugados con peroxidasa. Finalmente, la membrana se incubó durante durante 1 ó 5 minutos, según indicaciones del fabricante, con los sustratos de la peroxidasa presentes en los kits de revelado descritos en el apartado 3.1.3.2. En este momento tiene lugar una reacción de reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de la peroxidasa, a la vez que otro sustrato presente en el revelador se oxida, dando lugar a un compuesto que emite luz. Posteriormente, la membrana se expuso a una película de autorradiografía que detecta la señal quimioluminiscente. La película se reveló, obteniéndose la banda correspondiente a la proteína objeto de estudio. Posteriormente, la película se escaneó y se cuantificaron las bandas mediante el programa de análisis de imagen *Scion Image*.

Para corregir los errores de carga, se detectaron también diferentes proteínas constitutivas como la  $\alpha$ -actinina, la  $\alpha$ -tubulina y la GAPDH. Así, las membranas se

incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón contra la  $\alpha$ -actinina (1:1000), con el anticuerpo monoclonal de ratón contra la  $\alpha$ -tubulina (1:1000), o con el anticuerpo monoclonal de ratón contra la GAPDH (1:2000), todos ellos diluidos en solución de anticuerpos .

### **3.2.5. Determinación de la expresión y localización de proteínas mediante inmunocitoquímica.**

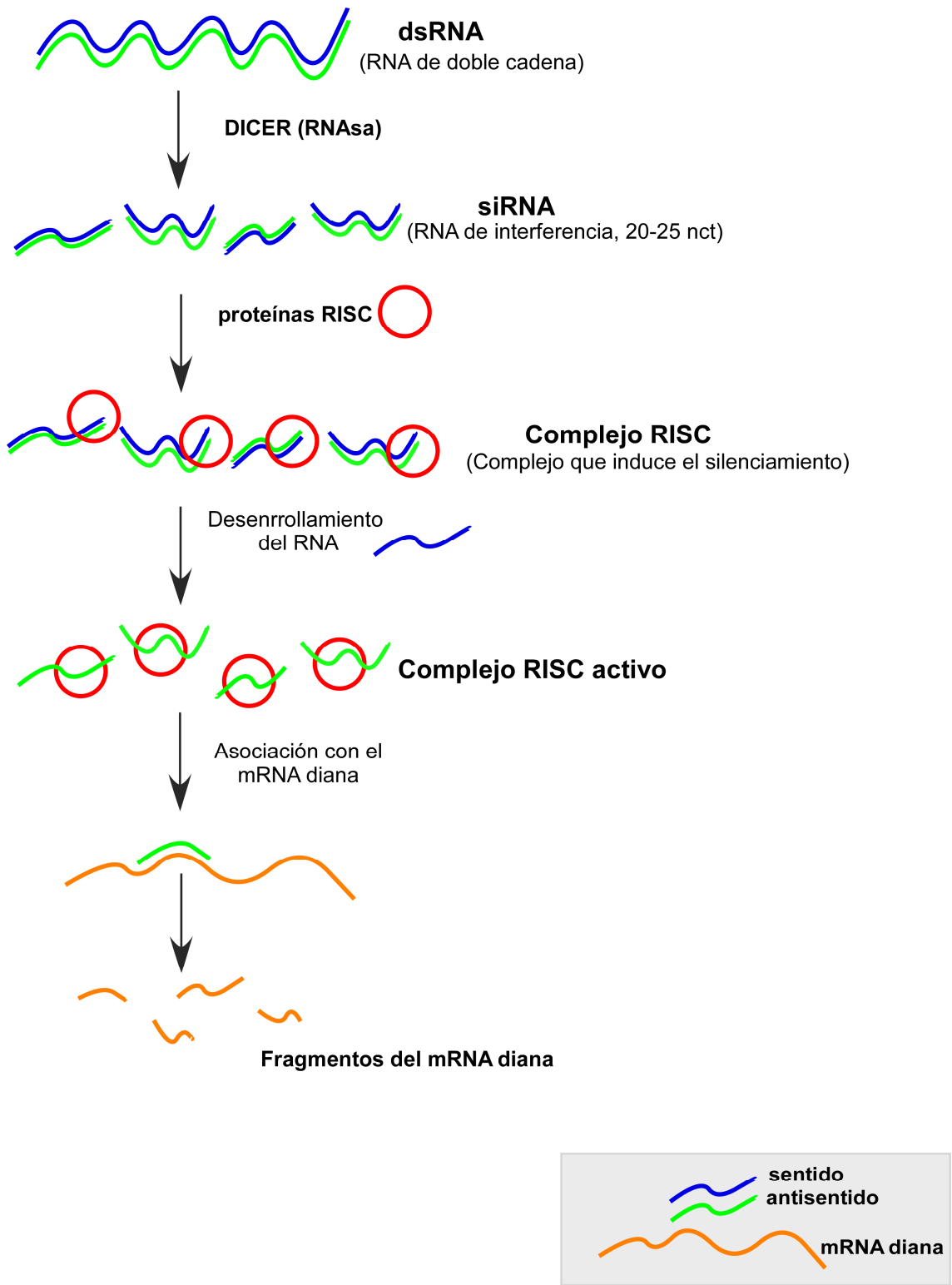
Con el objetivo de determinar la expresión y localización de las diferentes proteínas de interés, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos. Después de varios lavados con PBS, se permeabilizaron con metanol a -20 °C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario, diluido en solución de anticuerpos, + Triton X-100 al 0,1%, durante 12 horas a 4°C con agitación suave. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron varias veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con una molécula fluorescente, diluido en solución de anticuerpos, + Triton X-100 al 0,1%, durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, las células se lavaron varias veces con PBS y se incubaron durante 5 minutos con DAPI 1,25  $\mu$ g/ml, con el objetivo de visualizar los núcleos celulares. Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados con PBS y se montaron las placas con el medio protector de la fluorescencia *SlowFade Gold antifade reagent*. De esta forma, las placas estuvieron preparadas para ser visualizadas con un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.

Para la visualización de la proteína Ki-67 se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ki-67 (1:200). Para la determinación de la proteína p21 se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-p21 (1:100). Para la determinación de la proteína p27 se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-p27 (1:200). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron el anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594 (1:1000) y el anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (1:1000). Para la realización de la doble inmunocitoquímica, se llevó a cabo la fijación de las células con paraformaldehído al 4%, entre la determinación de una proteína y la determinación de la siguiente.

### **3.2.6. Silenciamiento del mRNA de proteínas específicas mediante la técnica del siRNA (*small interfering RNA*).**

El mecanismo del RNA de interferencia (RNAi), que consiste en el bloqueo de la expresión de un gen específico, se ha observado en todos los tipos de células eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos. Se cree que este mecanismo está implicado en la protección del genoma frente a las infecciones víricas, además de jugar un papel en la regulación de la proliferación, muerte y diferenciación celulares e, incluso, en la oncogénesis. Actualmente, el RNAi es una herramienta útil para llevar a cabo el silenciamiento de un gen específico. El mecanismo de actuación del RNAi se representa en el esquema 10. En primer lugar, el RNA de doble cadena (*double stranded RNA*, dsRNA) es digerido por una enzima denominada Dicer, similar a la RNAsa III. Así se obtienen pequeños fragmentos de doble cadena de RNA, de entre 20-25 nucleótidos, denominados siRNA (*small interfering RNA*). Éstos se ensamblan en un complejo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*) que contiene una endorribonucleasa, la cual separa la doble cadena de siRNA. Finalmente, la monocadena de siRNA se une a su cadena complementaria en el mRNA de la célula y el complejo RISC digiere el mRNA diana.

Para llevar a cabo el silenciamiento del mRNA de la conexina 43, se cambió el medio de cultivo por DMEM + FCS 10%, sin antibióticos. Posteriormente, se diluyó el siRNA de la conexina 43 (Cx43-siRNA) o el siRNA sin diana (non target-siRNA, nt-siRNA), ambos a una concentración 2  $\mu$ M, en el medio comercial Optim-MEM<sup>®</sup> y se incubó la mezcla durante 5 minutos. Por otro lado, se diluyó la Lipofectamina 2000<sup>®</sup> en Opti-MEM<sup>®</sup> (0,03  $\mu$ l/ $\mu$ l), incubándose también esta mezcla durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se mezclaron los medios que contenían el siRNA y la Lipofectamina 2000<sup>®</sup> (1:1) y se incubó la mezcla durante 20 minutos. Después de este tiempo, la mezcla se añadió al cultivo de células de glioma (200  $\mu$ l/ml de medio de cultivo). Las células se incubaron a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub> el tiempo necesario hasta ser procesadas para los distintos experimentos. Según recomendaciones del fabricante, es aconsejable, aunque no imprescindible, cambiar el medio de cultivo al cabo de 4-6 horas de la transfección. Este paso se realizó, o no, según los requerimientos de cada experimento.



Esquema 10. Fundamento de la técnica del siRNA.

### **3.2.7. Análisis del mRNA de proteínas específicas mediante RetroTranscripción seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).**

#### **3.2.7.1. Extracción del RNA total.**

Para la extracción del RNA, se utilizó Trizol<sup>®</sup>, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Posteriormente, se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo por volumen de Trizol<sup>®</sup>, se agitaron vigorosamente los tubos durante 15 segundos y se realizó una incubación de 2 minutos a temperatura ambiente, finalizada la cual se centrifugaron las muestras a 4 °C, a 12000 x *g* durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa y se precipitó el RNA por adición de 0,5 volúmenes de alcohol isopropílico por volumen de Trizol<sup>®</sup>. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 4 °C, a 12000 x *g* durante 15 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado de RNA con un volumen de etanol al 75%. A continuación, las muestras se agitaron y se centrifugaron a 4 °C, a 7500 x *g*, durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se esperó hasta la evaporación del etanol. Por último, se redisolvió el precipitado en agua DEPC estéril, incubándolo después a 60 °C durante 10 minutos y añadiéndole, finalmente, un inhibidor de RNAsas. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento.

#### **3.2.7.2. Retrotranscripción.**

En el proceso de retrotranscripción, se sintetiza DNA de doble cadena, al que se denomina cDNA (*complementary DNA*), a partir de RNA monocatenario. En las muestras extraídas según el protocolo descrito en el apartado anterior, se calculó la concentración de RNA presente en las mismas, mediante determinación espectrofotométrica a 260 nm. Se calculó el volumen de muestra que contenía 1 µg de RNA y se añadió agua-DEPC hasta un volumen final de 7 µl. Posteriormente se añadieron a cada tubo 4 µl de *Random Hexamers Primers* (RHP) y se incubaron las muestras, en primer lugar a 70 °C durante 10 minutos y, posteriormente a 4 °C durante 2 minutos. Simultáneamente se preparó, para cada tubo de reacción, la mezcla de reactivos que se especifica a continuación:

- Del kit de retrotranscripción suministrado por la casa Invitrogen se mezclaron 4  $\mu$ l de buffer 5x, 2  $\mu$ l de DTT y 0,66  $\mu$ l de retrotranscriptasa.
- 1  $\mu$ l de una mezcla de dNTPs (10 mM).
- 1  $\mu$ l de inhibidor de RNAsas.
- 0,34  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril.

Después de la incubación de las muestras, se añadieron 9  $\mu$ l de la mezcla anterior a cada tubo y se llevaron al termociclador, donde se sometieron al siguiente protocolo de temperaturas:

- 20 °C durante 10 minutos.
- 42 °C durante 45 minutos.
- 99 °C durante 3 minutos.
- 10 °C durante un tiempo indefinido, hasta su procesamiento.

Finalizado este paso, se añadieron 30  $\mu$ l de agua-DEPC a cada tubo.

### 3.2.7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A partir del cDNA obtenido en el paso anterior, se amplificó el gen de interés en cada caso, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para ello se preparó, por cada tubo, una mezcla de reacción que contenía los siguientes reactivos:

- 1-2  $\mu$ l de cDNA molde.
- 5  $\mu$ l de tampón libre de Mg<sup>2+</sup>.
- 1  $\mu$ l de una mezcla de dNTPs (10 mM).
- 2  $\mu$ l de Cl<sub>2</sub>Mg.
- 2  $\mu$ l de cada oligonucleótido.
- 1  $\mu$ l de DNA polimerasa (de Biotools).
- 35-36  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril.

Una vez preparada la mezcla, los tubos se llevaron al termociclador para amplificar el gen correspondiente. En todos los casos, se llevaron a cabo 40 ciclos, con las siguientes temperaturas y tiempos: *timidina kinasa del virus del herpes simple*

y proteína roja fluorescente (94 °C 45", 55 °C 30", 72 °C 1'30"), *Kir6.1* de rata (94 °C 45", 60,7 °C 45", 72 °C 1'), *Kir6.1* de humano (94 °C 45", 65 °C 30", 72 °C 1' 30"), *Kir6.2* de rata (94 °C 45", 68,7 °C 45", 72 °C 1'), *Kir6.2* de humano (94 °C 45", 62 °C 30", 72 °C 1' 30") *SUR1* de rata (94 °C 45", 63,1 °C 45", 72 °C 1'), y *SUR2* de rata (94 °C 45", 52,55 °C 45", 72 °C 1').

Finalizada la reacción, el producto obtenido se separó en un gel de agarosa al 1-1,5 % (p/v) en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH 8,3), en presencia de bromuro de etidio (1:50000) (v/v) y se visualizó con una lámpara de luz UV.

### **3.2.8. Construcción del plásmido pRFPHSVtk.**

Para la construcción del plásmido bicistrónico, que codificase la timidina kinasa del virus del herpes simple (HSVtk) y la Proteína Roja Fluorescente (RFP), se utilizaron los siguientes métodos.

#### **3.2.8.1. Transformación bacteriana y extracción del DNA plasmídico.**

El medio utilizado para crecer *E. coli*, cepa DH5 $\alpha$ , fue LB (Luria Bertani), que se preparó utilizando 10 g de triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura. Estos compuestos se disolvieron en 900 ml de agua ultrapura, se ajustó el pH a 7,5 y se completó con agua ultrapura hasta 1 litro. En caso de requerir medio sólido, se añadió agar al 1,5 % (p/v).

El proceso de transformación consistió en la mezcla de 100  $\mu$ l de células competentes (cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*) con el DNA (20 ng/ $\mu$ l), con agitación suave. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 4 °C. A continuación, se incubó a 42 °C durante 1 minuto y medio y, de nuevo, a 4 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 500 $\mu$ l de medio LB y se incubó a 37 °C durante 2 horas. Finalmente, se sembraron diferentes cantidades de las células transformadas en placas de medio selectivo (LB con el antibiótico adecuado). Al cabo de 24 horas se recogieron diferentes colonias que crecieron en LB más el antibiótico correspondiente.



Para la extracción del DNA plasmídico, se utilizaron los kit comerciales *UltraClean Mini Plasmid Pred Kit* (MOBIO) o *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.2.8.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación de la secuencia correspondiente a la HSVtk, se utilizó la polimerasa TripleMaster<sup>®</sup> que permite la amplificación con alta fidelidad. Para ello, se llevaron a cabo dos mezclas de reacción:

#### Mezcla 1

- 6 µl H<sub>2</sub>O (incluida en el kit comercial).
- 1 µl de cada oligonucleótido.
- 2 µl de DNA molde.

#### Mezcla 2

- 5 µl de tampón con Mg<sup>2+</sup>.
- 1 µl de dNTPs.
- 0,5 µl de TripleMaster<sup>®</sup>.
- Completar con H<sub>2</sub>O hasta 40 µl.

Una vez preparadas las mezclas, se reunieron en un solo tubo y se llevaron al termociclador, donde se sometieron a 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: 94 °C 20", 58 °C 40", 72 °C 2'.

### 3.2.8.3. Electroforesis y purificación de DNA.

La electroforesis del DNA se llevó a cabo utilizando geles de agarosa al 1-1,5 % (p/v) en tampón TAE, en presencia de bromuro de etidio (1:50000) (v/v). Con la ayuda de una lámpara de luz UV se visualizó y se cortó el fragmento de DNA deseado con un bisturí. El DNA se purificó de la agarosa en una columna (Concert Gel Extraction Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante y se recuperó en H<sub>2</sub>O estéril. Una pequeña alícuota se separó en un gel de agarosa para determinar el contenido y la calidad del DNA, por comparación con un marcador de tamaño de DNA de concentración conocida.

#### **3.2.8.4. Digestión de ácidos nucleicos con enzimas de restricción.**

Para las digestiones del DNA con enzimas de restricción se siguieron las recomendaciones y se utilizaron los tampones proporcionados por la casa comercial. Así, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

- 100-150 ng de DNA.
- 1 U de enzima de restricción.
- 1 µl de tampón.
- 1 µl de albúmina.
- H<sub>2</sub>O ultrapura estéril hasta 10 µl.

La mezcla se incubó a 37 °C, durante toda la noche. A continuación, se purificó el DNA resultante de la digestión, según se indica en el apartado anterior.

#### **3.2.8.5. Ligación de la secuencia de la HSVtk en el vector pIRES2-DsRed2.**

La ligación de la secuencia de la HSVtk en el vector pIRES2-DsRed2 se llevó a cabo utilizando la enzima ligasa T4. Las condiciones de la ligación fueron las siguientes:

- 20-25 ng del inserto HSVtk.
- 100 ng del vector pIRES2-DsRed2.
- 1 µl de ligasa (1 U).
- 1 µl de tampón.
- H<sub>2</sub>O ultrapura estéril hasta 10 µl.

Se mezclaron suavemente y se incubaron a 4 °C durante 12 horas. El producto de la ligación se utilizó para la transformación bacteriana (apartado 3.2.8.1.) y posterior selección de los clones apropiados.

#### **3.2.8.6. Secuenciación de la HSVtk.**

La secuenciación de la HSVtk a partir de la construcción plasmídica pRFPHSVtk, se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca (Edificio Departamental, Salamanca, España). Para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos :

5'-atggcttcgtaccccggc-3'

5'-cggcggtggaatgacaagc-3'

5'-atggcctcctccgagaacg-3'

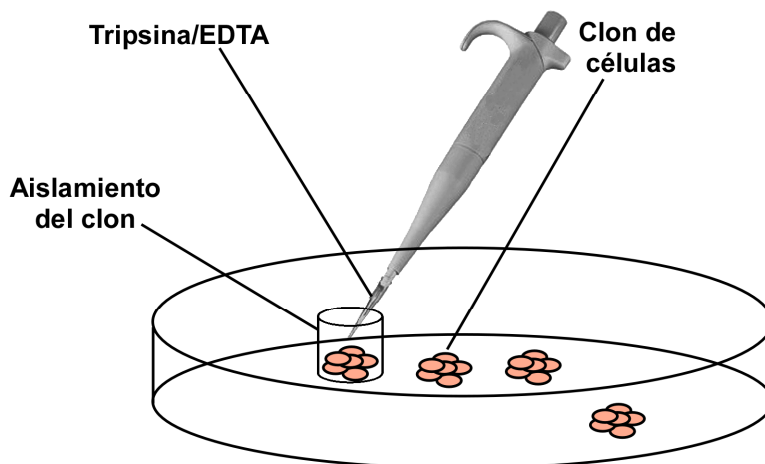
5'-ctacaggaacaggtggtg-3'

### 3.2.9. Transfección de las células de glioma y selección de clones.

La transfección de las células de glioma de rata C6 y de las células de glioma humano U373 con los plásmidos correspondientes, se llevó a cabo utilizando Lipofectamina 2000<sup>®</sup>. El protocolo de transfección fue el suministrado por la casa comercial. Para ello, en primer lugar se cambió el medio de cultivo por DMEM + FCS 10% sin antibióticos. La preparación de los complejos de transfección para cada placa, fue como sigue. Se tomaron 2 µl de DNA plasmídico (10 ng/µl) y se diluyeron en 100 µl de Opti-MEM<sup>®</sup>. Se mezcló suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se diluyeron 3 µl de Lipofectamina 2000<sup>®</sup> en 100 µl de Opti-MEM. Se mezcló suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se mezclaron las soluciones que contenían el DNA plasmídico y la Lipofectamina 2000<sup>®</sup> y la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después del tiempo de incubación, se añadió la mezcla a la placa de células, mezclando bien (200 µl/ml medio). Las células se incubaron a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> y se les cambió el medio a DMEM + FCS 10% + antibióticos, después de 6 horas.

Los plásmidos utilizados poseen un gen de resistencia a geneticina/neomicina, que permite la selección de las células transfectadas. Una vez comprobado que al cabo de 48 horas post-transfección algunas células habían incorporado el plásmido, puesto que emitían fluorescencia, y con el fin de obtener clones de células establemente transfectadas, éstas se sembraron a baja densidad en medio de cultivo que contenía geneticina 0,5 mg/ml. Como control se utilizaron células no transfectadas, a las que también se incubó con medio de cultivo + geneticina 0,5

mg/ml. En el momento en el que las células control murieron debido al tratamiento con geneticina, se procedió al aislamiento de los clones establemente transfectados mediante microtripsinización, tal y como se muestra en el esquema 11.



Esquema 11. Técnica de microtripsinización para la selección de clones.

### 3.2.10. Evaluación de la eficacia de la terapia génica suicida en células de glioma.

#### 3.2.10.1. Determinación de la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT.

El método del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) fue propuesto por Mosmann (Mosmann, 1983) como un método para evaluar los efectos citotóxicos de una sustancia así como para realizar estudios de proliferación celular. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo, que es convertida por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en cristales de formazán de color azul oscuro-violeta. Después de la solubilización de dichos cristales en DMSO, se obtiene un

medio de color violeta cuya mayor o menor absorbancia a 570 nm se relaciona directamente con el número de células vivas presentes en el cultivo.

Para determinar la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico con MTT, se retiró el medio de cultivo y se incubaron las células con 300 µl de PBS que contenía MTT (0,5 mg/ml), durante 75 minutos, en oscuridad, a 37°C, en un incubador de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se aspiró el medio, se añadieron 500 µl de DMSO y se incubaron las células en agitación y en oscuridad durante 10 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 570 nm.

### **3.2.10.2. Evaluación de la toxicidad mediante cuantificación de núcleos.**

Para evaluar la eficacia de la terapia génica suicida mediante cuantificación de núcleos, pasado el tiempo de tratamiento se retiró el medio de cultivo, se realizaron varios lavados con PBS y se incubaron las células con el colorante fluorescente DAPI, 1,25 µg/ml, durante 5 minutos. Este colorante se incorpora al DNA de las células. Pasado este tiempo, se lavaron las células con PBS y se montaron las placas con el medio *SlowFade Gold antifade reagent*. Las placas se visualizaron con la ayuda de un microscopio de fluorescencia tomándose entre 5 y 6 imágenes por placa con la ayuda de una cámara fotográfica acoplada al microscopio. Posteriormente, se cuantificó el número de núcleos por campo para cada condición, utilizando el programa de imagen *Scion Image*.

### **3.2.10.3. Estudio de la apoptosis mediante tinción con anexina-V.**

La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido de membrana que se localiza en las células sanas en la cara citoplasmática de la membrana; sin embargo, en las células apoptóticas la PS se transloca desde el interior hasta el exterior de la membrana, quedando así expuesta al medio extracelular. La anexina-V es capaz de unirse a la PS cuando ésta se localiza en la cara externa de la membrana. Por tanto, cuando la anexina-V está marcada con algún tipo de fluorocromo permite indentificar las células apoptóticas.

En nuestro modelo de terapia génica suicida se empleó anexina-V marcada con el fluorocromo Alexa Fluor 488, que emite fluorescencia en color verde. Así, las

células se lavaron 2 veces con PBS y 1 vez con *Binding Buffer* (*buffer* incluido en el kit comercial, que contiene el  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para la unión anexina-V-PS). Posteriormente, se incubaron con anexina-V-Alexa Fluor 488 diluida en *Binding Buffer* (5:100) durante 15 minutos con agitación suave. Pasado el tiempo de incubación, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con DAPI (1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 5 minutos, para marcar los núcleos celulares. Después se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Se lavaron nuevamente con PBS y se montaron las placas con el medio *SlowFade Gold antifade reagent*. Una vez realizada la tinción, las placas se observaron con un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados, tomándose varias imágenes de cada tratamiento. Finalmente, con la ayuda del programa de imagen *Scion Image*, se cuantificó, en cada caso, el número de células marcadas con anexina-V, frente al total marcadas con DAPI.

#### **3.2.10.4. Estudio de la apoptosis mediante la técnica TUNEL.**

Otro método para el estudio de la apoptosis es la técnica TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotine Nick End Labeling*) que aprovecha una característica morfológica de las células apoptóticas como es la fragmentación de la cromatina. El fundamento de esta técnica (Gavrieli *et al.*, 1992) consiste en la utilización de la enzima “transferasa terminal de deoxinucleótidos” (TdT), que transferirá deoxiuridinatrifosfato (dUTP)-biotinada hasta los extremos 3'-OH de los fragmentos de DNA. Posteriormente, se producirá una reacción con estreptavidina marcada con un fluoróforo que permitirá visualizar, con un microscopio de fluorescencia, las células TUNEL positivas.

El protocolo de TUNEL fue el siguiente: después del tiempo de incubación con los tratamientos correspondientes, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Se hicieron 2 lavados con PBS y se incubaron las placas con etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Se lavaron las placas con PBS y se incubaron con tampón TUNEL (Tris pH 7,2 30 mM, cacodilato de sodio 140 mM, cloruro de cobalto 1mM, Triton X-100 0,3%) durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las células se incubaron con la TdT (800 U/ml) y el dUTP-biotinado (1  $\mu\text{M}$ ), diluidos en tampón TUNEL, durante 1 hora y 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Pasado el tiempo de incubación, se paró la reacción realizando dos lavados, de 10 minutos cada uno, con sodio salino citrato (SSC). Posteriormente, se hicieron dos lavados, de 10 minutos cada uno, con PBS y

otros dos lavados, de 10 minutos cada uno, con tampón fosfato. Después, se incubó con estreptavidina conjugada con cianina 2 (1:500) en tampón fosfato durante 2 horas. Pasado este tiempo, se hicieron 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con tampón fosfato. Se incubó con yoduro de propidio (1,5 µg/ml) durante 10 minutos. Se hicieron 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con tampón fosfato y, finalmente, se montaron las placas con el medio *SlowFade Gold antifade reagent*. Las placas, entonces, se visualizaron con un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados, tomándose varias imágenes por placa. La superposición de las imágenes correspondientes a la tinción con yoduro de propidio (rojo) y a la tinción TUNEL (verde) permite visualizar las células TUNEL positivas en color amarillo.

### **3.2.11. Análisis estadístico de los resultados.**

Los experimentos se realizaron un mínimo de 3 veces en las mismas condiciones experimentales. Se determinó el valor medio de los resultados obtenidos para cada condición así como el error estándar de la media o SEM y se representaron los valores correspondientes a estos dos parámetros estadísticos. El análisis de la significatividad de las diferencias entre las diferentes condiciones o tratamientos estudiados, se llevó a cabo utilizando la prueba conocida como *t* de Student, cuando se realizó la comparación frente a una única condición experimental, o bien el método de análisis de la varianza o ANOVA con el post-test de Bonferroni, cuando se realizó la comparación entre más de dos experimentales.





“Quien utiliza el microscopio aprende a considerar la naturaleza con otros ojos, comprendiendo a la vez el sentido e interconexión de nuestro enorme mundo”.

**Georg Stehli**





#### **4.1. Estudio del efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions*, la expresión de la conexina 43 y la proliferación en las células de glioma.**

Los astrocitos se encuentran ampliamente comunicados a través de canales que atraviesan la membrana, conocidos como uniones comunicantes o *gap junctions*, (véase Introducción) (Binmoeller and Muller, 1992; Mugnaini, 1986; Yamamoto *et al.*, 1990) siendo la conexina 43 la proteína mayoritaria de estos canales. Las *gap junctions* permiten el paso de una célula a otra de iones y moléculas pequeñas, como segundos mensajeros y diferentes metabolitos (Tabernero *et al.*, 1996); para revisión, véase: (Giaume *et al.*, 1997; Kumar and Gilula, 1996; Loewenstein, 1987). Por otro lado, se ha descrito que en los tumores, incluidos los gliomas, la expresión de la conexina 43 y la permeabilidad de las *gap junctions* se encuentra reducida, existiendo una relación inversa entre el grado de malignidad de los tumores y la expresión de la conexina 43 (Huang *et al.*, 1999; Soroceanu *et al.*, 2001). Por tanto, esto sugiere que la pérdida de comunicación intercelular es uno de los procesos implicados en la evolución de los tumores cerebrales malignos (Soroceanu *et al.*, 2001). Algunos autores han descrito la existencia de compuestos que aumentan la permeabilidad de las *gap junctions* y la expresión de la conexina 43. Concretamente, en las células de glioma de rata C6, la tolbutamida y el dibutiril-cAMP (db-cAMP) aumentan la comunicación intercelular y disminuyen la proliferación celular (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). Sin embargo, se desconoce si estos dos mecanismos están relacionados y si este efecto es aplicable a otras células de glioma, independientemente de su grado de malignidad.

Teniendo en cuenta todos estos datos, nuestro objetivo fue determinar la posible relación entre la conexina 43 y el efecto antiproliferativo en las células de glioma de rata C6, así como evaluar el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de la conexina 43, la permeabilidad de las *gap junctions* y la proliferación en diferentes líneas celulares de glioma humano.

##### **4.1.1. Estudio en la línea celular de glioma de rata C6.**

La línea celular de glioma de rata C6 se obtuvo en ratas Wistar debido a los efectos producidos por la administración transplacentaria de N-nitrosourea (NNU). El

tumor se clonó posteriormente para la obtención de una línea estable (comercializada por la casa *American Type Cultured Collection*, ATCC, nº CCL107). Es una línea celular ampliamente utilizada *in vivo e in vitro*, aunque su mayor inconveniente radica en su alta inmunogenicidad (Trojan *et al.*, 1993).

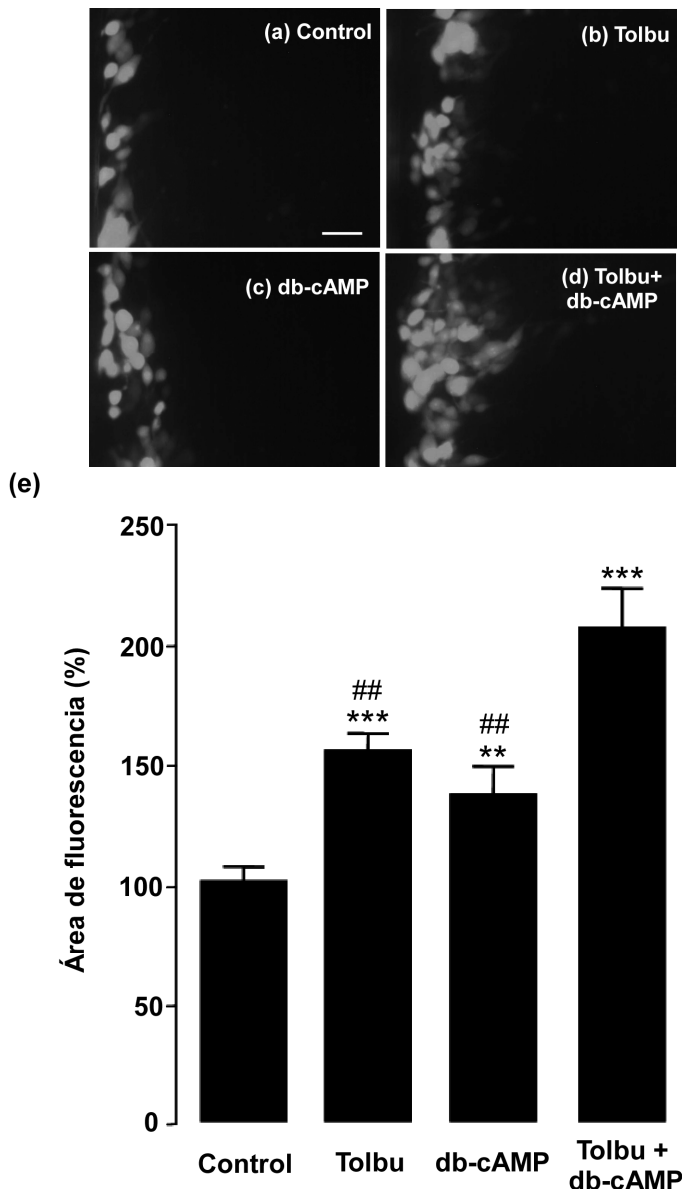
Como se ha descrito previamente, en las células de glioma de rata C6 la tolbutamida y el db-cAMP promueven el aumento de la comunicación intercelular y la disminución de la proliferación celular (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). En este trabajo se decidió investigar la posible relación entre ambos efectos.

#### **4.1.1.1. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* y sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6.**

Para evaluar el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en las células de glioma de rata C6, una vez que el cultivo celular alcanzó la confluencia, se incubaron las células en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, de db-cAMP 1mM, o de tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1mM, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se empleó la técnica conocida como *scrape loading* para evaluar la permeabilidad. Posteriormente, las células se observaron en un microscopio de fluorescencia provisto de filtros adecuados. Las imágenes se captaron empleando una cámara digital acoplada al microscopio y se cuantificó el área fluorescente utilizando el programa de análisis *SCION Image*.

La figura 1a muestra la permeabilidad que presentan las células de glioma de rata C6 en la situación control, es decir, en ausencia de tratamiento. Como se puede observar, esta permeabilidad es baja puesto que, prácticamente, está restringida a la primera fila de células. Por el contrario, cuando las células de glioma C6 se trataron con tolbutamida la comunicación intercelular a través de las *gap junctions* aumentó, como se puede observar en la figura 1b, donde el amarillo de Lucifer difunde más allá de la primera fila de células. En el caso del tratamiento con db-cAMP (figura 1c), se observó también un aumento de la comunicación intercelular que resultó ser muy similar al promovido por la tolbutamida. De hecho, si se observa la figura 1e, en la que se muestra la cuantificación de las imágenes, se comprueba que el aumento de la permeabilidad promovido por la tolbutamida estuvo en torno al 50 % con respecto a la

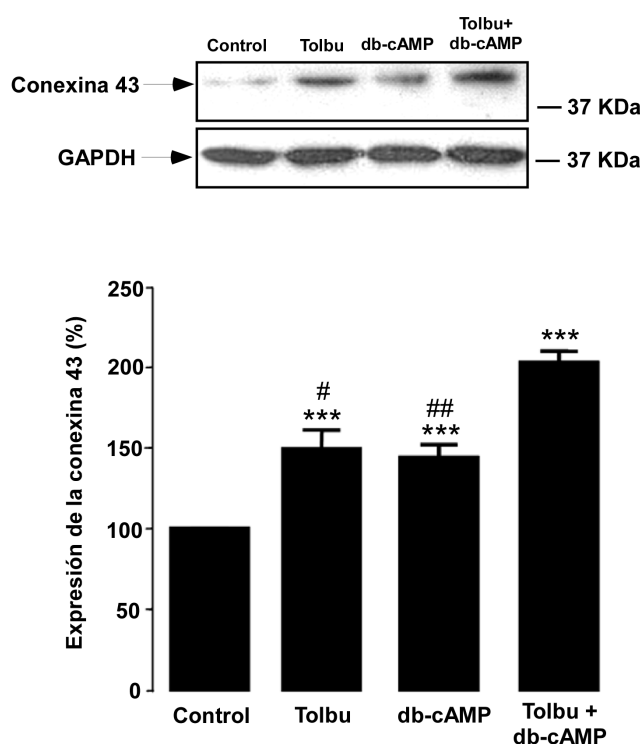
situación control, mientras que en el caso del db-cAMP ese aumento fue de un 40 %, aproximadamente. Por otro lado, cuando las células de glioma de rata C6 se trataron con la mezcla de ambos compuestos, el aumento de la comunicación intercelular fue aditivo (figuras 1d y 1e). Así, en la figura 1e se observa que este tratamiento promovió un aumento de la permeabilidad del 100 % con respecto a la situación control y de, aproximadamente, un 50 % con respecto al tratamiento con tolbutamida o con db-cAMP por separado.



**Figura 1. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma de rata C6.**

Las células de glioma de rata C6 se incubaron en ausencia (control) (a) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M (b), de dibutiril-cAMP (db-cAMP) 1mM (c) o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM (d), durante 24 horas. La permeabilidad de las *gap junctions* se determinó mediante la técnica de *scrape loading*. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. (e) El área de fluorescencia se cuantificó utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$  y \*\*  $p \leq 0,01$ , y respecto a tolbu + db-cAMP como ##  $p \leq 0,01$  (test *t* de Student). Barra de calibrado=50  $\mu$ m.

Para evaluar el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en las células de glioma C6, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, de db-cAMP 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la conexina 43 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. En la figura 2 se puede observar que, tanto el tratamiento con tolbutamida como el tratamiento con db-cAMP promovieron un aumento en la expresión de la conexina 43. La cuantificación de estos resultados indicó que ambos agentes promovieron un aumento similar de, aproximadamente, un 50%. Cuando la tolbutamida y el db-cAMP estuvieron presentes conjuntamente, el efecto sobre la expresión de la proteína fue aditivo siendo, aproximadamente, un 50 % superior al efecto de la tolbutamida o del db-cAMP por separado.



**Figura 2. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6.**

Las células de glioma de rata C6 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la conexina 43 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$  y respecto a tolbu + db-cAMP como ##  $p \leq 0,01$  y #  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).

#### 4.1.1.2. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 en células de glioma de rata C6.

La conexina 43 ha sido descrita como una proteína supresora de tumores puesto que, en las células tumorales, la expresión de este gen y, por lo tanto, el establecimiento de la comunicación intercelular, trae como consecuencia una disminución de la velocidad de proliferación y la desaparición del fenotipo neoplásico (para revisión, ver: (Naus, 2002; Yamasaki, 1990; Yamasaki *et al.*, 1999)). Tanto la tolbutamida como el db-cAMP promueven un aumento de la expresión de la conexina 43 (apartado 4.1.1.1.) y, en este sentido, Sánchez-Álvarez y col. describieron el efecto antiproliferativo de ambas sustancias mediante estudios de citometría de flujo e incorporación de BrdU (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). Según trabajos de nuestro laboratorio, se observó mediante estudios de *Western blot*, que la tolbutamida y el db-cAMP promovían cambios en la expresión de proteínas relacionadas con la proliferación celular en células de glioma de rata C6. De esta forma, se observó que la tolbutamida y el db-cAMP promovían el aumento en la expresión de las proteínas p21 y p27, a la vez que disminuían la expresión de Ki-67 (Sanchez-Alvarez *et al.*, 2006). Por otro lado, se desconocía si los efectos promovidos sobre la expresión de estas proteínas tenían lugar en una misma célula. Por todo ello, en este trabajo se decidió estudiar el efecto que tenían la tolbutamida y el db-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 en las células de glioma de rata C6, mediante estudios de inmunocitoquímica.

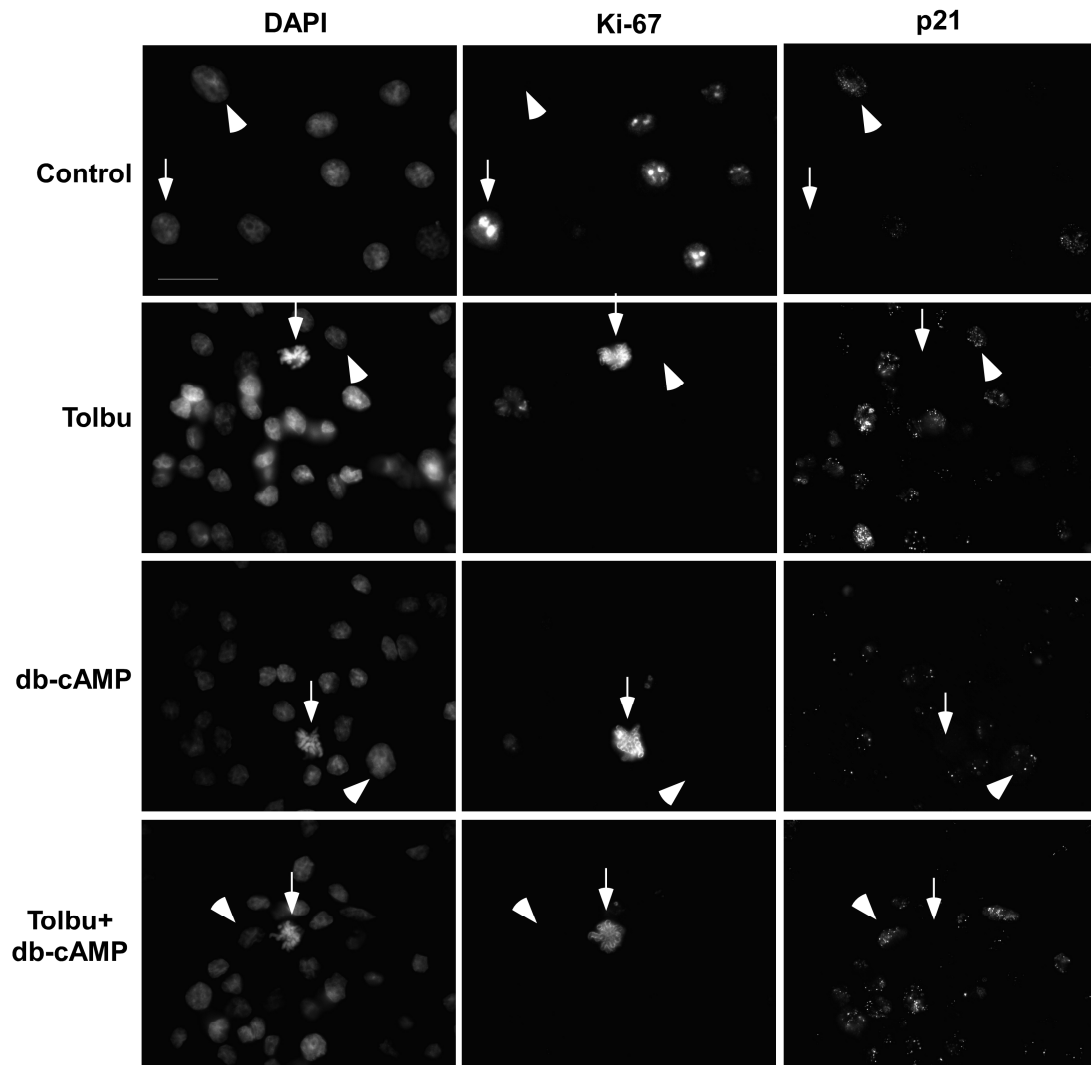
Gerdes *et al.* describieron por primera vez en 1983 la producción de un anticuerpo monoclonal, al que denominaron Ki-67, que reaccionaba con un antígeno nuclear presente en las células en estado proliferativo pero ausente en las células quiescentes (Gerdes *et al.*, 1983). Desde entonces, diversos estudios realizados en astrocitomas han utilizado el marcaje con Ki-67 como una de las herramientas para estudiar las características proliferativas de los mismos. En este sentido, Johannessen y col. analizaron un amplio número de estos trabajos y realizaron un estudio para evaluar el valor clínico de la determinación de Ki-67 en los astrocitomas (Johannessen and Torp, 2006). La principal conclusión de este trabajo es que, aunque Ki-67 no puede ser usado de forma independiente como marcador de diagnóstico, existe una clara correlación entre los niveles de expresión de Ki-67 y la malignidad de los astrocitomas.

Por otro lado, como ya se indicó en el apartado 1.1.2.1. de la Introducción, la proteína p21 actúa como un inhibidor de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs), siendo, por lo tanto, una proteína inhibidora del ciclo celular.

Para determinar la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 en las células de glioma de rata C6, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, de db-cAMP 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La determinación de la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 se realizó mediante doble inmunocitoquímica, tal y como se describe en Material y Métodos.

La figura 3 muestra imágenes, correspondientes a un mismo campo celular, de las células no tratadas (control) o incubadas con los diferentes tratamientos. Las células se tiñeron con el colorante fluorescente DAPI (que tiñe la totalidad de los núcleos celulares) y con los anticuerpos correspondientes contra Ki-67 y p21 que se especifican en la sección Material y Métodos. Como se puede observar, las células de glioma C6 no tratadas (control) son, en su mayoría, positivas para Ki-67, mientras que, por el contrario, el número de células positivas para p21, con respecto al número total de células, es muy bajo. Cuando las células se trataron con tolbutamida o con db-cAMP, el número de células positivas para Ki-67 se redujo de forma importante, a la vez que aumentó el número de células positivas para p21. Además, es importante destacar la relación inversa existente entre la expresión de ambas proteínas puesto que, como se puede observar, la mayoría de las células positivas para Ki-67 (ejemplos señalados con flechas) resultaron ser negativas para p21 (ejemplos señalados con cabezas de flecha) y viceversa. En el caso de las células tratadas con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP, el número de células positivas para Ki-67, con respecto al número total de células, resultó ser aún más bajo que en los tratamientos individuales, mientras que el número de células positivas para p21 fue superior al encontrado en las células tratadas con tolbutamida o con db-cAMP por separado.





**Figura 3. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 en células de glioma de rata C6.**

Las células de glioma de rata C6 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1mM o de tolbutamida 400 $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de las proteínas Ki-67 y p21 se determinó mediante doble inmunocitoquímica tal y como se describe en Material y Métodos. Las células que expresan Ki-67 son negativas para p21 (se indica, con una flecha, un ejemplo para cada condición). Las células que expresan p21 son negativas para Ki-67 (se indica, con una cabeza de flecha, un ejemplo para cada condición). El DNA se tiñó con DAPI como control del número total de células por campo. Barra=20  $\mu$ m.

#### **4.1.1.3. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 en células de glioma de rata C6 que poseen la conexina 43 silenciada.**

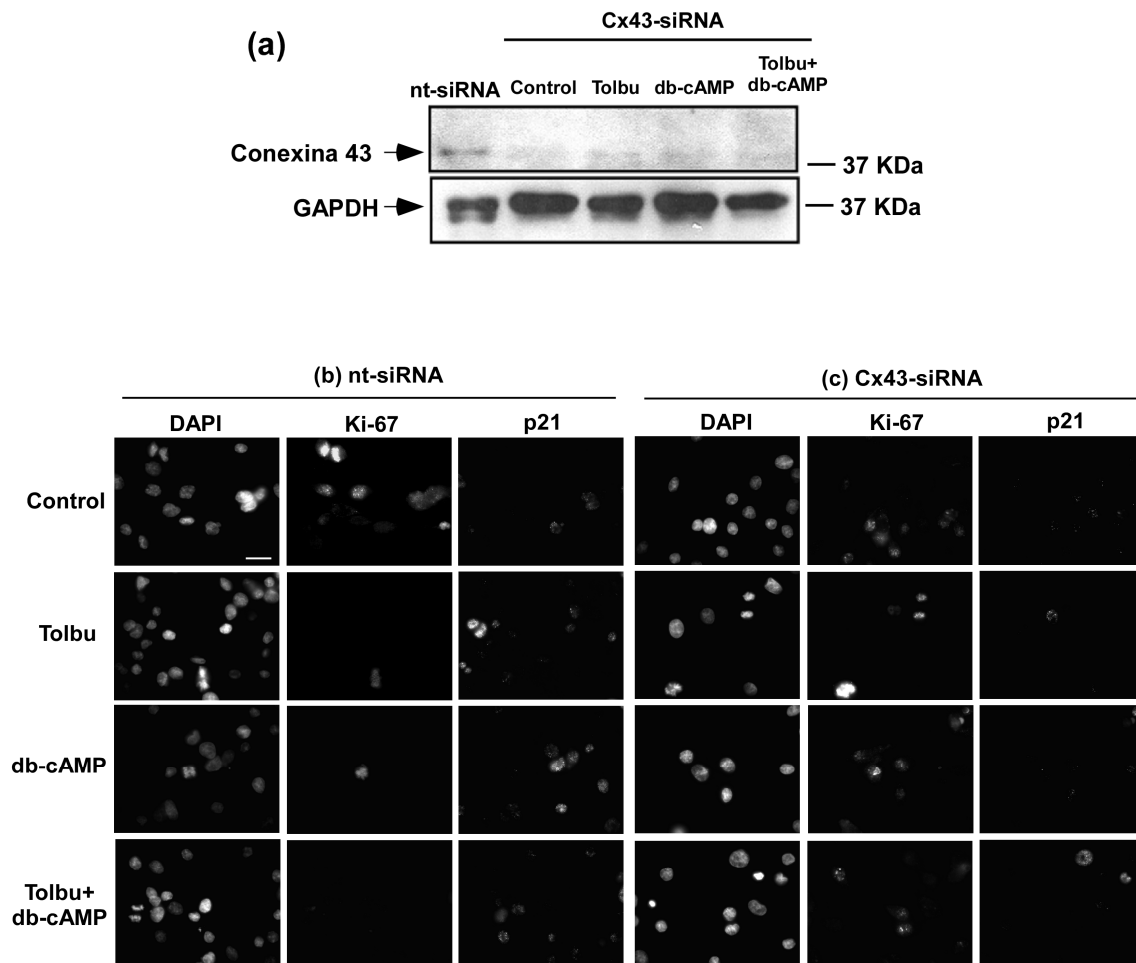
Una vez constatado que tanto la tolbutamida como el db-cAMP aumentan la expresión de la conexina 43 (apartado 4.1.1.1.) y, por otro lado, disminuyen la expresión de la proteína Ki-67 y aumentan la expresión de p21 (apartado 4.1.1.2), el siguiente objetivo fue estudiar si los efectos ejercidos sobre la expresión de estas dos últimas proteínas, relacionadas con el ciclo celular, estaban mediados por la conexina 43.

Para ello, las células de glioma de rata C6 se transfectaron con el siRNA contra la conexina 43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (nt-siRNA), tal y como se describe en Material y Métodos. Pasadas 24 horas, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, de db-cAMP 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 mediante doble inmunocitoquímica, utilizando la tinción con DAPI como control del número total de células.

En la figura 4a, se muestra el resultado del silenciamiento de la conexina 43 determinado mediante *Western blot*. Como se puede apreciar, las células transfectadas con el Cx43-siRNA presentaron un nivel de expresión de la conexina 43 muy bajo con respecto a las células transfectadas con el nt-siRNA. Además, en las células transfectadas con el Cx43-siRNA, ni la tolbutamida, ni el db-cAMP, ni la mezcla de ambos promovieron el aumento de la expresión de la conexina 43 con respecto a las células no tratadas (control).

En la figura 4b se observan las imágenes correspondientes a los diferentes tratamientos y tinciones realizados en las células de glioma de rata C6 transfectadas con el nt-siRNA. Como se puede apreciar, los resultados son muy similares a los representados en la figura 3, es decir, que a la vez que el tratamiento con tolbutamida, con db-cAMP o con la mezcla de ambos agentes promovió la disminución en la expresión de Ki-67, aumentó la expresión de p21. Por otro lado, en la figura 4c se observa que estos efectos no tuvieron lugar cuando las células de glioma de rata C6

se silenciaron con el Cx43-siRNA. Así, se puede apreciar que, con ninguno de los tratamientos utilizados se redujo la expresión de Ki-67 ni aumentó la expresión de p21 con respecto a la situación control.



**Figura 4. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67 y p21 en células de glioma de rata C6 que poseen la conexina 43 silenciada.**

Las células de glioma de rata C6 fueron transfectadas con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA contra la conexina 43 (Cx43-siRNA) tal y como se describe en Material y Métodos. Posteriormente, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. (a) *Western blot* de la conexina 43 utilizando la GAPDH como control de carga. (b) Inmunocitoquímica de células transfectadas con el nt-siRNA. Las fotomicrografías muestran la tinción con DAPI, Ki-67 y p21 en un mismo campo celular después de los tratamientos indicados. (c) Inmunocitoquímica de células transfectadas con el Cx43-siRNA. Las fotomicrografías muestran la tinción con DAPI, Ki-67 y p21 en un mismo campo después de los tratamientos indicados. Barra= 20  $\mu$ M.

#### **4.1.2. Estudio en las líneas celulares de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138.**

En los experimentos presentados en este capítulo, se utilizaron cuatro líneas celulares de glioma humano con diferentes grados de malignidad.

La línea celular de glioma humano T98-G es comercializada por la casa *American Type Culture Collection (ATCC)* y está clasificada como glioblastoma multiforme, es decir, grado IV. La línea celular de glioma humano U373 MG (U373) fue una donación del Prof. Dr. Fernando Valdivieso, del Instituto de Biología Molecular Severo Ochoa de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta línea celular está clasificada como astrocitoma-glioblastoma (grado III). La línea celular de glioma humano SW 1088 (HTB12) es comercializada por la casa ATCC y está clasificada como astrocitoma (grado III). Finalmente, se utilizó la línea celular de glioma humano Hs 683 (HTB138), también adquirida en la casa ATCC. Según los datos cedidos por la casa comercial, no se especifica el grado de malignidad, pero sí que esta línea no resulta tumorigénica en ratones inmunodeprimidos aunque sí lo es en medio semisólido. Existen referencias bibliográficas que especifican que se trata de un glioma de bajo grado (grado II) (Konduri *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2001).

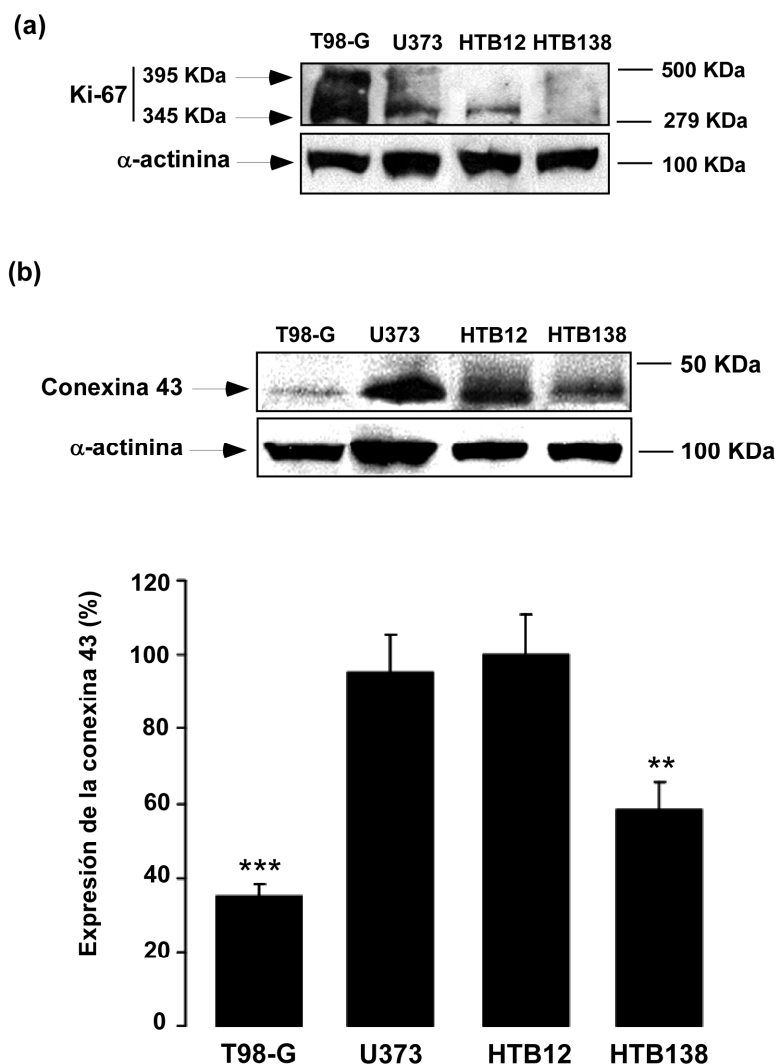
##### **4.1.2.1. Niveles de expresión de Ki-67 y de la conexina 43 en las líneas celulares de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138.**

Puesto que, como se ha explicado previamente, la determinación de Ki-67 da una idea del estado proliferativo de las células (Gerdes *et al.*, 1983) y, puesto que se ha descrito la relación inversa existente entre la expresión de la conexina 43 y la malignidad de los tumores (Huang *et al.*, 1999; Soroceanu *et al.*, 2001), nos propusimos estudiar, en primer lugar, los niveles de expresión de estas dos proteínas en las líneas de glioma humano anteriormente mencionadas.

Para ello, se extrajeron las proteínas de las células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138, y se llevó a cabo la determinación de las proteínas Ki-67 y conexina 43 mediante *Western blot*.

En la figura 5a se muestra la expresión de Ki-67 en las diferentes líneas de glioma humano. Como se puede apreciar la detección de la proteína Ki-67 mediante *Western blot* dio lugar a dos bandas que se corresponden con pesos moleculares de 395 y 345 KDa, respectivamente (Gerdes *et al.*, 1991). De esta forma, se observa que el mayor nivel de expresión de Ki-67 correspondió a las células de glioma humano T98-G seguidas por las U373 y, posteriormente, por las HTB12. Además, se puede comprobar que, en las células de glioma humano HTB138, la expresión de Ki-67, en nuestras condiciones experimentales, resultó indetectable.

Por otro lado, en la figura 5b se muestra la expresión de la conexina 43 en las cuatro líneas de glioma humano anteriormente mencionadas. La línea HTB12 resultó ser, junto con la línea U373, la que mayor expresión de conexina 43 presentó, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas. Por su parte, en la línea de glioma humano T98-G, la expresión de la conexina 43 resultó ser más de un 60 % inferior que en la línea HTB12, mientras que en las células de glioma humano HTB138 esta expresión también fue inferior, aunque en menor proporción, en torno al 40 %.

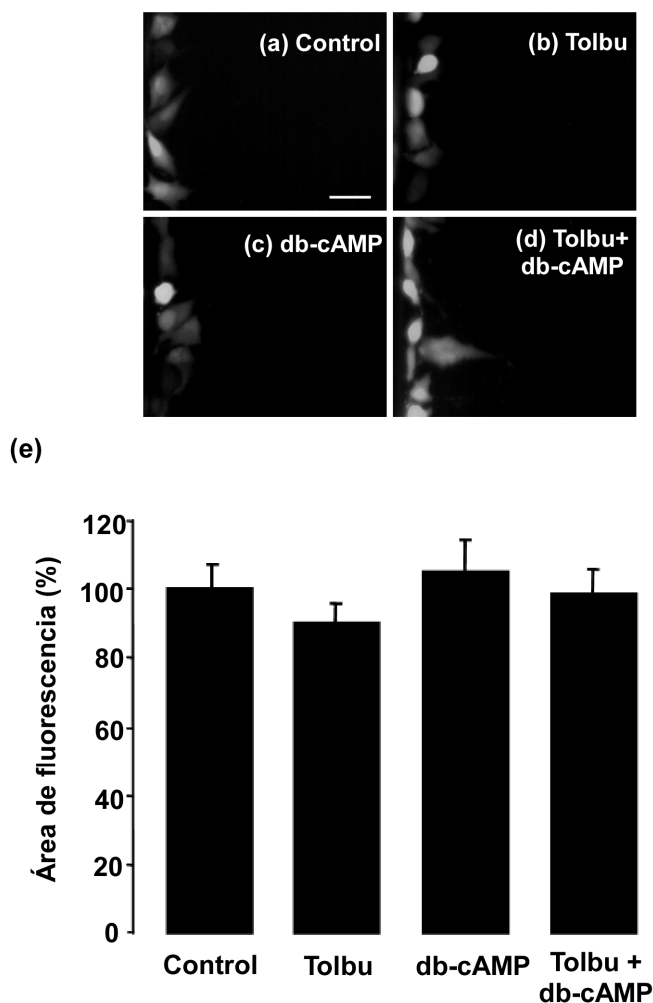


**Figura 5. Niveles de expresión de la proteína Ki-67 y de la conexina 43 en las líneas celulares de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138.**

Las proteínas de las células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138 se extrajeron tal y como se describe en Material y Métodos. La expresión de las proteínas Ki-67 y conexina 43 se llevó a cabo mediante análisis de transferencia tipo *Western*. **(a)** *Western blot* de Ki-67 utilizando la  $\alpha$ -actinina como control de carga. **(b)** *Western blot* de conexina 43 utilizando la  $\alpha$ -actinina como control de carga. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto a la línea celular de glioma humano HTB12 y son medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto a la línea celular HTB12 se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$  y \*\*  $p \leq 0,01$  (test *t* de Student).

#### 4.1.2.2. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* y sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138.

Para evaluar los efectos de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138, una vez que los cultivos celulares alcanzaron la confluencia, se incubaron las células en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, de db-cAMP 1mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1mM, durante 24 horas. Pasado este tiempo se empleó la técnica conocida como *scrape loading*.



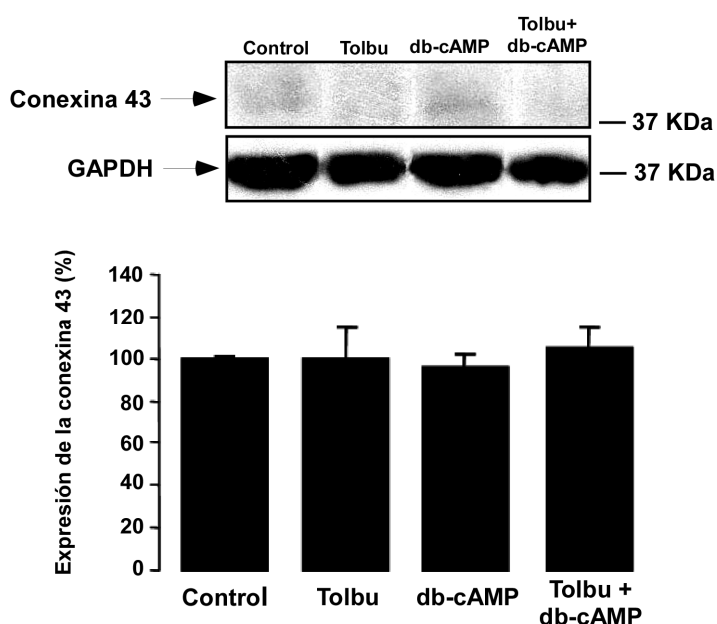
**Figura 6. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano T98-G.**

Las células de glioma humano T98-G se incubaron en ausencia (control) (a) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M (b), de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1mM (c) o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM (d), durante 24 horas. La permeabilidad de las *gap junctions* se determinó mediante la técnica de *scrape loading*, tal y como se describe en Material y Métodos. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra de calibrado=40  $\mu$ m. (e) El área de fluorescencia se cuantificó utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=3).

La figura 6 muestra los resultados del efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano T98-G.

Como se puede observar en la figura 6a, en la situación control, es decir, en ausencia de tratamiento, el amarillo de Lucifer no consiguió difundir más allá de la primera fila de células, lo cual indica que las células de glioma humano T98-G presentan un nivel de comunicación intercelular a través de las *gap junctions* muy bajo o prácticamente nulo. Por otro lado, cuando estas células se trataron con tolbutamida (figura 6b), con db-cAMP (figura 6c) o con la mezcla de ambos (figura 6d), la permeabilidad no se modificó con respecto a la situación control. La figura 6e representa los resultados promediados de la cuantificación del área de fluorescencia para cada condición. De esta forma se corrobora que, efectivamente, ninguno de los tratamientos ensayados consiguió modificar de forma significativa la permeabilidad de las *gap junctions* en las células de glioma humano T98-G.

La figura 7, muestra los resultados del efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma humano T98-G. Como se puede observar, los niveles de expresión de la conexina 43 en ausencia de tratamiento (control) son muy bajos en estas células. Además, ni el tratamiento con tolbutamida, ni con db-cAMP, ni con la mezcla de ambos compuestos, modificó el nivel de expresión de la conexina 43.

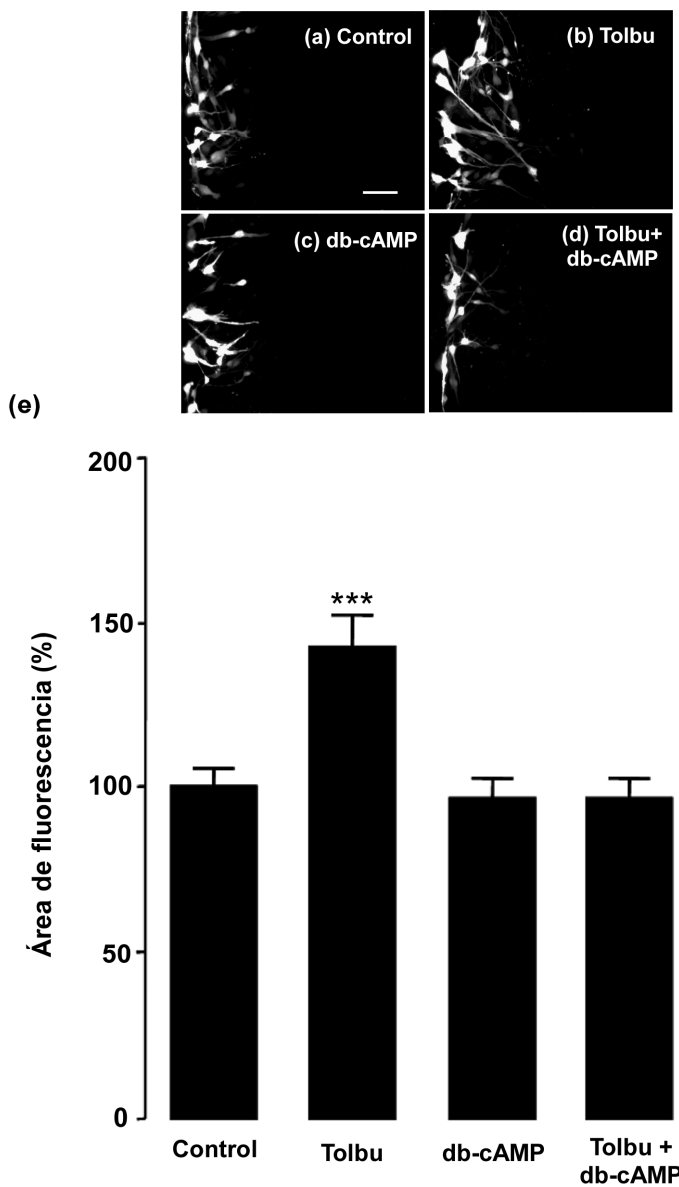


**Figura 7. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma humano T98-G.**

Las células de glioma humano T98-G se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la conexina 43 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=3).



La figura 8 muestra los resultados del efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano U373. La figura 8a muestra la permeabilidad de estas células en ausencia de tratamiento (control). Como se puede apreciar, esta permeabilidad, a pesar de no ser demasiado elevada, superó la primera línea de células, a juzgar por la difusión del amarillo de Lucifer.

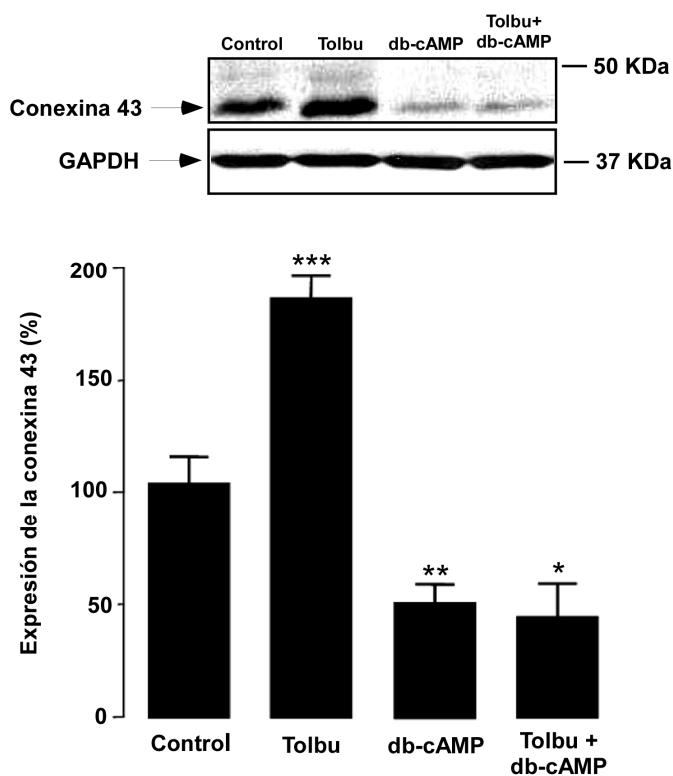


**Figura 8. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano U373.**

Las células de glioma humano U373 se incubaron en ausencia (control) (a) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M (b), de dibutiril-cAMP (db-cAMP) 1 mM (c) o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM (d), durante 24 horas. La permeabilidad de las *gap junctions* se determinó mediante la técnica de *scrape loading*. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra de calibrado=50  $\mu$ m. (e) El área de fluorescencia se cuantificó utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p < 0,001$  (test *t* de Student).

Cuando las células de glioma humano U373 se trataron con tolbutamida, la permeabilidad aumentó, como se puede observar en la figura 8b. Por otro lado, ni el tratamiento con db-cAMP (figura 8c), ni el tratamiento con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP (figura 8d) promovieron modificaciones en la permeabilidad de las *gap junctions*. En la figura 8e se observa que el área de fluorescencia, correspondiente a la difusión del amarillo de Lucifer, en el caso de los tratamientos con db-cAMP o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP, fue similar al área de fluorescencia correspondiente a la situación control. Sin embargo, el tratamiento con tolbutamida, promovió un aumento en el área de fluorescencia y, por lo tanto, en la permeabilidad de las *gap junctions*, próximo al 50 % con respecto a la situación control.

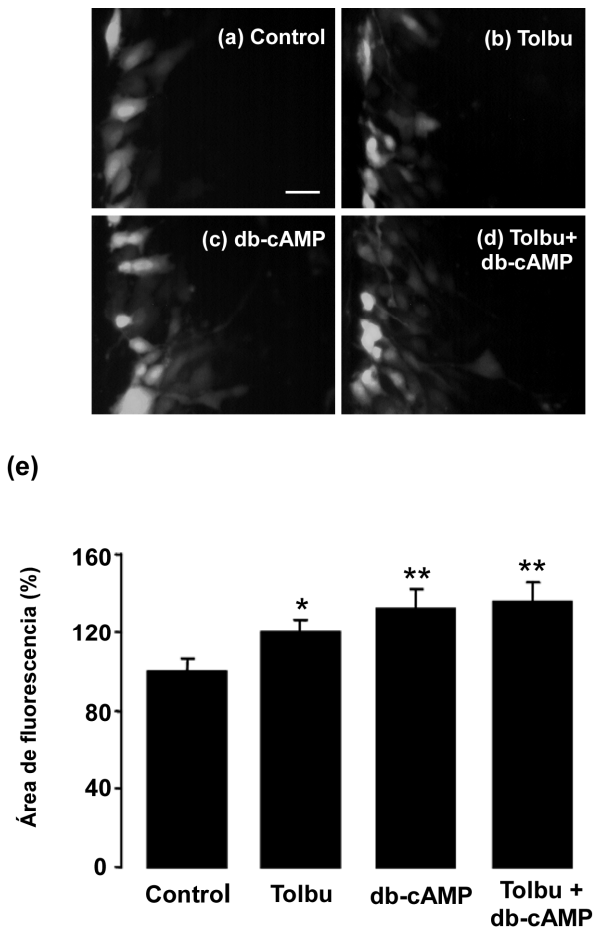
La figura 9 muestra los resultados del efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en las células de glioma humano U373. Como se puede observar, la tolbutamida promovió un aumento en la expresión de la conexina 43 en torno al 80 % con respecto a la ausencia de tratamiento (control). Por otro lado, el tratamiento con db-cAMP o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP, dio lugar a una reducción significativa de la expresión de la conexina 43 con respecto a la situación control, siendo dicha reducción de un 50 %, aproximadamente, en ambos casos.



**Figura 9. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma humano U373.**

Las células de glioma humano U373 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutiril-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la conexina 43 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).

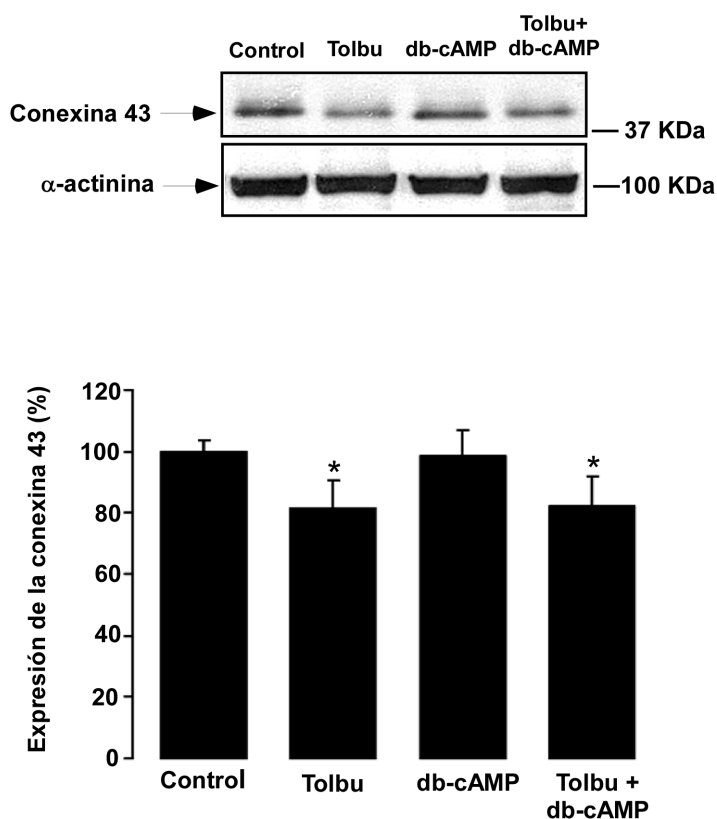
La figura 10 muestra los resultados del efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en las células de glioma humano HTB12. Como se puede observar en la figura 10a, la permeabilidad de estas células en la situación control, es decir, en ausencia de tratamiento, es baja puesto que, prácticamente, está restringida a la primera línea de células. Cuando las células de glioma humano HTB12 se trataron con tolbutamida (figura 10b), con db-cAMP (figura 10c) o con la mezcla de ambas sustancias (figura 10d), la comunicación intercelular aumentó, puesto que el amarillo de Lucifer difundió hasta llegar a más líneas de células que en la situación control. De hecho, la cuantificación de estos resultados (figura 10e) indica que el tratamiento con tolbutamida promovió un aumento de la permeabilidad de un 20 %, aproximadamente, mientras que el tratamiento con db-cAMP o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP aumentó la permeabilidad en un 30 %.



**Figura 10. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano HTB12.**

Las células de glioma humano HTB12 se incubaron en ausencia (control) (a) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M (b), de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM (c) o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM (d), durante 24 horas. La permeabilidad de las *gap junctions* se determinó mediante la técnica de *scrape loading*. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra de calibrado=50  $\mu$ m. (e) El área de fluorescencia se cuantificó utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).

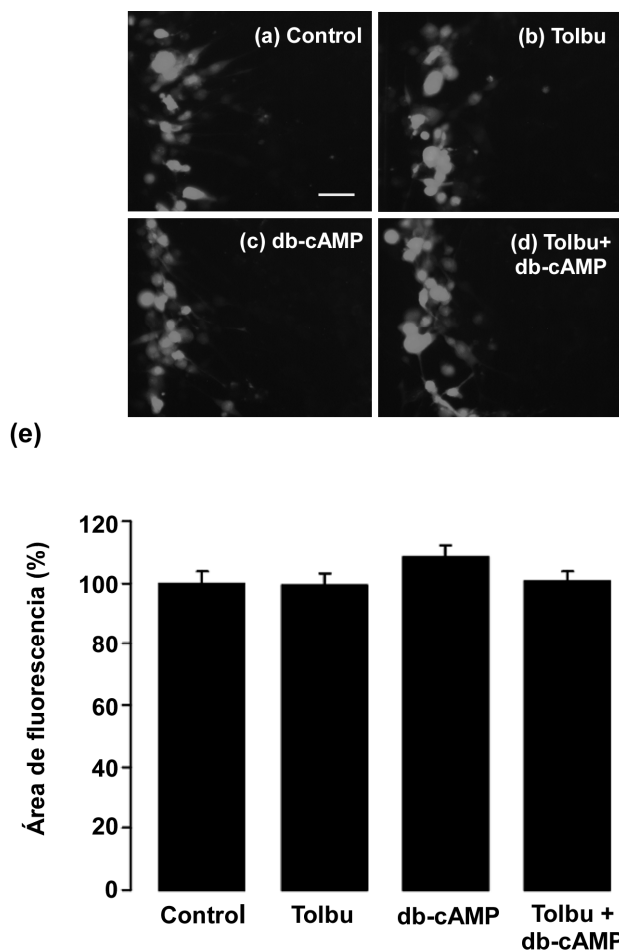
Por otro lado, en la figura 11 se puede observar que, en las células de glioma humano HTB12, el tratamiento con tolbutamida o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP promovió una disminución en la expresión de la conexina 43 de un 20 %, aproximadamente, mientras que, el tratamiento único con db-cAMP, no modificó la expresión de la conexina 43.



**Figura 11. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma humano HTB12.**

Las células de glioma humano HTB12 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la conexina 43 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).

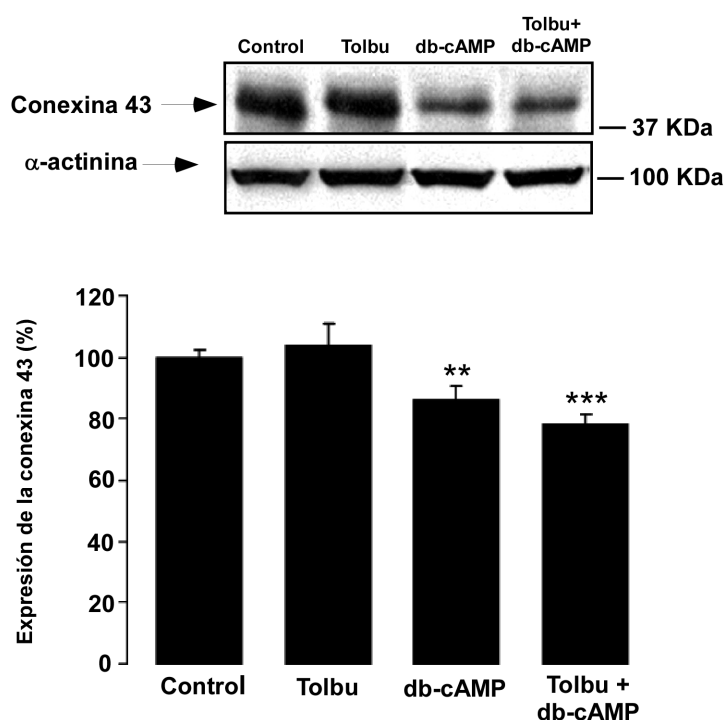
La figura 12 representa el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano HTB138. En la figura 12a se puede apreciar que la difusión del amarillo de Lucifer en estas células se extiende más allá de la primera línea de células. Por otro lado, el tratamiento de las células de glioma humano HTB138 con tolbutamida (figura 12b), con db-cAMP (figura 12c) o con la mezcla de ambos (figura 12d), no modificó la difusión del amarillo de Lucifer. La figura 12e recoge la cuantificación de los resultados y en ella se observa que el porcentaje correspondiente al área de fluorescencia dada por la difusión del amarillo de Lucifer es, prácticamente, el mismo en todas las situaciones.



**Figura 12. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano HTB138.**

Las células de glioma humano HTB138 se incubaron en ausencia (control) (a) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M (b), de dibutiril-cAMP (db-cAMP) 1 mM (c) o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM (d), durante 24 horas. La permeabilidad de las *gap junctions* se determinó mediante la técnica de *scrape loading*. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio de fluorescencia. Barra de calibrado=50  $\mu$ m. (e) El área de fluorescencia se cuantificó utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=3).

En la figura 13 se representa el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma humano HTB138. Como se puede apreciar, el nivel de expresión de la conexina 43 en estas células es muy similar en la situación control (ausencia de tratamiento) y en presencia de tolbutamida. Por otro lado, el tratamiento de estas células con db-cAMP o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP promovió una disminución en la expresión de la conexina 43 que, en el primer caso, es de un 15 % aproximadamente y, en el segundo, ligeramente superior al 20 %.



**Figura 13. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma humano HTB138.**

Las células de glioma humano HTB138 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutiril-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la conexina 43 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*, tal y como se describe en Material y Métodos. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$  y \*\*  $p \leq 0,01$  (test *t* de Student).

#### 4.1.2.3. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27 en células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138.

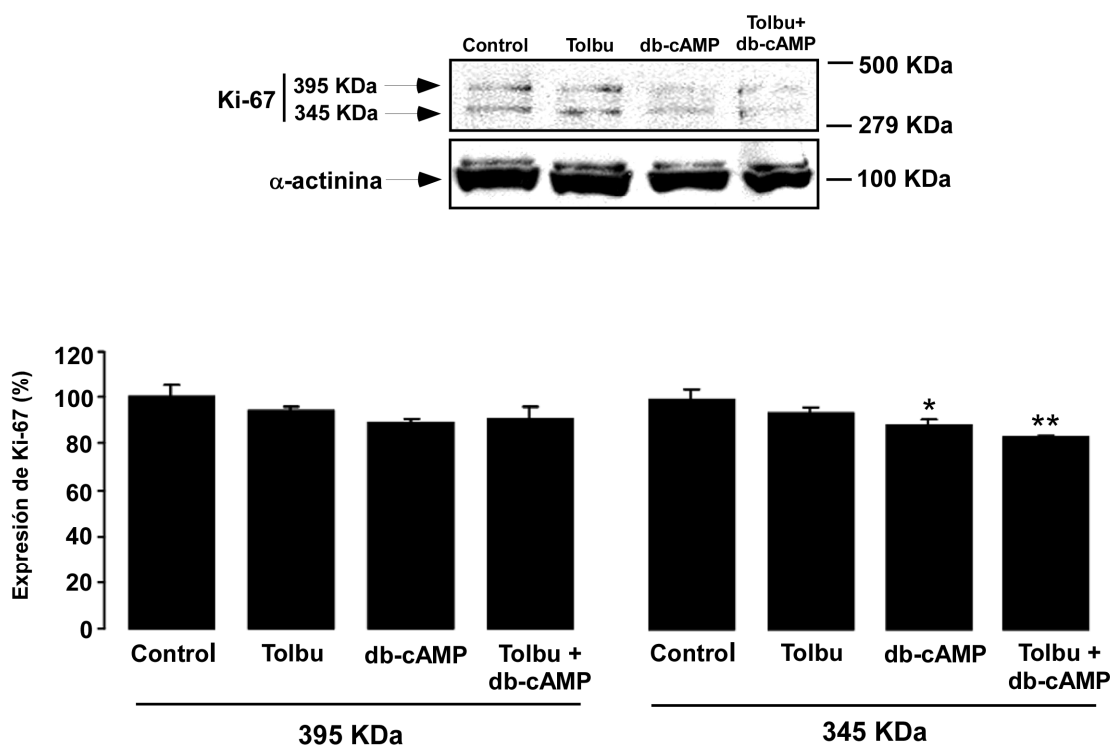
En el apartado anterior se han expuesto los efectos de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la permeabilidad de las *gap junctions* y sobre la expresión de la conexina 43 en las células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138. Después de evaluar estos efectos y teniendo en cuenta, como ya se ha mencionado previamente, la función de la conexina 43 como proteína supresora de tumores (Naus, 2002; Yamasaki, 1990; Yamasaki *et al.*, 1999), se estudiaron los efectos de la tolbutamida y

del db-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27, todas ellas relacionadas con la proliferación y el ciclo celular. Como ya se ha mencionado previamente, la proteína Ki-67 constituye un marcador de proliferación celular, pues se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en la fase G0 (Gerdes *et al.*, 1983). Por otro lado, las proteínas p21 y p27 son inhibidores de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y su expresión se ha relacionado con la conexina 43 (Sanchez-Alvarez *et al.*, 2006).

Para estudiar el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27 en las células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138, se incubaron las células en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, de db-cAMP 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación se determinó la expresión de la proteína correspondiente mediante *Western blot* o mediante inmunocitoquímica, tal y como se describe en Material y Métodos.

La figura 14 representa los efectos de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de la proteína Ki-67 en las células de glioma humano T98-G. La determinación de la proteína Ki-67 mediante *Western blot* da lugar a dos bandas que se corresponden con dos isoformas de la proteína, de 395 y 345 KDa, respectivamente (Gerdes *et al.*, 1991). En la figura 14 se observa, con respecto a la banda de 395 KDa, que ni la tolbutamida, ni el db-cAMP, ni la mezcla de ambos promovieron cambios significativos en la expresión de esta proteína. Con respecto a la banda de 345 KDa, tanto el tratamiento con db-cAMP como el tratamiento con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP dieron lugar a una reducción significativa de Ki-67. No obstante, en ninguno de los casos dicha reducción superó el 20 %. Finalmente, la tolbutamida no modificó significativamente la expresión de la isoforma de 345 KDa.

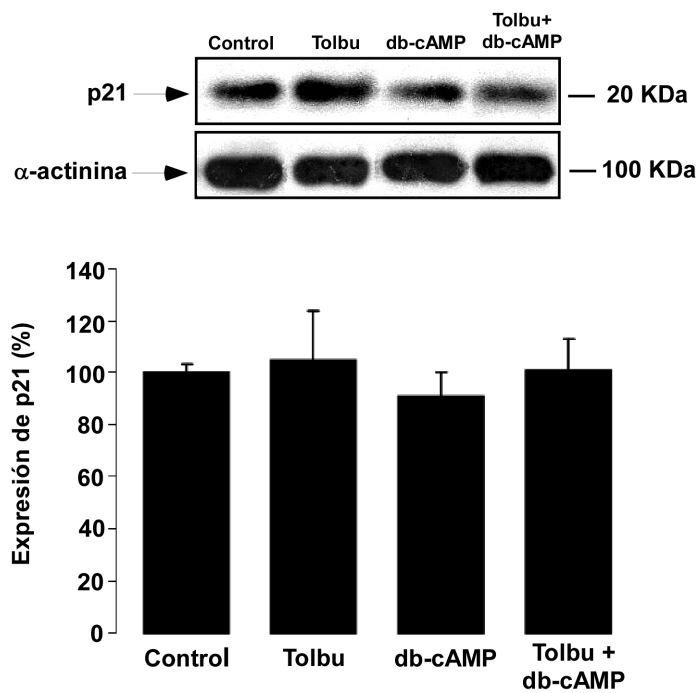
En la figura 15 se observa que, en las células de glioma humano T98-G, ni la tolbutamida, ni el db-cAMP, ni la mezcla de ambas sustancias modificaron la expresión de la proteína p21. Por otro lado, en la figura 16 se observa que, en estas mismas células, el tratamiento con db-cAMP o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP no modificó de forma significativa la expresión de la proteína p27, mientras que el tratamiento con tolbutamida redujo la expresión de p27 en un 10 %, aproximadamente.



**Figura 14. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de Ki-67 en células de glioma humano T98-G.**

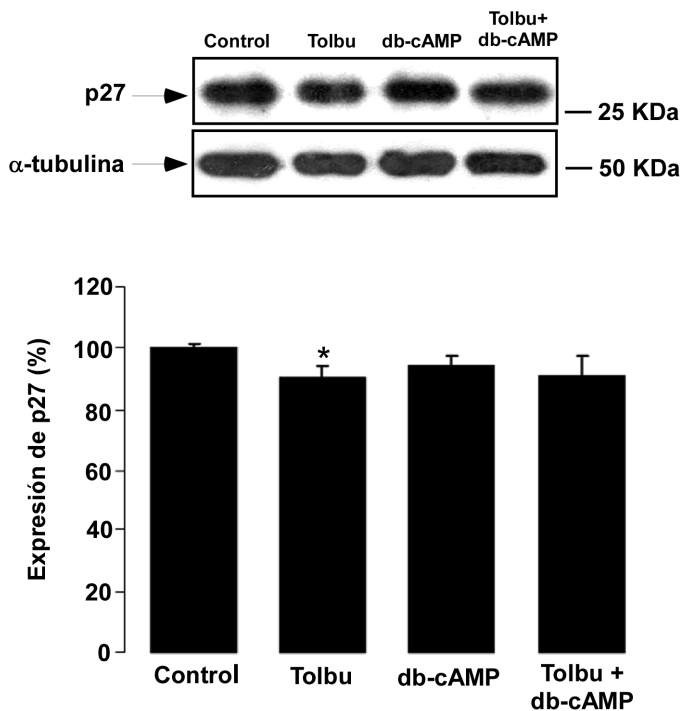
Las células de glioma humano T98-G se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína Ki-67 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*, obteniéndose dos bandas correspondientes a dicha proteína con pesos moleculares de 395 y 345 KDa, respectivamente. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).





**Figura 15. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p21 en células de glioma humano T98-G.**

Las células de glioma humano T98-G se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p21 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=3).

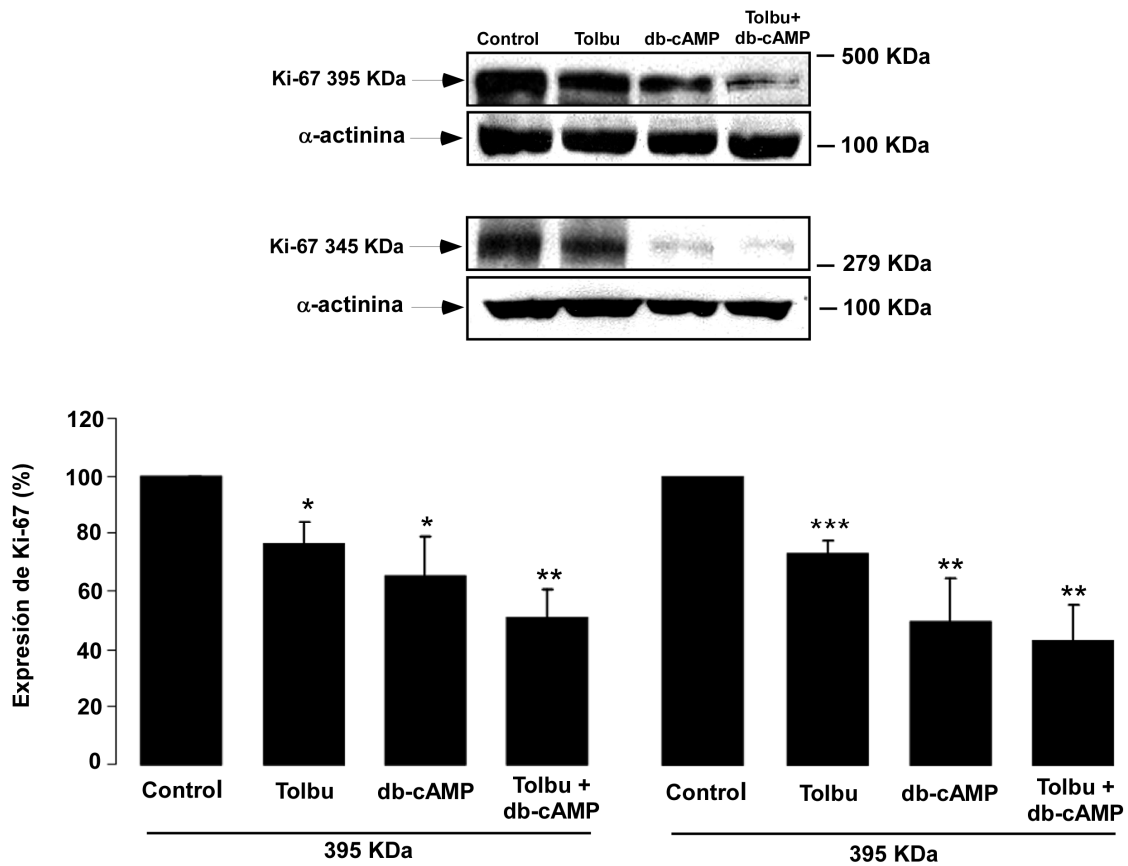


**Figura 16. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p27 en células de glioma humano T98-G.**

Las células de glioma humano T98-G se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p27 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -tubulina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*  $p < 0,05$  (test *t* de Student).

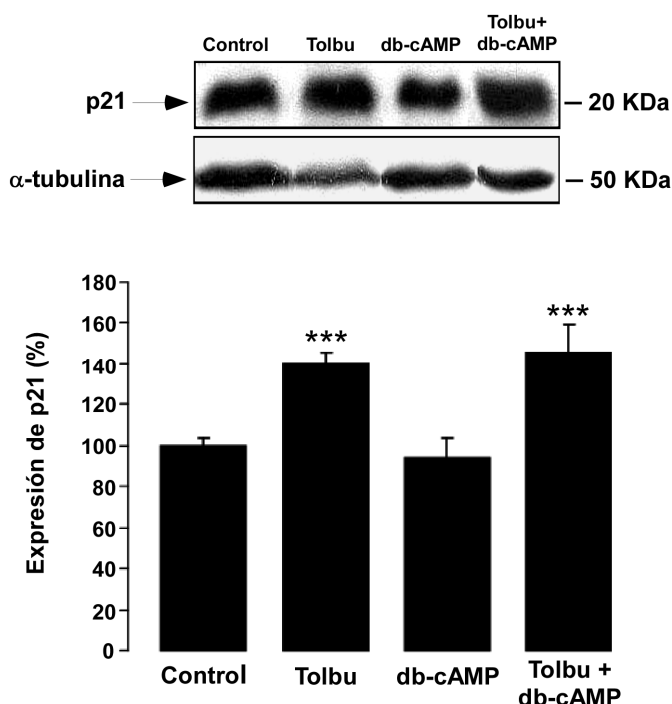
En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos en células de glioma humano U373 respecto a la expresión de Ki-67. Así, se puede observar que todos los tratamientos ensayados promovieron, en mayor o menor medida, un descenso en la expresión de Ki-67 con respecto a la situación control, lo cual se ve reflejado tanto en la expresión de la isoforma de 395 KDa como en la de 345 KDa. De esta manera, el tratamiento con tolbutamida promovió un descenso similar en la expresión de ambas isoformas, que se situó entre el 20 y el 30 %. Por otra parte, el tratamiento con db-cAMP dio lugar a una disminución en la expresión de la isoforma de 395 KDa de un 35 %, aproximadamente, mientras que, esa disminución estuvo en torno a un 50 % en el caso de la isoforma de 345 KDa. Finalmente, el tratamiento de las células de glioma humano U373 con la mezcla de ambos agentes dio lugar a un descenso en ambas isoformas superior al obtenido para cada agente por separado. Así, dicho tratamiento promovió un descenso en la isoforma de 395 KDa de un 50 % y de casi el 60 % en la de 345 KDa.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de las proteínas p21 y p27 en las células de glioma humano U373. En la figura 18 se aprecia que el tratamiento con tolbutamida o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP promovió un importante aumento en la expresión de la proteína p21 con respecto a la situación control. En ambos casos este aumento fue similar y estuvo en torno al 40 %. Sin embargo, el tratamiento con db-cAMP no dio lugar a ningún cambio significativo en la expresión de p21. Por otro lado, en la figura 19 se representan los efectos de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de p27 en células de glioma humano U373. En este caso, el tratamiento con tolbutamida promovió un aumento en la expresión de p27 de un 20 %, aproximadamente, mientras que el tratamiento con db-cAMP dio lugar a un aumento de un 40 %. Cuando las células se trataron con la mezcla de ambos agentes el aumento fue aún mayor y estuvo en torno al 60 %.



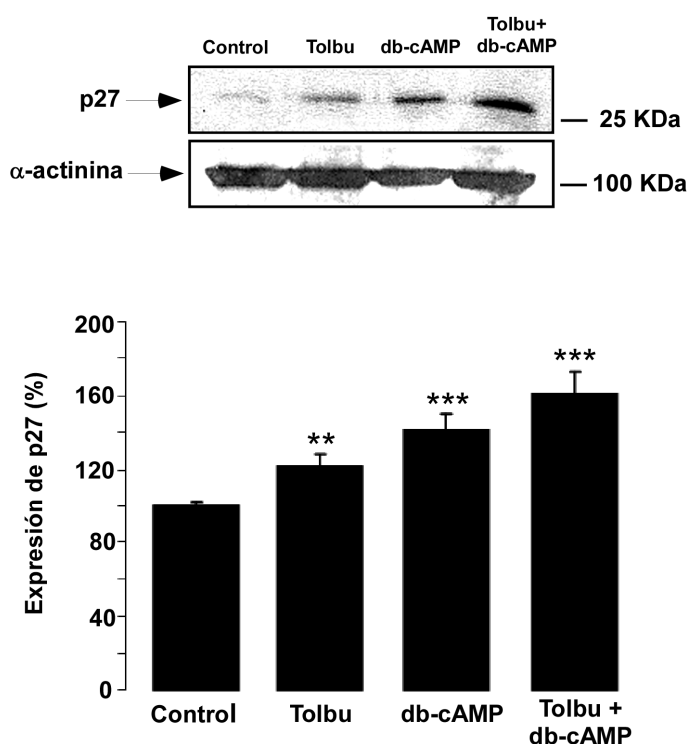
**Figura 17. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de Ki-67 en células de glioma humano U373.**

Las células de glioma humano U373 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutiril-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína Ki-67 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*, obteniéndose dos bandas correspondientes a dicha proteína con pesos moleculares de 395 y 345 KDa, respectivamente. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).



**Figura 18. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p21 en células de glioma humano U373.**

Las células de glioma humano U373 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p21 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -tubulina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=7). La significatividad de las diferencias al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$  (test *t* de Student).



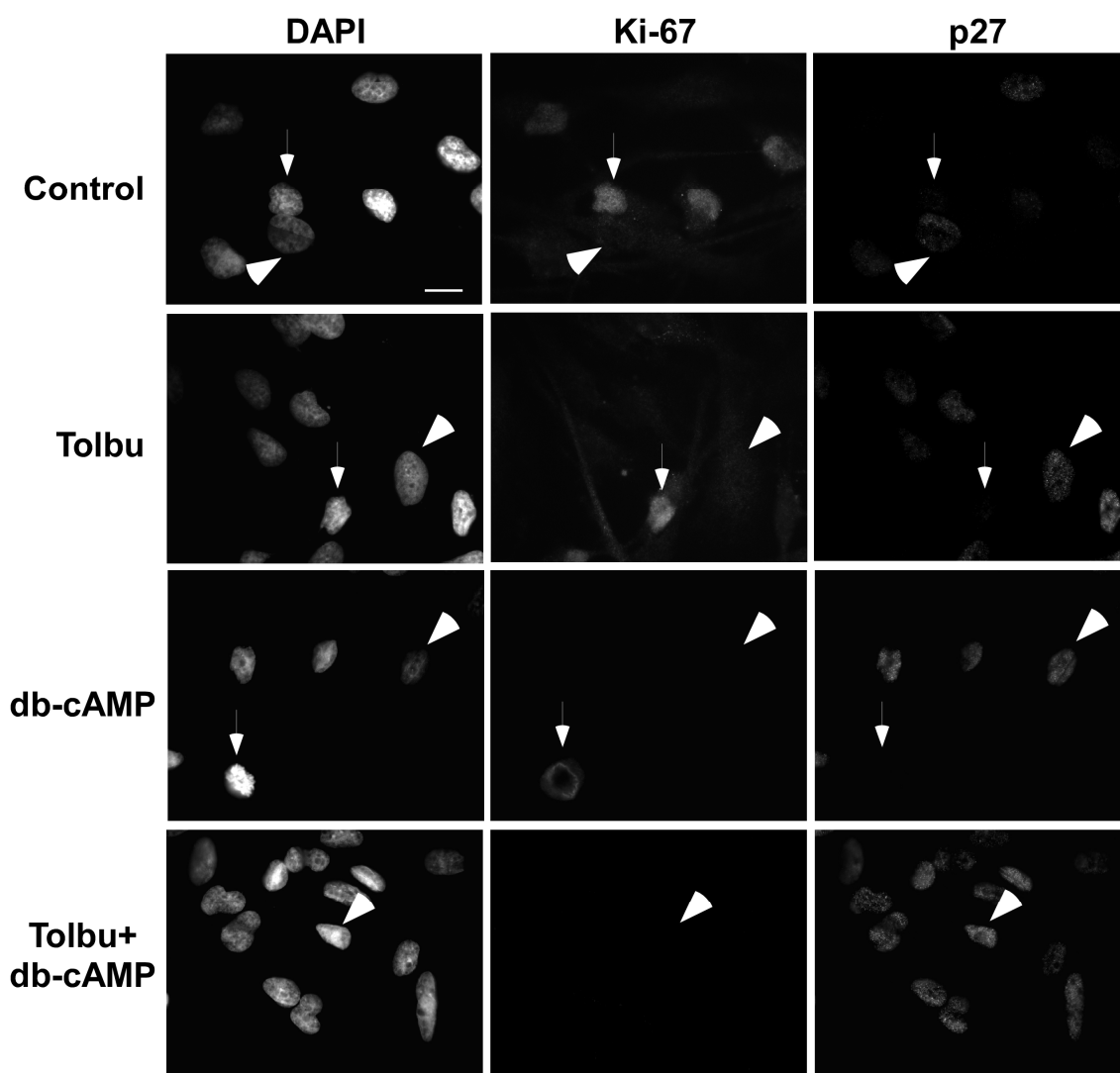
**Figura 19. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p27 en células de glioma humano U373.**

Las células de glioma humano U373 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p27 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=8). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$  y \*\*  $p \leq 0,01$  (test *t* de Student).

Teniendo en cuenta que en las células de glioma humano U373, tanto la tolbutamida como el db-cAMP promovían la disminución de Ki-67 y el aumento de otro inhibidor de CDKs, p27, se decidió estudiar, si estos efectos se producían de forma concomitante en una misma célula. Para ello, las células de glioma humano U373 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, de db-cAMP 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se determinó la expresión de las proteínas Ki-67 y p27 mediante doble inmunocitoquímica tal y como se describe en Material y Métodos.

En la figura 20 se muestran imágenes de un mismo campo, de las células de glioma humano U373 en las diferentes condiciones. Cuando las células de glioma humano U373 se trataron con tolbutamida o con db-cAMP, el número de células positivas para Ki-67 disminuyó con respecto al control, a la vez que el número de células positivas para p27, aumentó. Además, cuando las células se trataron con la mezcla de ambos agentes, el efecto sobre ambas proteínas fue aún más importante puesto que, como se observa en la imagen correspondiente al campo seleccionado, ninguna célula resultó ser positiva para Ki-67 mientras que todas lo fueron para p27. Por otro lado, se puede apreciar que las células positivas para Ki-67 resultaron ser negativas para p27 y a la inversa. Con respecto a esto, se muestra, en cada caso, un ejemplo de célula positiva para Ki-67 (marcada con una flecha) y de célula positiva para p27 (marcada con una cabeza de flecha).

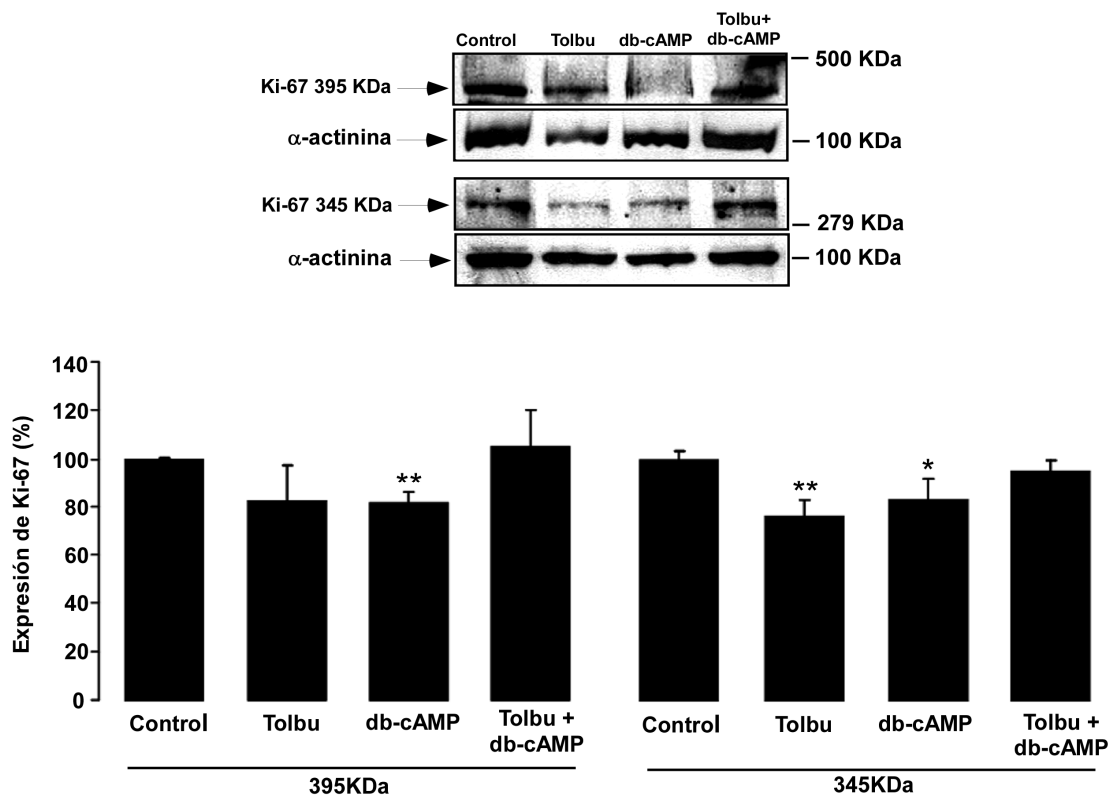
En la figura 21 se representa el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de la proteína Ki-67 en las células de glioma humano HTB12. Como se puede observar, en el caso de la isoforma de 395 KDa, el tratamiento con tolbutamida o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP no modificó la expresión de la proteína. Por otro lado, el tratamiento con db-cAMP dio lugar a una reducción significativa de la isoforma de 395 KDa, que estuvo en torno al 20 %. En el caso de la isoforma de 345 KDa, tanto el tratamiento con tolbutamida como con db-cAMP redujeron la expresión de la proteína. Para la tolbutamida, esa reducción fue ligeramente superior al 20 % y, en el caso del db-cAMP, ligeramente inferior al 20 %. Sin embargo, el tratamiento con la mezcla de ambos agentes no modificó la expresión de la isoforma de 345 KDa de Ki-67.



**Figura 20. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67 y p27 en células de glioma humano U373.**

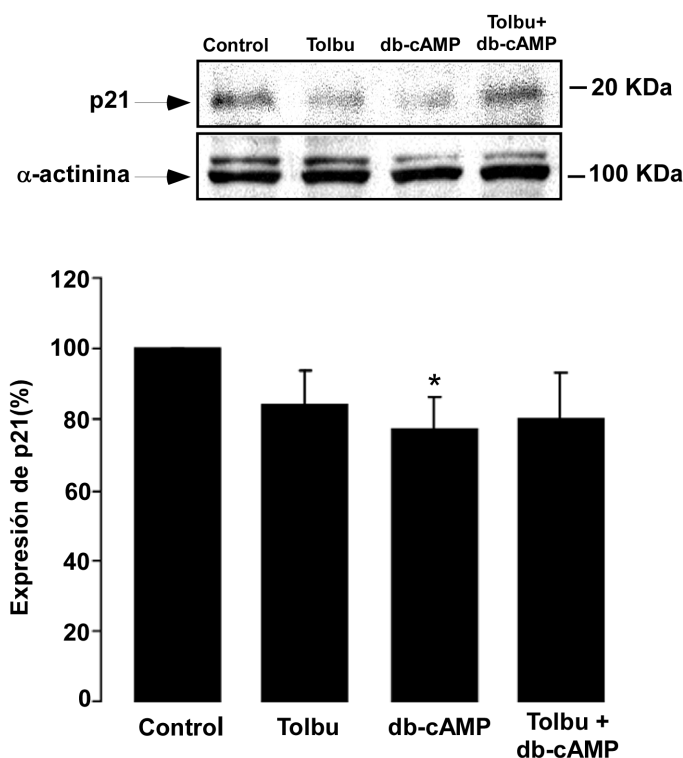
Las células de glioma de humano U373 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutiril-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de las proteínas Ki-67 y p27 se determinó mediante doble inmunocitoquímica. Las células que expresan Ki-67 son negativas para p27 (se indica, con una flecha, un ejemplo para cada condición). Las células que expresan p27 son negativas para Ki-67 (se indica, con una cabeza de flecha, un ejemplo para cada condición). El DNA se tiñó con DAPI como control del número total de células por campo. Barra=10  $\mu$ m.

En la figura 22, se puede apreciar que, en las células de glioma humano HTB12, el tratamiento con tolbutamida o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP no promovió cambios significativos en la expresión de p21 con respecto al control. Por otro lado, el tratamiento con db-cAMP dio lugar a una reducción significativa en la expresión de p21 de alrededor de un 20 %. En la figura 23 se observa que la expresión de la proteína p27, en las células de glioma humano HTB12, no se modificó con ninguno de los tratamientos empleados.



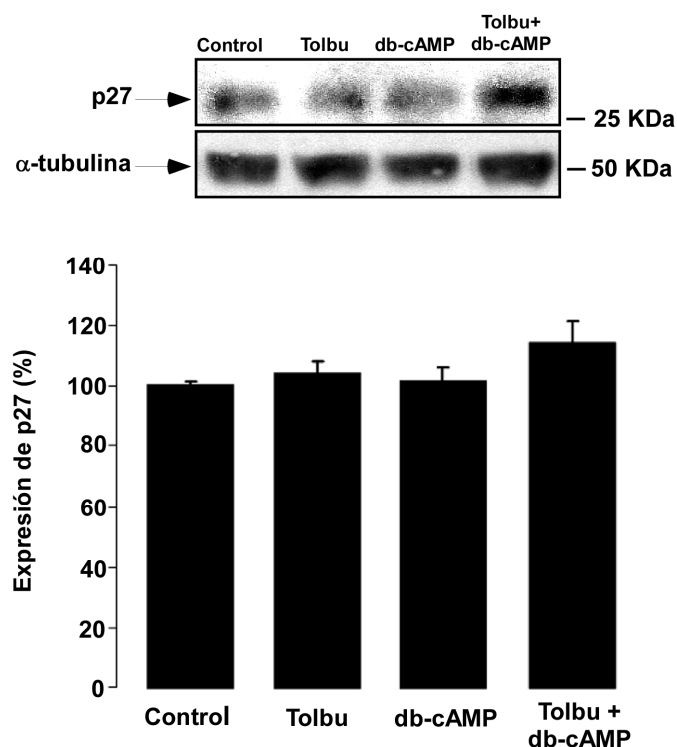
**Figura 21. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de Ki-67 en células de glioma humano HTB12.**

Las células de glioma humano HTB12 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína Ki-67 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*, obteniéndose dos bandas correspondientes a dicha proteína con pesos moleculares de 395 y 345 KDa, respectivamente. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).



**Figura 22. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p21 en células de glioma humano HTB12.**

Las células de glioma humano HTB12 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p21 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias al control se expresa como \*  $p \leq 0,05$  (test t de Student).

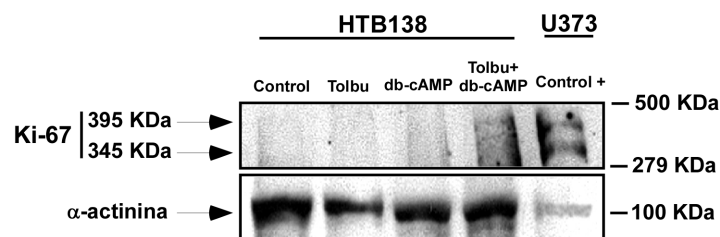


**Figura 23. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p27 en células de glioma humano HTB12.**

Las células de glioma humano HTB12 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p27 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -tubulina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=4).



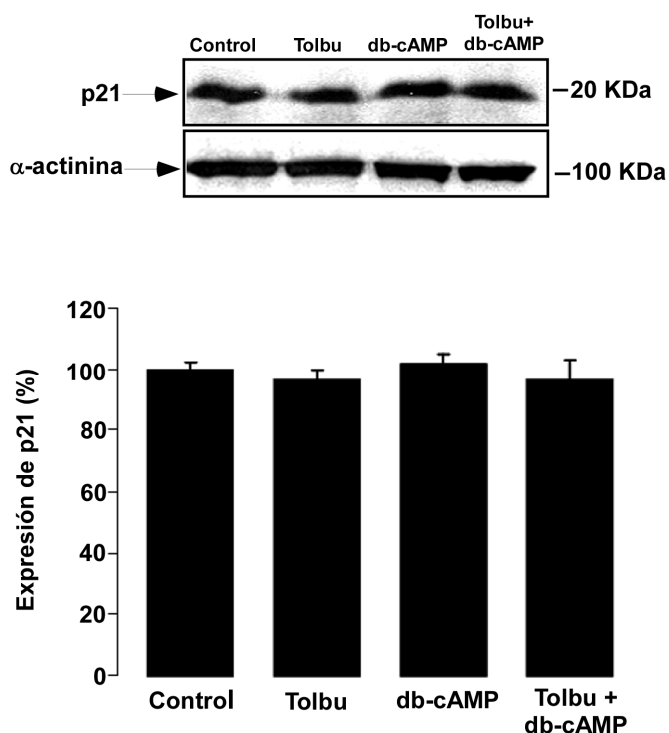
Finalmente, se estudió el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27, en las células de glioma humano HTB138. La figura 24 muestra un ejemplo ilustrativo de un experimento de *Western blot* de la proteína Ki-67 realizado en las células de glioma humano HTB138. Como ya se ha explicado previamente (figura 5), en nuestras condiciones experimentales no se detectó expresión de la proteína Ki-67 mediante *Western blot* en las células de glioma humano HTB138. Como se observa en la figura 24, la expresión de la proteína Ki-67 en la situación control (ausencia de tratamiento) fue indetectable en comparación con el control positivo (células de glioma humano U373). Además, ninguno de los tratamientos previamente indicados dio lugar a la detección y, por lo tanto, modificación de la expresión de la proteína Ki-67.



**Figura 24. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de Ki-67 en células de glioma humano HTB138.**

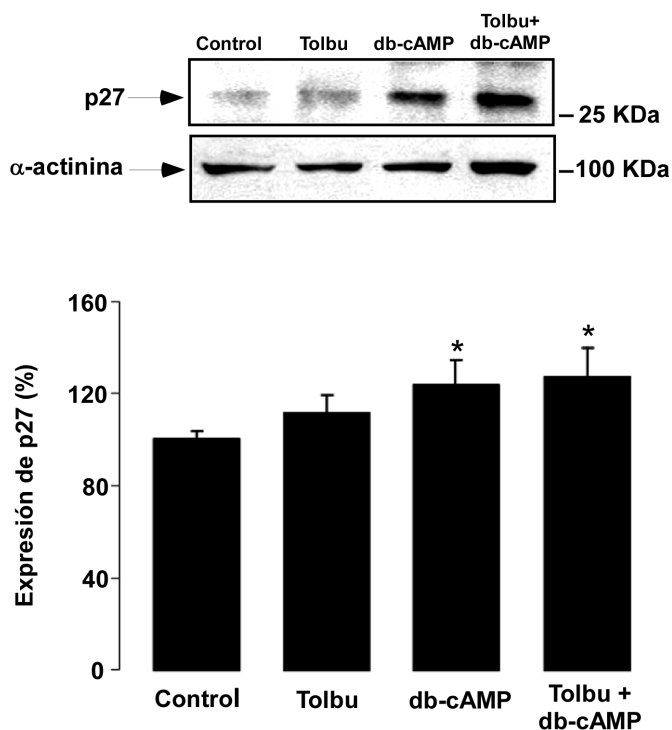
Las células de glioma humano HTB138 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína Ki-67 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. En el caso del control positivo (células de glioma humano U373) se obtuvieron dos bandas de 395 y 345 KDa, correspondientes a la proteína Ki-67. En el caso de las células de glioma humano HTB138, la expresión de Ki-67 resultó indetectable. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Los resultados corresponden a un único experimento repetido otras dos veces con resultados similares.

Por otro lado, en la figura 25 se observa que ni la tolbutamida ni el db-cAMP ni la mezcla de ambos agentes modificó la expresión de p21 en las células de glioma humano HTB138. Sin embargo, en la figura 26 se observa que, mientras que la tolbutamida no modificó la expresión de p27 en estas células, el tratamiento con db-cAMP o con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP dio lugar a un aumento significativo de p27 que, en ambos casos, fue superior al 20 %.



**Figura 25. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p21 en células de glioma humano HTB138.**

Las células de glioma humano HTB138 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p21 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=5).



**Figura 26. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p27 en células de glioma humano HTB138.**

Las células de glioma humano HTB138 se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p27 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).

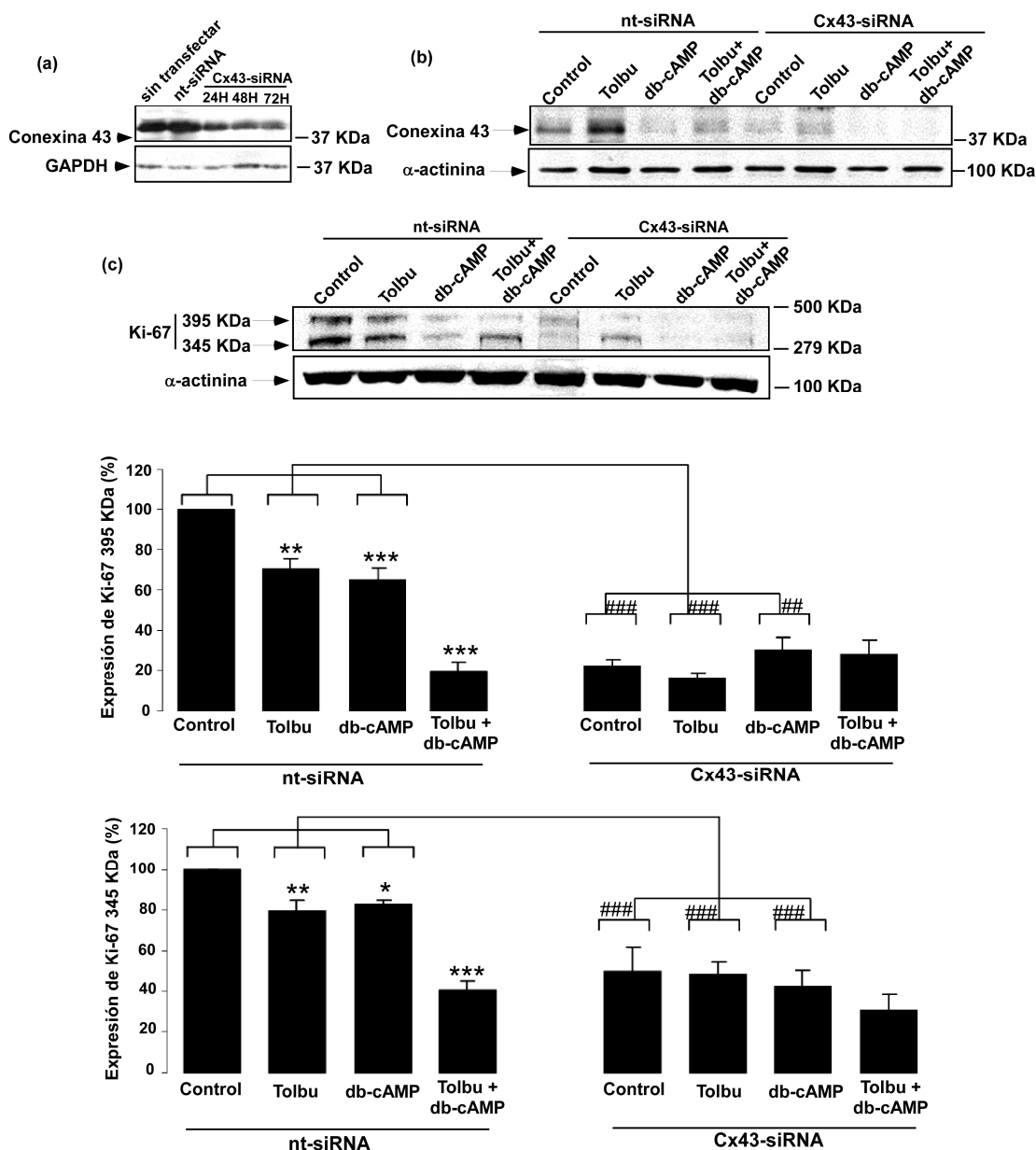
#### 4.1.2.4. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27 en células de glioma humano U373 que poseen la conexina 43 silenciada.

Como se ha expuesto en el apartado anterior, de las cuatro líneas celulares de glioma humano ensayadas, únicamente en la línea de glioma humano U373, la tolbutamida aumentó de forma significativa tanto la permeabilidad de las *gap junctions* como la expresión de la conexina 43 (figuras 8 y 9). Estos cambios, además, estuvieron acompañados de una reducción del marcador de proliferación Ki-67 (figuras 17 y 20) y de un aumento en la expresión de los inhibidores de las CDKs, p21 (figura 18) y p27 (figuras 19 y 20). Con objeto de conocer si los cambios en la proliferación se debían al aumento de la conexina 43, decidimos silenciar esta proteína en las células de glioma humano U373 y comprobar, en esas condiciones, el efecto de la tolbutamida, el db-cAMP y la mezcla de ambos agentes sobre la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27.

Para ello, las células de glioma humano U373 se transfectaron con el siRNA de la conexina 43 (Cx43-siRNA) o con un siRNA sin diana (nt-siRNA). Pasadas 24 horas, se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, db-cAMP 1 mM o tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La determinación de la expresión de las proteínas Ki-67, p21 y p27 se llevó a cabo mediante *Western blot*.

En la figura 27a se observa la expresión de la conexina 43 en las células de glioma humano U373 sin transfectar o transfectadas con el nt-siRNA o con el Cx43-siRNA después de 24, 48 ó 72 horas. Así, se aprecia que la expresión de la conexina 43 fue similar en las células sin transfectar y en aquéllas transfectadas con el siRNA sin diana (nt-siRNA). Sin embargo, la transfección de las células con el Cx43-siRNA, se tradujo en una reducción en la expresión de la conexina 43 que fue patente desde las 24 horas post-transfección aunque más evidente al cabo de 48 y 72 horas.

En la figura 27b se observa que en las células transfectadas con el nt-siRNA la tolbutamida aumentó la expresión de la conexina 43 con respecto al control, mientras que el db-cAMP y la mezcla de tolbutamida más db-cAMP la redujeron, de forma similar a los efectos observados en las células sin transfectar (figura 9). Por otro lado,



**Figura 27. Efecto de la tolbutamida y del dibutiril-cAMP sobre la expresión de Ki-67 en células de glioma humano U373 con la conexina 43 silenciada.**

Las células de glioma humano U373 fueron transfectadas con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA de la conexina 43 (Cx43-siRNA). Posteriormente, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutiril-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. **(a)** Expresión de la conexina 43 a lo largo del tiempo en células transfectadas con el Cx43-siRNA. **(b)** Efecto de los diferentes tratamientos en células transfectadas con el nt-siRNA ó con el Cx43-siRNA. **(b)** *Western blot* de Ki-67 utilizando la  $\alpha$ -actinina como control de carga. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control nt-siRNA y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$ . La significatividad de las diferencias nt-siRNA vs. Cx43-siRNA se expresa como ###  $p \leq 0,001$ , ##  $p \leq 0,01$  y #  $p \leq 0,05$ . (*One-way ANOVA*. Post-test de Bonferroni).

la transfección con el Cx43-siRNA disminuyó visiblemente la expresión de la conexina 43 en todas las condiciones experimentales.

La figura 27c recoge la expresión de las dos isoformas de Ki-67, de 395 y 345 KDa, respectivamente, en las diferentes situaciones y tratamientos ensayados. En el caso de la isoforma de 395 KDa, se puede observar que, en las células de glioma humano U373 transfectadas con el nt-siRNA, los efectos que promovieron los diferentes tratamientos sobre la expresión de Ki-67 395 KDa fueron muy similares a los efectos en las células no transfectadas (figura 17). Es decir que, el tratamiento con tolbutamida o con db-cAMP promovió una reducción en la expresión de Ki-67 395 KDa en torno al 30-35 %, mientras que el tratamiento con la mezcla de ambos agentes dio lugar a un efecto mayor, puesto que esa reducción fue del 80 %, aproximadamente. Cuando las células de glioma humano U373, fueron silenciadas con el Cx43-siRNA, no se observaron diferencias significativas en la expresión de Ki-67 395 KDa, con ninguno de los tratamientos. Sin embargo, se produjo, de forma sorprendente, una marcada reducción, en torno al 70 %, en la expresión de Ki-67 395 KDa, como se puede apreciar al comparar el nivel de expresión de esta proteína en las dos situaciones control (nt-siRNA vs. Cx43-siRNA). Además, esa diferencia significativa en la expresión de Ki-67 395 KDa entre las células transfectadas con el nt-siRNA y las transfectadas con el Cx43-siRNA, se mantuvo en el caso del tratamiento con tolbutamida o con db-cAMP, pero no en el caso del tratamiento con la mezcla de ambos agentes.

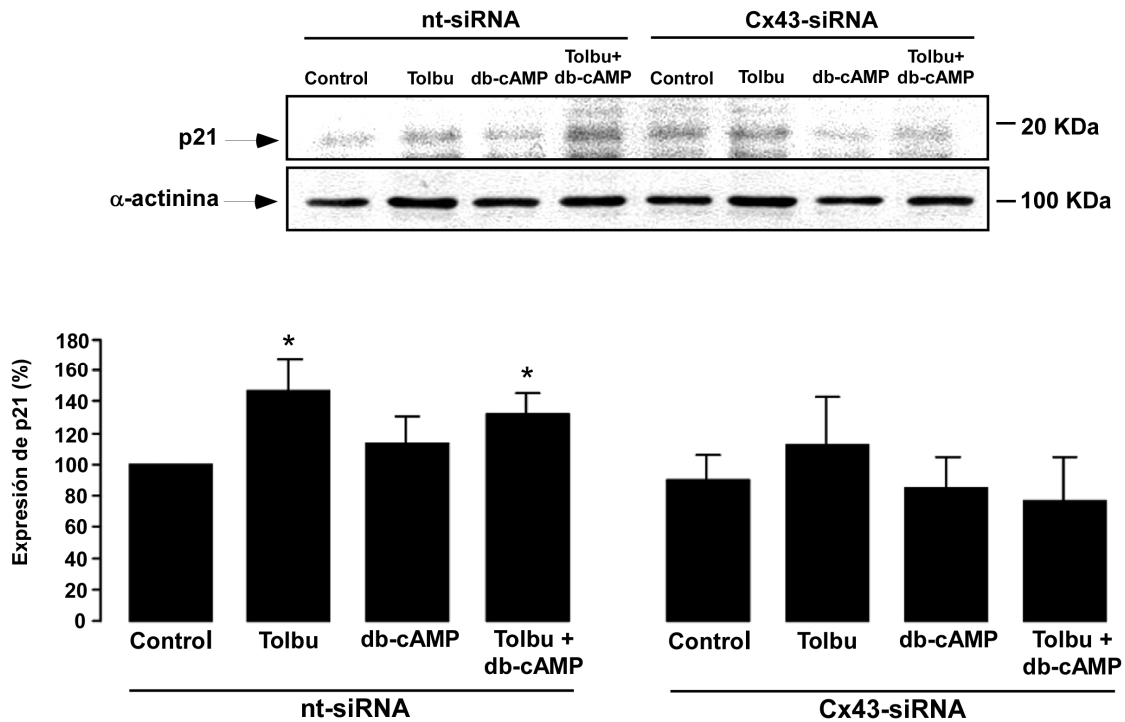
Con respecto a la isoforma Ki-67 345 KDa, en la figura 27c se puede observar que en las células de glioma humano U373 transfectadas con el nt-siRNA, la tolbutamida y el db-cAMP tuvieron un efecto muy similar sobre Ki-67 345 KDa, que consistió en una reducción en la expresión de esta proteína con respecto al control, de un 15-20 %, aproximadamente. Cuando las células se trataron con la mezcla de ambos agentes, el efecto fue mucho mayor puesto que, en este caso, la reducción en la expresión de Ki-67 345 KDa fue de un 60 % aproximadamente. Estos resultados son similares a los obtenidos en las células de glioma humano U373 no transfectadas (figura 17). Cuando las células de glioma humano U373 se transfectaron con el Cx43-siRNA no se observaron cambios significativos en la expresión de Ki-67 345 KDa con ninguno de los tratamientos. Sin embargo, la expresión de esta proteína resultó ser significativamente menor, en torno a un 50 %, que en el caso de las células

transfectadas con el nt-siRNA. Esa reducción se observó en la situación control, así como en el caso del tratamiento con tolbutamida y con db-cAMP, pero no en el caso del tratamiento con la mezcla de ambos agentes.

En cuanto a la expresión de p21, en la figura 28 se puede apreciar que, en las células de glioma humano U373 transfectadas con el nt-siRNA, el tratamiento con tolbutamida promovió un aumento en la expresión de la proteína p21 de un 40 % aproximadamente, con respecto a la situación control. Además, el tratamiento con db-cAMP no dio lugar a ningún cambio significativo en la expresión de esta proteína, mientras que el tratamiento con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP promovió un aumento significativo en la expresión de p21, en torno al 30 %. Este patrón de expresión de p21 promovido por los diferentes tratamientos, fue similar al encontrado cuando las células de glioma humano U373 no estaban transfectadas (figura 18). Por otro lado, las células de glioma humano U373 se transfectaron con el Cx43-siRNA y se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida, de db-cAMP o de la mezcla de ambos agentes. En este caso, ninguno de los tratamientos promovió cambios significativos respecto al control. Asimismo, tampoco existieron diferencias significativas en la expresión de p21 entre las células transfectadas con el Cx43-siRNA y las transfectadas con el nt-siRNA.

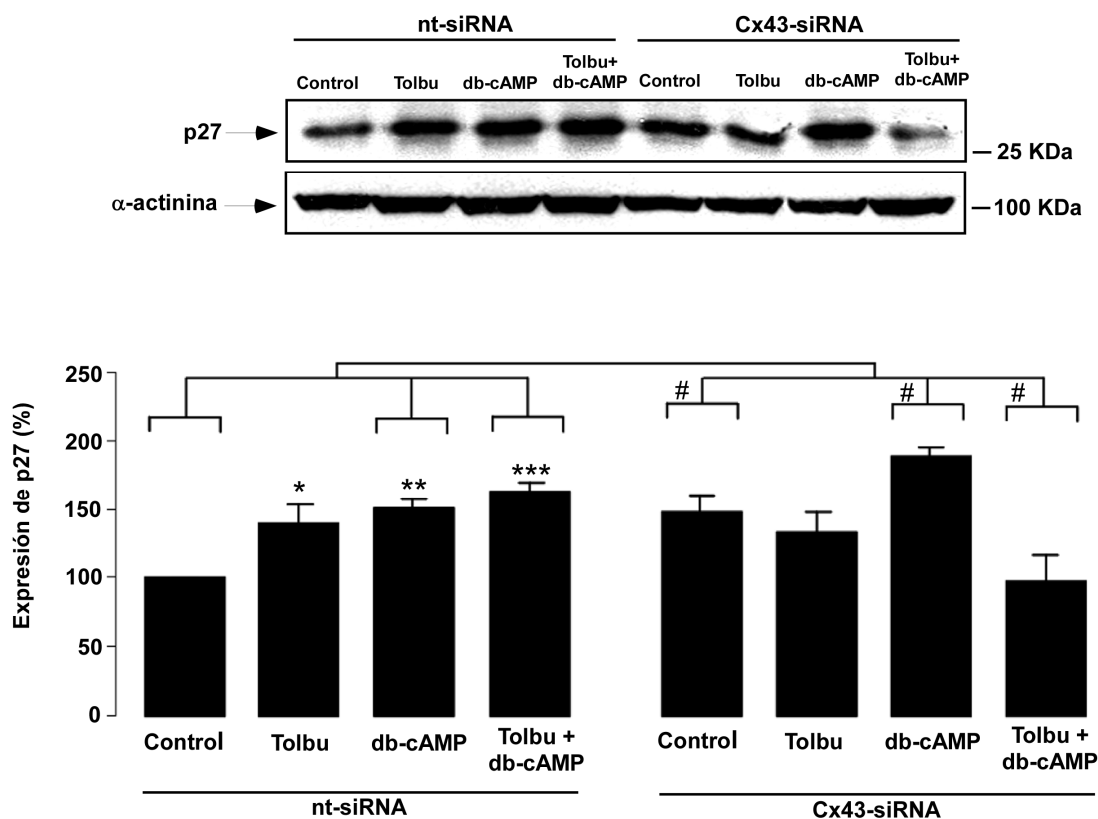
En la figura 29 se observa que, en las células de glioma humano U373 transfectadas con el nt-siRNA, el tratamiento con tolbutamida aumentó la expresión de p27 en un 40 %, el tratamiento con db-cAMP promovió un aumento en la expresión de p27 del 50 % y en el caso del tratamiento con la mezcla de ambos agentes ese aumento fue del 60 %. Estos efectos fueron similares a los observados en las células de glioma humano U373 sin transfectar (figura 19). Por otro lado, cuando las células de glioma humano U373 se transfectaron con el Cx43-siRNA no se produjeron modificaciones significativas en la expresión de p27 con ninguno de los tratamientos. Sin embargo, el silenciamiento de la conexina 43 promovió modificaciones en la expresión de p27 con respecto a las células transfectadas con el nt-siRNA, en alguna de las condiciones. De esta forma, en la situación control, la expresión de p27 fue un 50 % superior en las células que tenían la conexina 43 silenciada, mientras que cuando las células se incubaron con db-cAMP, la expresión de p27 fue un 30 % superior en las células que tenían la conexina 43 silenciada. Cuando las células se incubaron con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP, la expresión de p27 en las

células que tenían la conexina 43 silenciada fue un 60 % inferior a las células transfectadas con el nt-siRNA. Finalmente, cuando las células se incubaron con tolbutamida, no existieron diferencias significativas en la expresión de p27 entre los dos grupos de células.



**Figura 28. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p21 en células de glioma humano U373 con la conexina 43 silenciada.**

Las células de glioma humano U373 fueron transfectadas con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA de la conexina 43 (Cx43-siRNA). Posteriormente, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p21 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control nt-siRNA y son medias  $\pm$  SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*  $p \leq 0,05$  (test *t* de Student).



**Figura 29. Efecto de la tolbutamida y del dibutilil-cAMP sobre la expresión de p27 en células de glioma humano U373 con la conexina 43 silenciada.**

Las células de glioma humano U373 fueron transfectadas con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA contra la conexina 43 (Cx43-siRNA). Posteriormente, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, de dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o de tolbutamida 400  $\mu$ M + db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la proteína p27 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la  $\alpha$ -actinina. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control nt-siRNA y son medias  $\pm$  SEM (n=6). La significatividad de las diferencias respecto a la situación control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$ . La significatividad de las diferencias nt-siRNA vs. Cx43-siRNA se expresa como #  $p \leq 0,05$ . (*One-way ANOVA*. Post-test de Bonferroni).

#### 4.1.2.5. Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la proliferación de las células de glioma humano U373.

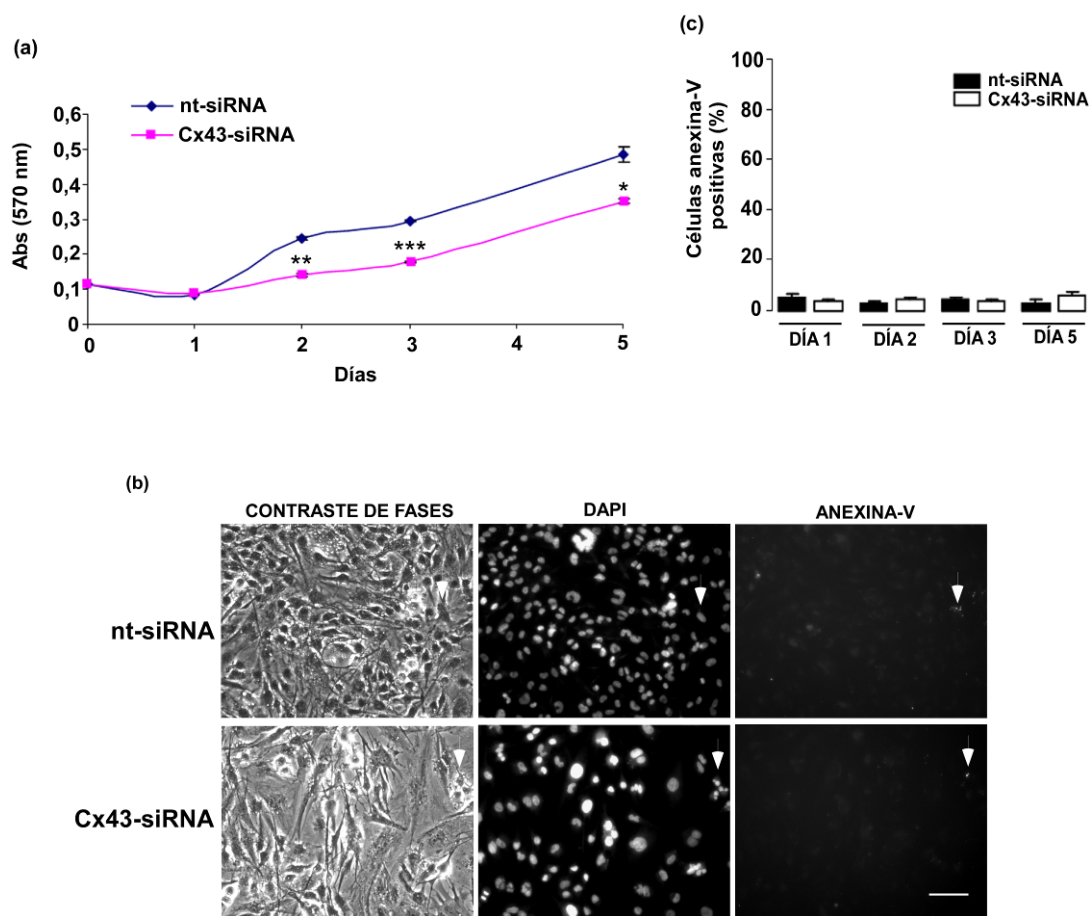
Dado que en las células de glioma humano U373 el silenciamiento de la conexina 43 promovió la disminución del marcador de proliferación Ki-67 y el aumento del inhibidor de CDKs, p27, se decidió estudiar el efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la proliferación de estas células.



Para ello, las células de glioma humano U373 se transfectaron con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA contra la conexina 43 (Cx43-siRNA). Pasados 1, 2, 3 y 5 días, se llevaron a cabo los experimentos correspondientes. Con objetivo de elaborar una curva de crecimiento para cada grupo de células, se evaluó la viabilidad celular mediante el método del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio), tal y como se describe en Material y Métodos. Además, por otro lado, con el objetivo de evaluar si el silenciamiento de la conexina 43 desencadenaba fenómenos de apoptosis, se llevó a cabo la tinción de las células con anexina-V, utilizando la tinción con DAPI como control del número total de células.

En la figura 30a, correspondiente a la curva de crecimiento de ambos grupos de células, se observa que el día 1 no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada grupo. Sin embargo, a partir de este día, las dos curvas de crecimiento comienzan a separarse de forma que los valores de absorbancia obtenidos para las células que tenían la conexina 43 silenciada son inferiores a los de las células transfectadas con el nt-siRNA. De hecho, estas diferencias resultaron estadísticamente significativas para los días 2, 3 y 5.

En la figura 30b se recogen imágenes de contraste de fases, de tinción con DAPI y de tinción con anexina-V correspondientes al día 3. Son imágenes de un mismo campo celular de células de glioma humano U373 transfectadas con el nt-siRNA o con el Cx43-siRNA. Así, se puede observar, tanto en las imágenes de contraste de fases como en las correspondientes a los núcleos teñidos con DAPI, que el número total de células el día 3 fue menor en el caso de las células que tenían silenciada la conexina 43. Por otro lado, se observa que el número de células positivas para anexina-V, indicativo de la muerte por apoptosis, fue muy bajo en ambos casos. Se ha señalado con una flecha un ejemplo de célula anexina-V positiva para cada grupo de células. De hecho, en la figura 30c, que recoge la cuantificación de estos resultados, se observa que el porcentaje de células anexina-V positivas no superó en ningún caso el 10 %, no existiendo diferencias significativas entre las células de glioma humano U373 transfectadas con el nt-siRNA y las transfectadas con el Cx43-siRNA.



**Figura 30. Efecto del silenciamiento de la conexina 43 sobre la proliferación de las células de glioma humano U373.**

Las células de glioma humano U373 fueron transfectadas con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA de la conexina 43 (Cx43-siRNA). Al cabo de 1, 2, 3 y 5 días, se llevó a cabo el experimento correspondiente. **(a)** Curva de crecimiento determinada mediante MTT. Los datos son medias  $\pm$  SEM y corresponden a un único experimento repetido dos veces más en idénticas condiciones, con resultados similares. La significatividad de las diferencias para cada día se expresa como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$  (test t de Student). **(b)** Fotomicrografías correspondientes al día 3, del contraste de fases, la tinción con DAPI y la tinción con anexina-V, para las células nt-siRNA y Cx43-siRNA. Se indica con una flecha un ejemplo de célula anexina-V positiva para cada condición. Barra de calibrado=40  $\mu$ m. **(c)** Porcentaje de células anexina-V positivas a lo largo del tiempo. Las células se tiñeron con anexina-V y se cuantificó el porcentaje de células positivas con respecto al número total de células (núcleos teñidos con DAPI). Los datos representados son medias  $\pm$  SEM (n = 3).

## **4.2. Caracterización molecular y farmacológica del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP) en las células de glioma.**

Los canales de potasio sensibles al ATP (K-ATP), que pertenecen a la familia de los canales rectificadores de potasio, acoplan el estado metabólico de la célula con el potencial de membrana. Se sabe que las sulfonilureas, como la tolbutamida y la glibenclamida, actúan a través de estos canales, promoviendo el cierre de los mismos (Sturgess *et al.*, 1988) mientras que, el diazóxido o el pinacidilo actúan como activadores del canal (Ashcroft and Gribble, 2000).

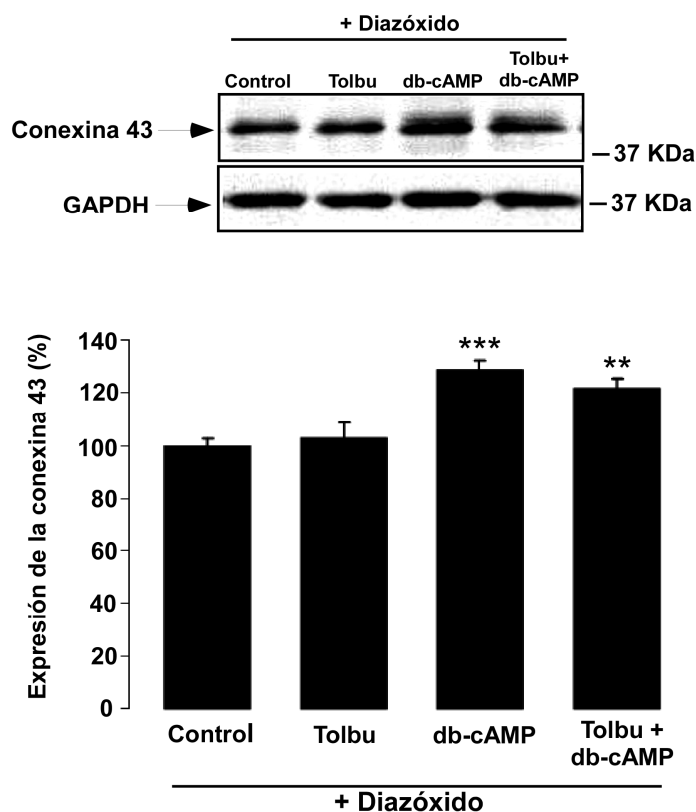
Con el objetivo de dilucidar si el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 se producía mediante un mecanismo de acción diferente, nos propusimos estudiar el efecto de dos agentes activadores del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP), como son el diazóxido y el pinacidilo, sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6, tratadas con tolbutamida y/o db-cAMP.

### **4.2.1. Efecto de agentes activadores del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP) sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6 tratadas con tolbutamida y/o db-cAMP.**

Para estudiar el efecto del diazóxido y del pinacidilo sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6 tratadas con tolbutamida y/o db-cAMP, las células de glioma de rata C6 se incubaron en presencia de diazóxido 300  $\mu\text{M}$  o pinacidilo 500  $\mu\text{M}$ , en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida 400  $\mu\text{M}$ , db-cAMP 1mM o tolbutamida 400  $\mu\text{M}$  más db-cAMP 1mM. Posteriormente, la expresión de la conexina 43 se determinó mediante *Western blot*.

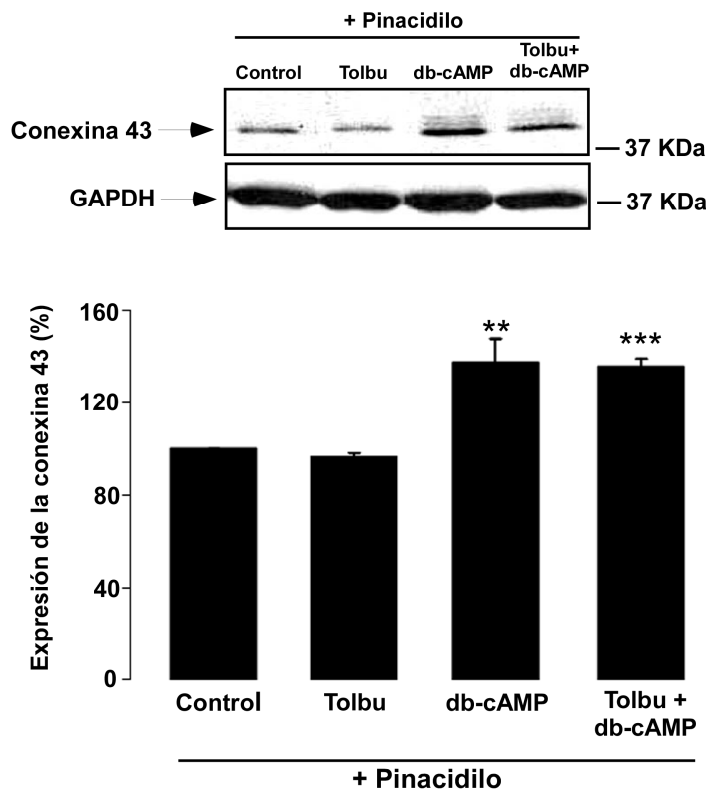
En las figuras 31 y 32 se observa que, en presencia de diazóxido o de pinacidilo, la tolbutamida no modificó la expresión de la conexina 43 en las células de glioma de rata C6. Sin embargo, en presencia de diazóxido o de pinacidilo, el db-cAMP promovió un aumento en la expresión de la conexina 43 con respecto al control, de un 30 % en el primer caso y de un 40 % en el segundo caso. Además, cuando las células de glioma de rata C6 se trataron con la mezcla de tolbutamida más db-cAMP,

en presencia de diazóxido, la expresión de la conexina 43 aumentó alrededor de un 20 % y, en presencia de pinacidilo, aumentó en torno al 40 %.



**Figura 31. Efecto del diazóxido sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6 tratadas con tolbutamida y/o con db-cAMP.**

Las células de glioma de rata C6 se incubaron en presencia de diazóxido 300 μM en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400 μM, dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o tolbutamida 400 μM más db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la conexina 43 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias ± SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\* p≤0,001 y \*\* p≤0,01 (test *t* de Student).



**Figura 32. Efecto del pinacidilo sobre la expresión de la conexina 43 en células de glioma de rata C6 tratadas con tolbutamida y/o con db-cAMP.**

Las células de glioma de rata C6 se incubaron en presencia de pinacidilo 500  $\mu$ M en ausencia (control) o presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, dibutilil-cAMP (db-cAMP) 1 mM o tolbutamida 400  $\mu$ M más db-cAMP 1 mM, durante 24 horas. La expresión de la conexina 43 se determinó mediante análisis de transferencia tipo *Western*. Como control de carga se utilizó la GAPDH. Las películas se escanearon y se cuantificaron las bandas utilizando el programa de análisis de imagen *SCION Image*. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\* p $\leq$ 0,001 y \*\* p $\leq$ 0,01 (test *t* de Student).

#### 4.2.2. Caracterización molecular del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP) en las células de glioma.

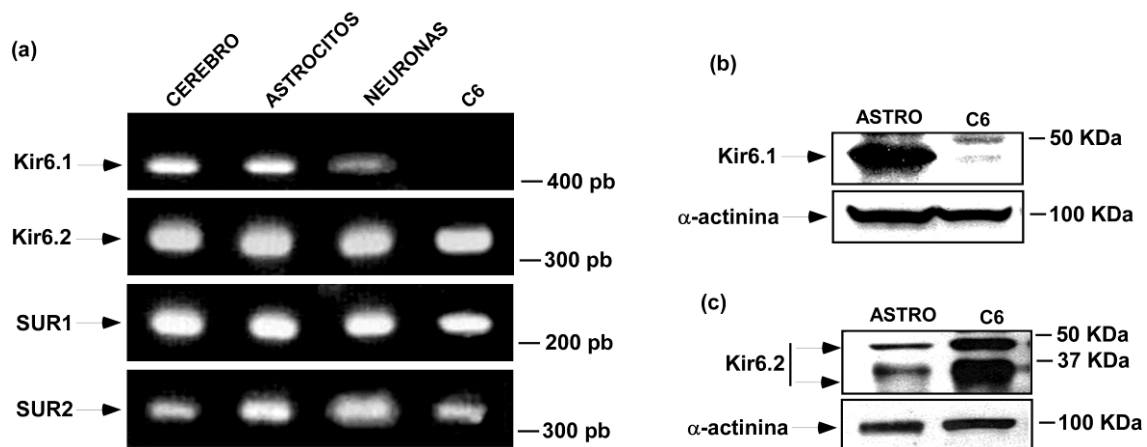
Dado que el efecto de la tolbutamida sobre la expresión de la conexina 43 está mediado por el canal K-ATP, se decidió llevar a cabo la caracterización molecular de los componentes de dicho canal en las células de glioma.

Se ha descrito que los K-ATP están formados por dos tipos de subunidades: las subunidades Kir6.x, que constituyen el canal propiamente dicho, y las subunidades SUR, que constituyen el receptor de las sulfonilureas. Además, en los mamíferos se han descrito dos tipos de subunidades Kir6.x, en concreto Kir6.1 y Kir6.2, y otros dos tipos de subunidades SUR: SUR1 y SUR2 (Aguilar-Bryan and Bryan, 1999).

Para llevar a cabo la caracterización molecular del canal K-ATP en las células de glioma de rata C6, se extrajo el RNA total a partir de dichas células, así como el RNA total de cultivos primarios de astrocitos y neuronas y de tejido cerebral. Posteriormente, se llevó a cabo la retrotranscripción y posterior reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando los oligonucleótidos correspondientes a las diferentes subunidades del canal, tal y como se describe en Material y Métodos. Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa y el resultado se visualizó con un transiluminador.

En la figura 33a, se puede observar que, en cerebro, astrocitos y neuronas, se detectó el RNA mensajero, tanto de los componentes propiamente dichos del canal de potasio, Kir6.1 (411 pb) y Kir6.2 (317 pb), como de las subunidades receptoras de sulfonilureas, SUR1 (230 pb) y SUR2 (313 pb). Sin embargo, en células de glioma de rata C6, de los cuatro componentes analizados, no se detectó el RNA mensajero de la subunidad Kir6.1, como muestra la ausencia de banda a la altura de 411 pb, aunque sí se detectaron Kir6.2, SUR1 y SUR2.

Debido a la ausencia del RNA mensajero de Kir6.1 en las células de glioma de rata C6, se decidió comprobar la expresión de la proteína Kir6.1. Para ello, se extrajeron proteínas de las células de glioma de rata C6, así como de cultivos primarios de astrocitos y se estudió la expresión de Kir6.1 mediante *Western blot*. En la figura 33b se observa en los astrocitos (“astro”) una marcada banda inferior a 50 KDa correspondiente a Kir6.1, cuyo peso molecular es de 48 KDa. Sin embargo, en el carril correspondiente a las células de glioma de rata C6 se observa un patrón de bandas difuso y poco definido.



**Figura 33. Caracterización molecular del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP) en células de glioma de rata C6.**

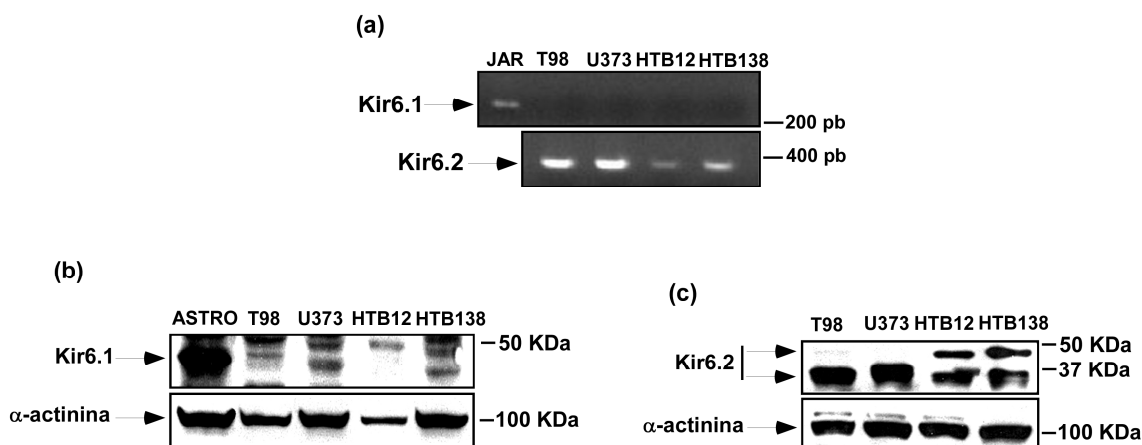
(a) RT-PCR realizada a partir de RNA de cerebro total, astrocitos, neuronas y células de glioma de rata C6, utilizando los oligonucleótidos correspondientes a Kir6.1, Kir6.2, SUR1 y SUR2. (b) *Western blot* de Kir6.1 en astrocitos (astro) y células de glioma de rata C6 utilizando  $\alpha$ -actinina como control de carga. (c) *Western blot* de Kir6.2 en astrocitos y células de glioma de rata C6 utilizando  $\alpha$ -actinina como control de carga.

Por otro lado, al detectarse expresión del RNA mensajero de Kir6.2 tanto en las células de glioma de rata C6 como en los astrocitos, se decidió estudiar la expresión de esta proteína en estas células mediante *Western blot*. Así, en la figura 33c se observa la expresión de dos bandas en los astrocitos, una inferior a 50 KDa y la otra inferior a 37 KDa, correspondientes a la proteína Kir6.2, cuyo peso molecular predicho es de 43 KDa. Por otro lado, las células de glioma de rata C6 expresan también la proteína Kir6.2, aunque esta expresión resulta, claramente, mucho mayor que en el caso de los astrocitos.

Después de comprobar las diferencias existentes en la expresión de Kir6.1 y Kir6.2 entre los astrocitos y las células de glioma de rata C6, se decidió estudiar la expresión de estos dos componentes del canal K-ATP en las células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138.

Para ello, se llevó a cabo una RT-PCR a partir de RNA de células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138, utilizando los oligonucleótidos correspondientes a Kir6.1 y Kir6.2 descritos en la sección de Material y Métodos. Así, en la figura 34a se puede observar que en ninguna de las cuatro líneas de glioma

humano se detectó expresión del RNA mensajero de Kir6.1, en comparación con la clara expresión detectada en el control positivo, es decir, la línea celular de placenta JAR, donde apareció una banda superior a 200 pb que se corresponde con Kir6.1 (263 pb). Por otro lado, en las cuatro líneas de glioma humano se detectó expresión del mensajero de Kir6.2, como se puede apreciar por la aparición de una banda inferior a 400 pb que se corresponde con Kir6.2 (391 pb). Se estudió, además, la expresión de las proteínas Kir6.1 y Kir6.2 mediante *Western blot*. En la figura 34b se observa la clara expresión de la proteína Kir6.1 en los astrocitos (“astro”) como muestra la presencia de una intensa banda a la altura aproximada de 47 KDa. Sin embargo, en el caso de las cuatro líneas de glioma humano ensayadas se observaron bandas difusas y poco definidas por debajo de los 50 KDa. Por otro lado, en la figura 34c se observa una clara expresión de Kir6.2 en las cuatro líneas de glioma humano, T98-G, U373, HTB12 y HTB138. No obstante, existieron diferencias en cuanto a la expresión de cada una de las dos bandas correspondientes a Kir6.2. En este sentido, en las células



**Figura 34. Caracterización molecular del canal de potasio sensible al ATP (K-ATP) en células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138.**

(a) RT-PCR realizada a partir de RNA de la línea celular de placenta JAR y de células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138, utilizando los oligonucleótidos correspondientes a Kir6.1 y Kir6.2. (b) *Western blot* de Kir6.1 en astrocitos (astro) y células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138, utilizando  $\alpha$ -actinina como control de carga. (c) *Western blot* de Kir6.2 en astrocitos y células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138, utilizando  $\alpha$ -actinina como control de carga.



de glioma humano T98-G, la banda próxima a 50 KDa, resultó casi indetectable, mientras que fue totalmente indetectable en la línea de glioma humano U373. Sin embargo, esta banda se expresó claramente en las líneas de glioma humano HTB12 y HTB138. Por otro lado, la banda situada por debajo de los 37 KDa se expresó en las cuatro líneas celulares. Además, la expresión de esta banda fue claramente mayor en las líneas de glioma humano T98-G y U373 que en las líneas HTB12 y HTB138.



### 4.3. Estudio de la eficacia de la terapia génica suicida (timidina kinasa del virus del herpes simple/ganciclovir) en las células de glioma.

Como ya se explicó en el apartado 1.3. de la Introducción, correspondiente al abordaje terapéutico de los gliomas, el principal obstáculo a la hora de conseguir un tratamiento eficaz para estos tumores está en relación con su alta capacidad para infiltrar el parénquima cerebral sano, lo cual los hace altamente recurrentes. De hecho, los tratamientos convencionales, que incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, no han logrado, hasta ahora, alcanzar un efecto importante sobre la supervivencia de los pacientes con glioma. Por esta razón se están buscando nuevas alternativas para el tratamiento de estos tumores que resulten más selectivas y eficaces, dentro de las cuales se incluye la terapia génica suicida.

El sistema de terapia génica suicida más extendido es el que utiliza como enzima activadora la timidina kinasa del virus del herpes simple (HSVtk) (Moolten, 1986) y como profármaco el ganciclovir (GCV), que es un análogo acíclico de la guanosina. De esta forma, cuando las células tumorales se transfectan con el gen de la HSVtk y, posteriormente, se tratan con GCV, son capaces de fosforilar el GCV hasta convertirlo en la forma activa o trifosforilada, que se incorpora al DNA de las células en división impidiendo la elongación del mismo (Mesnil and Yamasaki, 2000).

Por otro lado, teniendo en cuenta que uno de los principales inconvenientes de esta terapia es la baja eficacia de transfección que se consigue con los vectores disponibles en la actualidad (Rainov and Ren, 2003), tiene especial importancia, a la hora de conseguir el éxito de esta terapia, el denominado efecto *bystander*. Dicho efecto consiste, básicamente, en la inducción de la muerte de las células no transfectadas por parte de las células transfectadas. Uno de los mecanismos que explican el efecto *bystander* es el paso del GCV trifosforilado desde las células HSVtk positivas hasta las células HSVtk negativas a través de las *gap junctions* (Mesnil and Yamasaki, 2000). Puesto que se ha demostrado que, en los tumores en general y en los gliomas en particular, el nivel de expresión de la conexina 43 y el grado de comunicación intercelular a través de la *gap junctions* son muy bajos (Huang *et al.*, 1999; Pu *et al.*, 2004; Soroceanu *et al.*, 2001), la utilización de agentes que promuevan el aumento de ambas características podría ser de utilidad para mejorar la eficacia de la terapia génica suicida.

En apartados previos se ha mostrado que, en nuestras condiciones experimentales, la tolbutamida promovía un aumento importante tanto de la permeabilidad de las *gap junctions* como de la expresión de la conexina 43 en las células de glioma de rata C6 y en las células de glioma humano U373. Con el objetivo de estudiar el posible desarrollo del efecto *bystander* por parte de la tolbutamida en estos dos tipos de células, se diseñó, en primer lugar, un modelo experimental de terapia génica suicida basado en el sistema HSVtk/GCV.

#### **4.3.1. Terapia génica suicida en células de glioma de rata C6.**

##### **4.3.1.1. Diseño de un modelo experimental de terapia génica suicida en células de glioma de rata C6.**

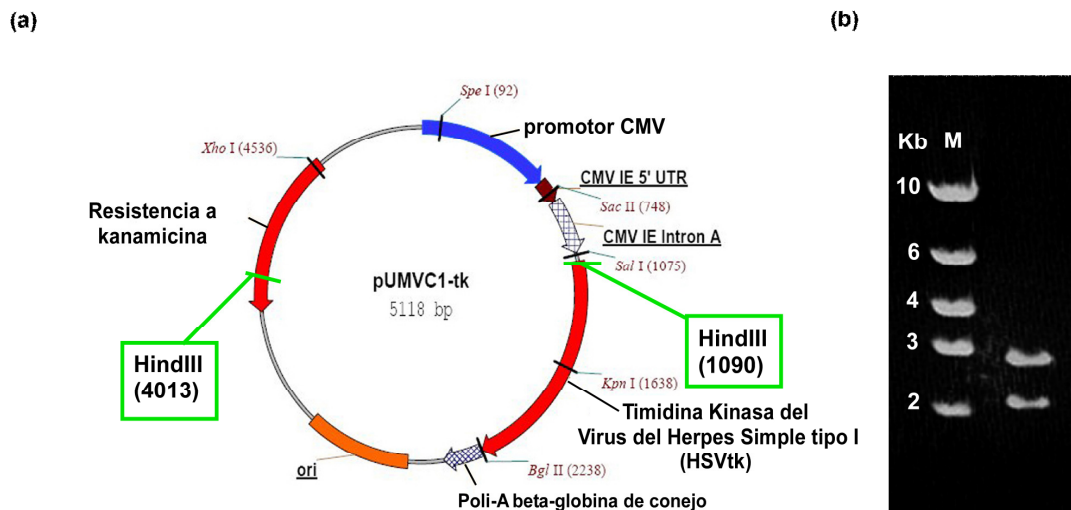
Para diseñar un modelo experimental de terapia génica suicida en células de glioma de rata C6 se construyó, en primer lugar, un plásmido bicistrónico que codificase nuestra proteína de interés, es decir, la HSVtk, y una proteína reportera, la proteína roja fluorescente (*Red Fluorescent Protein*, RFP). Posteriormente, se transfectaron las células de glioma de rata C6 con dicho plásmido y se seleccionaron clones establemente transfectados, evaluándose en los mismos tanto la toxicidad del GCV como la expresión de la HSVtk.

#### **I. Construcción del plásmido pRFPHSVtk, transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones.**

##### **IA. Clonación del gen HSVtk.**

Para clonar el gen HSVtk, en primer lugar se amplificó el plásmido pUMVC1-tk (véase imagen 3 de la sección Material y Métodos), que contiene la secuencia completa del gen HSVtk. Este plásmido se amplificó mediante transformación bacteriana. La cepa transformada creció en medio LB (Luria Bertani) más kanamicina (50 µg/ml). Al cabo de 24 horas se purificó el DNA plasmídico, se digirió con la enzima de restricción *HindIII* y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En la figura 35a se observa que existen dos sitios de restricción para *HindIII* en el plásmido pUMVC1-tk, localizados a 1090 y 4013 pares de bases (pb), respectivamente. En la figura 35b se muestra el resultado de la electroforesis. Así, se observan 2 bandas, una

ligeramente superior a 2 Kb y otra ligeramente inferior a 3 Kb, que se ajustan a los fragmentos correspondientes al mapa de restricción para *Hind*III del vector pUMVC1-tk, es decir, 2 fragmentos de 2195 y 2923 pb, respectivamente.



**Figura 35. Clonación del plásmido pUMVC1-tk.**

(a) Estructura del plásmido pUMVC1-tk que contiene la secuencia codificadora de la timidina kinasa del virus del herpes simple (HSVtk). Se observa que posee dos sitios de restricción para *Hind*III, a la altura de 1090 y 4013 pares de bases, respectivamente. (b) El plásmido pUMVC1-tk, se amplificó mediante transformación bacteriana. Posteriormente, se purificó y se tomó una alícuota que se digirió con *Hind*III, observándose la aparición de dos bandas entre 2 y 3 Kb. Kb: Kilobases. M: Marcador de tamaño de DNA.

Una vez amplificado el plásmido pUMVC1-tk, se localizó en el mismo la secuencia correspondiente al gen HSVtk y se diseñaron oligonucleótidos que permitiesen amplificarla. En la figura 36a, correspondiente a la secuencia del plásmido pUMVC1-tk, está marcada en rojo y azul la secuencia del gen HSVtk, de manera que los nucleótidos que aparecen en azul corresponden a los extremos de dicha secuencia. En la figura 36b, se muestran los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen HSVtk, los cuales están constituidos por los nucleótidos que flanquean la secuencia de la HSVtk (en azul en la figura 36a) a los que se añadieron unas secuencias que contienen los sitios de restricción de las enzimas *Xho*I y *Bam*HI.

(a)

```

1 -----tcctttccat gggctctttc tgcagtcacc gtcgtcgacg
1081 gtatcgataa gcttgatagc ttcaccatgg cttcgtaccc cggccatcaa caccgcctg
1141 cgttcgacca ggctgcgctg tctcgcggcc atagcaaccg acgtacggcg ttgcgccctc
1201 gccgcgagca agaagccacg gaagtccgcc cggagcagaa aatgcccacg ctactcggg
1261 tttatataga cggccccacg gggatgggga aaaccaccac caccgcaactg ctgggtggccc
1321 tgggttcgcg cgacgatatc gtctacgtac ccgagccgat gacttactgg cgggtgctgg
1381 gggcttcgga gacaatcgcg aacatctaca ccacacaaca ccgcctcgac caggtgaga
1441 tatcggcccg ggacgcggcg gtgtaatga caagcgcaca gataacaatg ggcatgcctt
1501 atgccgtgac cgacgcgctt ctggctctc atatcggggg ggaggctggg agctcacatg
1561 ccccgcccc ggccctcacc ctcatcttcg accgccatcc catcgccgcc ctctgtgct
1621 acccgcccg gcggtacctt atgggcagca tgacccccca ggccgtgctg gcgttcgtgg
1681 ccctcatccc gccgacctg cccggcacca acatcgtgct tggggccctt cgggagaca
1741 gacacatcga ccgctggcc aaacgccagc gccccggcga gcggctggac ctggctatgc
1801 tggctgogat tcgccgctt tacgggttac ttgccaatac ggtgcggtat ctgcagtgcg
1861 gcgggtcgtg gcgggaggac tggggacagc tttcggggac ggccgtgccc ccccagggtg
1921 ccgagcccc gagcaacgcg ggccccagc cccatatcgg ggacacgtta tttacctgt
1981 ttcgggcccc cgagtgtctg gccccaacg gcgacctgta taactgttt gcctgggct
2041 tggacgtctt ggccaaacgc ctccgttcca tgcacgtctt tatcctgggt tacgaccaat
2101 cggcgcccg ctgcccgggac gccctgctgc aacttacctc cgggatggtc cagaccacg
2161 tcaccacccc cggctccata ccgacgatat gcgacctggc gcgacgctt gcccgggaga
2221 tgggggaggc taactgagat cttttccct ctgccaaaaa ttatggggac atcatgaagc
2281 ccctgagca tctgacttct ggctaataaa ggaatttat tttcattgca atagtgtgtt
-----5118

```

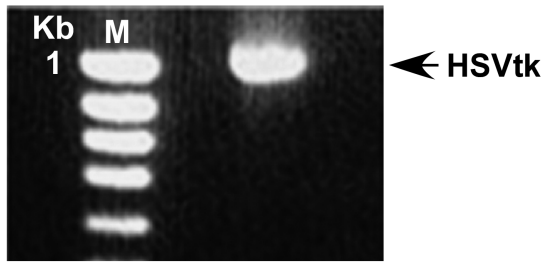
(b) 5'-CGC'TCGAGCGATGGCTTCGTACCCCGGC  
XhoI

3'-CCCCTCCGATTGACTATCCCTTAA'GG  
BamHI

**Figura 36. Secuencia de la HSVtk y oligonucleótidos diseñados para su amplificación.**

(a) En el vector pUMVC1-tk, se localizó la secuencia correspondiente a la HSVtk de 1131pb, señalada en azul y rojo. (b) A partir de los extremos de la secuencia de la HSVtk, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificarla, a los que se añadieron las secuencias de restricción de las enzimas XhoI y BamHI

A continuación se amplificó el gen de la HSVtk mediante PCR, tal y como se describe en Material y Métodos. Como molde se utilizó el plásmido pUMVC1-tk y como cebadores los oligonucleótidos de la figura 36b. El resultado de la PCR se observó en una electroforesis en gel de agarosa (figura 37), obteniéndose una banda de DNA ligeramente superior a 1 Kb, que corresponde con el tamaño del gen HSVtk, de 1,131 Kb.

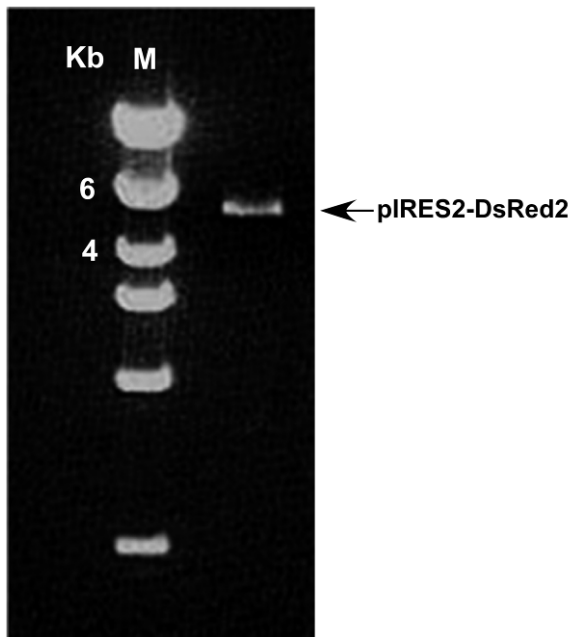


**Figura 37. Amplificación de la secuencia de la HSVtk**

Para amplificar la secuencia de la HSVtk, se utilizó como molde el plásmido pUMVC1-tk y como cebadores los especificados en la figura 36b. Se observa una banda ligeramente superior a 1 Kb, que corresponde con la secuencia de la HSVtk de 1,130 Kb. Kb: Kilobases. M: marcador de tamaño de DNA.

**IB. Clonación del vector que contiene la RFP, pIRES2-DsRed2.**

El vector pIRES2-DsRed2 (véase imagen 4 de la sección Material y Métodos) fue clonado utilizando la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. La cepa transformada creció en medio LB más kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Después de purificar el DNA plasmídico, se digirió con la enzima de restricción *EcoRI* y se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En la figura 38 se muestra el resultado de dicha electroforesis, observándose una banda situada entre 4 y 6 Kb, que se corresponde con el tamaño del vector pIRES2-DsRed2 de 5,3 Kb.

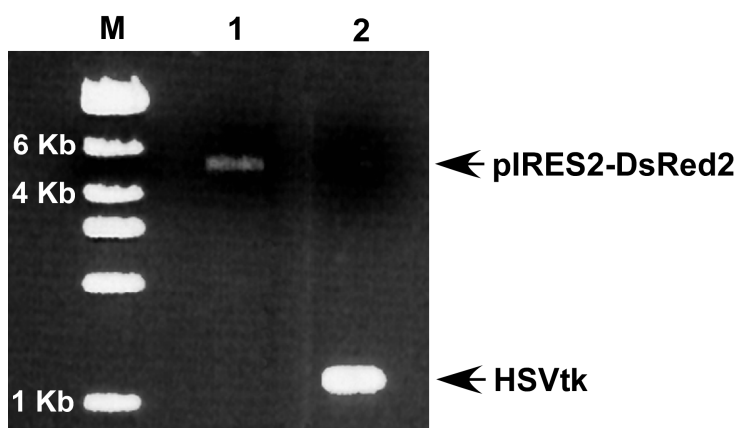


**Figura 38. Clonación del vector pIRES2-DsRed2.**

El vector pIRES2-DsRed2 fue clonado mediante transformación bacteriana. Posteriormente, se purificó y se tomó una alícuota que se digirió con la enzima *EcoRI*, observándose una banda entre 4 y 6 Kb que corresponde con el tamaño del plásmido pIRES2-DsRed2 de 5,3 Kb. Kb: Kilobases. M: marcador de tamaño de DNA.

### IC. Inserción de la secuencia de la HSVtk en el vector pIRES2-DsRed2.

Para llevar a cabo la inserción de la secuencia de la HSVtk en el vector pIRES2-DsRed2, se realizó una digestión enzimática, con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*, del gen HSVtk clonado con los extremos de restricción para estas enzimas, y del vector pIRES2-DsRed2, que posee un sitio de restricción para cada una de estas enzimas en su sitio de multiclonación (MCS) (véase imagen 4 de la sección Material y Métodos). Tras la digestión, el DNA se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, observándose el resultado en la figura 39. En el carril 1 se observa una banda situada entre 4 y 6 Kb, que se corresponde con el tamaño del vector pIRES2-DsRed2 de 5,3 Kb. Asimismo, se observa en el carril 2 una banda ligeramente superior a 1 Kb, que se corresponde con el tamaño de la secuencia de la HSVtk, que es de, aproximadamente, 1,131 Kb. Ambos fragmentos se purificaron para proceder a su ligación.

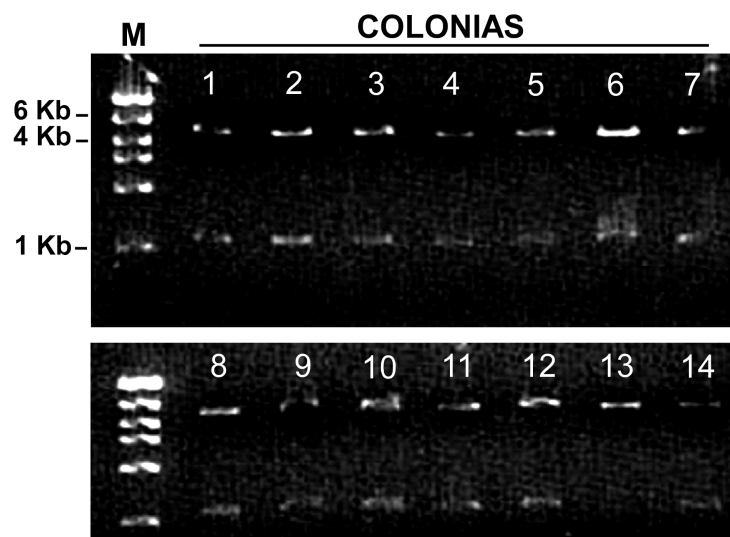


**Figura 39. Digestión enzimática del inserto HSVtk y del vector pIRES2-DsRed2, previamente amplificados.**

El inserto HSVtk, amplificado según se describe en la figura 37, y el vector pIRES2-DsRed2, se digirieron con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*. En el carril 1 se observa una banda entre 4 y 6 Kb que corresponde con el tamaño del plásmido pIRES2-DsRed2, de 5,3 Kb. En el carril 2 se observa una banda ligeramente superior a 1 Kb que corresponde al tamaño de la secuencia de la HSVtk de 1,130 Kb. Kb: Kilobases. M: marcador de tamaño de DNA.



Para la ligación, los fragmentos de la HSVtk y del vector pIRES2-DsRed2, obtenidos tras la digestión con *Xho*I y *Bam*HI, se incubaron en presencia de la ligasa T4, tal y como se describe en Material y Métodos. El producto de la ligación se sometió a transformación bacteriana utilizando la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Las bacterias se sembraron en placas de agar con medio LB más kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Al cabo de 24 horas se recogieron 20 colonias y se incubaron en medio LB más kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Posteriormente, se extrajo el DNA plasmídico de cada una de estas colonias y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa, digiriéndolo previamente con *Xho*I y *Bam*HI. En la figura 40 se observa la electroforesis correspondiente a 14 de las 20 colonias seleccionadas. Así, se comprueba que la colonia 13 no incorporó la construcción plasmídica, a la que denominaremos pRFPHSVtk por contener la secuencia de la RFP y la secuencia de la HSVtk. Sin embargo, el resto de colonias sí lo hicieron, puesto que se observan 2 bandas: una situada entre 4 y 6 Kb, correspondiente al fragmento del vector pIRES2-DsRed2 y otra ligeramente superior a 1 Kb, correspondiente al inserto, HSVtk. Se seleccionó una de ellas, en concreto la colonia número 2.



**Figura 40. Resultado de la ligación entre el inserto HSVtk y el vector pIRES2-DsRed2.**

A partir de los productos de digestión con *Xho*I y *Bam*HI del inserto HSVtk y del vector pIRES2-DsRed2, se llevó a cabo la ligación de los mismos. El producto de la ligación se sometió a transformación bacteriana, se seleccionaron las colonias que crecieron en medio selectivo y se purificó el DNA plasmídico. Éste, se digirió con las enzimas *Xho*I y *Bam*HI y se separó en un gel de agarosa cuyo resultado se muestra en la imagen. Kb: Kilobases. M: marcador de tamaño de DNA.

Una vez seleccionada la colonia número 2, que contenía la construcción pRFPHSVtk, se amplificó con el fin de incrementar la cantidad de plásmido. Esta colonia creció en medio LB más kanamicina (50 µg/ml) durante 24 horas y después, se extrajo el DNA plasmídico. Posteriormente se determinó la concentración de plásmido obtenida y, a continuación, se secuenció en dicho plásmido el inserto correspondiente a la HSVtk, en el Servicio de Secuenciación Automática de la Universidad de Salamanca (Edificio Departamental, Salamanca, España), utilizando los oligonucleótidos especificados en la sección Material y Métodos (apartado 3.2.8.6.). La secuencia obtenida (R.S., Resultado de la Secuenciación) se alineó con la secuencia de la HSVtk contenida en el plásmido pUMVC1-tk (S.P., Secuencia del Plásmido) utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>), obteniéndose un 100 % de homología. El resultado del alineamiento se observa en la figura 41.

S.P.	1	ATGGCTTCGTACCCCGGCCATCAACACGCGCCTGCGTTCGACCAGGCTGCGCGTTCTCGC	60
R.S.	1	ATGGCTTCGTACCCCGGCCATCAACACGCGCCTGCGTTCGACCAGGCTGCGCGTTCTCGC	60
S.P.	61	GGCCATAGCAACCGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTC	120
R.S.	61	GGCCATAGCAACCGACGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTC	120
S.P.	121	CGCCCGGAGCAGAAAATGCCACGCTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCCCACGGGATG	180
R.S.	121	CGCCCGGAGCAGAAAATGCCACGCTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCCCCACGGGATG	180
S.P.	181	GGGAAAACCAACACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTTCGCGCGACGATATCGTCTAC	240
R.S.	181	GGGAAAACCAACACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTTCGCGCGACGATATCGTCTAC	240
S.P.	241	GTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGGCTTCCGAGACAAATCGCGAACATC	300
R.S.	241	GTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCGGGTGTGGGGGCTTCCGAGACAAATCGCGAACATC	300
S.P.	301	TACACCACACAACCCGCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGACGCGCGGGTGGTA	360
R.S.	301	TACACCACACAACCCGCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGACGCGCGGGTGGTA	360
S.P.	361	ATGACAAGCGCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCGTTCCTGGCT	420
R.S.	361	ATGACAAGCGCCAGATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCGTTCCTGGCT	420
S.P.	421	CCTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCGCCCCCGGCCCTCACCTTCATC	480
R.S.	421	CCTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCACATGCCCGCCCCCGGCCCTCACCTTCATC	480
S.P.	481	TTCGACCGCCATCCCATCGCCGCGCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTACCTTATGGGC	540
R.S.	481	TTCGACCGCCATCCCATCGCCGCGCTCCTGTGCTACCCGGCCGCGCGGTACCTTATGGGC	540
S.P.	541	AGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTGGCCCTCATCCCGCGACCTTGCCCGGC	600
R.S.	541	AGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTCGTGGCCCTCATCCCGCGACCTTGCCCGGC	600
S.P.	601	ACCAACATCGTGCTTGGGGCCCTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCCTGGCCAAACGC	660
R.S.	601	ACCAACATCGTGCTTGGGGCCCTCCGGAGGACAGACACATCGACCGCCTGGCCAAACGC	660
S.P.	661	CAGCGCCCCGGGAGCGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTGCGCCGCTTACGGG	720
R.S.	661	CAGCGCCCCGGGAGCGGCTGGACCTGGCTATGCTGGCTGCGATTGCGCCGCTTACGGG	720
S.P.	721	CTACTTGCCAAATACGGTGCGGTATCTGCAGTGCGGCGGGTTCGTGGCGGGAGGACTGGGGA	780
R.S.	721	CTACTTGCCAAATACGGTGCGGTATCTGCAGTGCGGCGGGTTCGTGGCGGGAGGACTGGGGA	780
S.P.	781	CAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCAGAGCAACGCGGGCCCA	840
R.S.	781	CAGCTTTCGGGGACGGCCGTGCCGCCCCAGGGTGCCGAGCCCAGAGCAACGCGGGCCCA	840
S.P.	841	CGACCCCATATCGGGGACACGTTATTTACCTGTTTCGGGCCCCCGAGTTGCTGGCCCCC	900
R.S.	841	CGACCCCATATCGGGGACACGTTATTTACCTGTTTCGGGCCCCCGAGTTGCTGGCCCCC	900
S.P.	901	AACGGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCTTGGACGCTTGGCCAAACGCTCCGT	960
R.S.	901	AACGGCGACCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCTTGGACGCTTGGCCAAACGCTCCGT	960
S.P.	961	TCCATGCACGCTTTTATCCTGGGTTACGACCAATCGCCCGCCGGCTGCCGGGACGCCCTG	1020
R.S.	961	TCCATGCACGCTTTTATCCTGGGTTACGACCAATCGCCCGCCGGCTGCCGGGACGCCCTG	1020
S.P.	1021	CTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCCACGTCACCACCCCGGCTCCATACCGACG	1080
R.S.	1021	CTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACCCACGTCACCACCCCGGCTCCATACCGACG	1080
S.P.	1081	ATATGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGA 1131	
R.S.	1081	ATATGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTGA 1131	

**Figura 41. Resultado del alineamiento de la secuencia de la HSVtk, contenida en el plásmido pRFPHSVtk, con la secuencia de la HSVtk contenida en el plásmido pUMVC1-tk.**

La secuencia de la HSVtk obtenida mediante secuenciación automática a partir de la construcción plasmídica pRFPHSVtk (R.S.: Resultado de la Secuenciación) y la secuencia de la HSVtk contenida en el plásmido comercial pUMVC1-tk (S.P.: Secuencia del Plásmido), se alinearon utilizando el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). El resultado del alineamiento muestra un 100 % de homología.

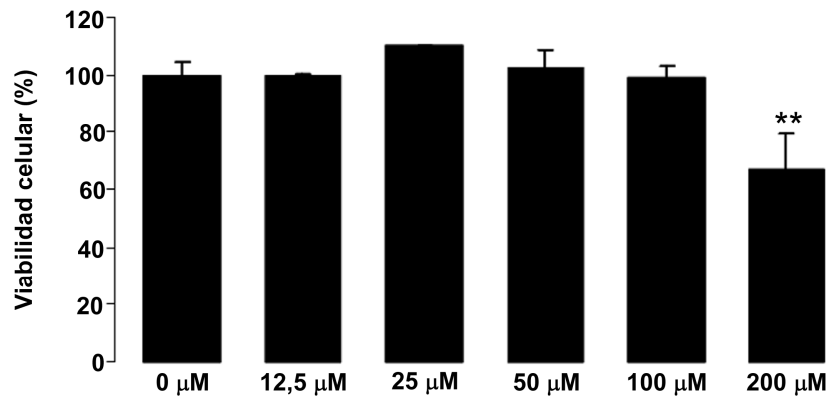
## **ID. Transfección de las células de glioma de rata C6 y selección de clones.**

Una vez obtenida la construcción plasmídica pRFPHSVtk, se transfectaron las células de glioma de rata C6 con este plásmido así como con el plásmido vacío, pIRES2-DsRed2. Una vez transfectadas las células, se seleccionaron clones establemente transfectados, tal y como se describe en Material y Métodos. A los clones transfectados con pIRES2-DsRed2 se les denominó C6IRES 6A, C6IRES 3B y a aquéllos transfectados con pRFPHSVtk se les denominó C6TK 6A, C6TK 6B y C6TK 2B. Es importante señalar que, a pesar de que inicialmente las células transfectadas emitían fluorescencia, ésta resultó ser muy débil y se perdió al cabo de varios días.

## **II. Estudio de la toxicidad del ganciclovir y determinación de la dosis óptima.**

En primer lugar se estudió la toxicidad del GCV en las células de glioma de rata C6 sin transfectar, con el objetivo de seleccionar la máxima concentración de GCV. Para ello, las células de glioma de rata C6 se sembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Pasados tres días, se inició el tratamiento con concentraciones crecientes de GCV (0-200 µM). Al cabo de cuatro días de tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante el método MTT. Así, se midió la absorbancia a 570 nm, la cual es indicativa de las células vivas presentes en cada caso. A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de viabilidad celular para cada concentración de GCV con respecto a la ausencia de tratamiento (0 µM).

En la figura 42 se puede observar que las concentraciones de GCV comprendidas entre 12,5 y 100 µM no modificaron de forma significativa el porcentaje de viabilidad de las células de glioma de rata C6. Sin embargo, el tratamiento de estas células con GCV 200 µM promovió una reducción significativa de la viabilidad celular en torno al 30 %. Por esta razón, se eligió la concentración de GCV 100 µM, no tóxica en las células no transfectadas, para evaluar la toxicidad del mismo en los clones de células de glioma de rata C6 transfectados con la construcción plasmídica pRFPHSVtk y así seleccionar el clon más sensible al GCV.



**Figura 42. Evaluación de la toxicidad del ganciclovir en las células de glioma de rata C6.**

Las células de glioma de rata C6 se sembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Pasados tres días, se inició el tratamiento con concentraciones crecientes de ganciclovir (0-200 μM). Después de cuatro días, se determinó el porcentaje de viabilidad celular, respecto a la ausencia de tratamiento, mediante el método del MTT. Los resultados son medias ± SEM. La significatividad de las diferencias con respecto a la ausencia de tratamiento se expresa como \*\* p≤0,01 (tes t de Student).

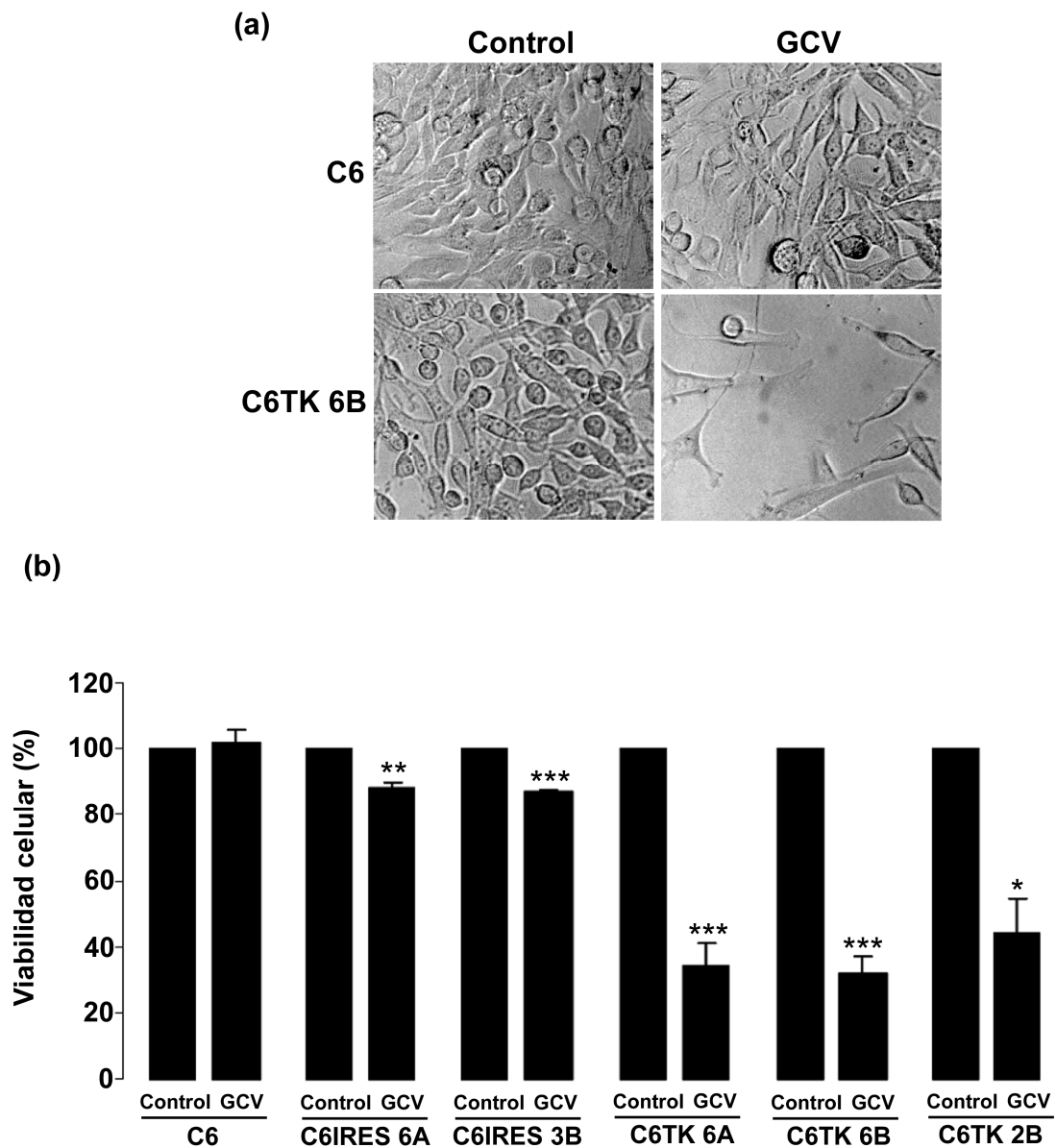
El siguiente objetivo fue, por tanto, evaluar si los clones de células transfectadas con la construcción pRFPHSVtk, eran sensibles al tratamiento con GCV 100 μM. Para ello, se sembraron las células de glioma de rata C6 no transfectadas, así como los clones celulares C6IRES 6A, C6IRES 3B, C6TK 6A, C6TK 6B y C6TK 2B a una densidad celular de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Pasados tres días se incubaron las células en ausencia (control) o en presencia de GCV 100 μM. Después de cuatro días de tratamiento se determinó la viabilidad celular mediante el método del MTT.

En la figura 43a se muestran imágenes de contraste de fases de las células de glioma de rata C6 y del clon C6TK 6B, incubadas en ausencia (control) o en presencia de GCV 100 μM. Como se puede apreciar, en el caso de las células de glioma C6 la densidad celular en la situación control y en presencia de GCV fue muy similar, mientras que en el caso del clon C6TK 6B se observa, claramente, que el tratamiento con GCV 100 μM causó una reducción en la densidad celular con respecto a la situación control. Por otro lado, en la figura 43b, que recoge la cuantificación de los resultados obtenidos, se observa nuevamente, que en las células de glioma de rata C6

el tratamiento con GCV 100  $\mu$ M no modificó la viabilidad celular con respecto a la situación control. Por otro lado, en el caso de los clones C6IRES 6A y C6IRES 3B el tratamiento con GCV 100  $\mu$ M causó cierto efecto tóxico, reduciendo significativamente la viabilidad celular con respecto a la situación control, en un 10-12 %. Finalmente, en el caso de los clones C6TK 6A, C6TK 6B y C6TK 2B, el tratamiento con GCV 100  $\mu$ M promovió una reducción mayor en la viabilidad celular. De hecho, esta reducción estuvo en torno al 65-67 % en el caso de los clones C6TK 6A y C6TK 6B y fue del 55 % en el caso del clon C6TK 2B. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó el clon C6TK 6B para la realización de los experimentos posteriores, pasando a llamarse C6TK.

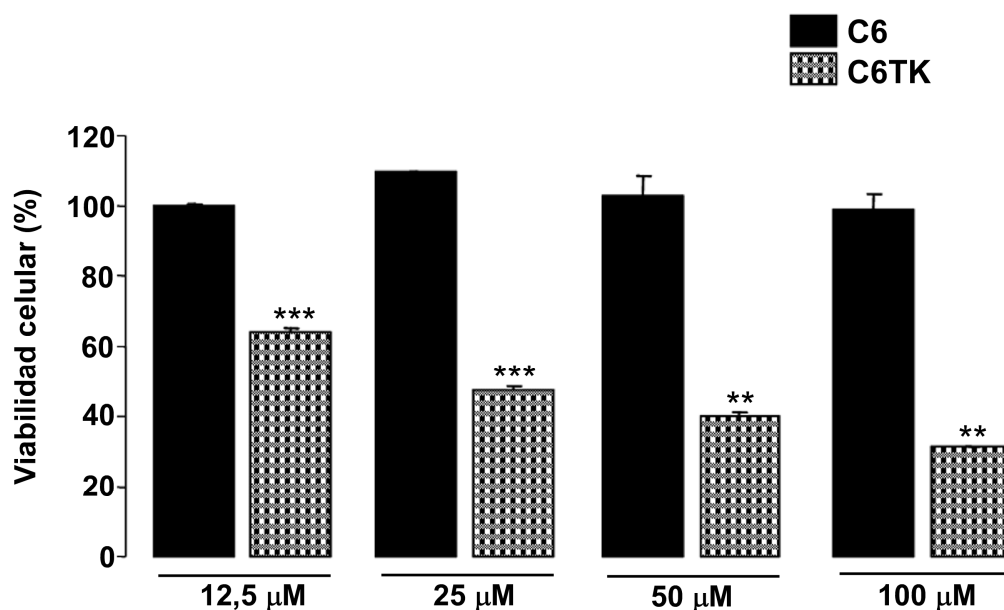
A continuación, se realizó un ensayo dosis-respuesta de GCV en el clon C6TK seleccionado. Para ello, las células de glioma de rata C6 y las células C6TK se sembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Pasados tres días, las células se incubaron en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de GCV (12,5-100  $\mu$ M). Después de cuatro días se determinó el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la ausencia de tratamiento, mediante el método del MTT.

En la figura 44 se puede observar que, en el caso de las células de glioma de rata C6, el porcentaje de viabilidad celular para todas y cada una de las concentraciones de GCV estuvo en torno al 100 %. Sin embargo, en el caso de las células C6TK, el porcentaje de viabilidad celular fue significativamente inferior con respecto a las células de glioma C6, para todas las concentraciones de GCV. Así, la diferencia fue de un 35 % para la concentración 12,5  $\mu$ M, de más del 50 % en el caso de la concentración 25  $\mu$ M, del 60 % para la concentración 50  $\mu$ M y, finalmente, del 70 % para la concentración 100  $\mu$ M. De esta forma, se pudo comprobar que la concentración 100  $\mu$ M de GCV fue la más eficaz para el clon C6TK.



**Figura 43. Evaluación de la toxicidad del ganciclovir en diferentes clones de células de glioma de rata C6.**

Las células de glioma de rata C6 y los clones C6IRES 6A, C6IRES 3B, C6TK 6A, C6TK 6B y C6TK 2B, se resemebraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Pasados tres días, se inició el tratamiento con ganciclovir (GCV) 100  $\mu$ M. Después de cuatro días de tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante el método del MTT. **(a)** Fotomicrografías de contraste de fases, de las células de glioma de rata C6 y del clon C6TK 6B en ausencia (control) o en presencia de GCV 100  $\mu$ M. Barra=30  $\mu$ m. **(b)** Representación del porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas con ganciclovir con respecto a la situación control (ausencia de tratamiento). Los datos corresponden a medias  $\pm$  SEM. La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$  (test t de Student).



**Figura 44. Efecto de la concentración del ganciclovir en la viabilidad de las células C6TK.**

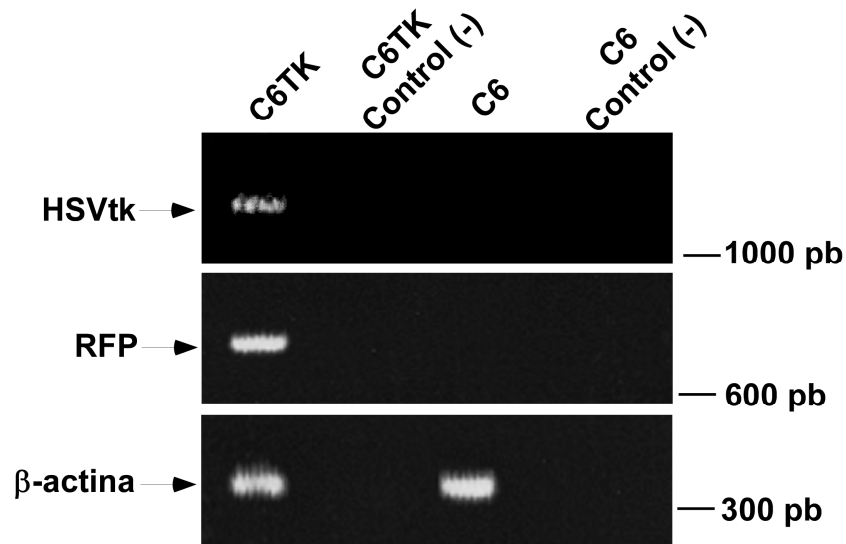
Las células de glioma de rata C6 y las células C6TK, se resembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Pasados tres días, las células se incubaron en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de ganciclovir (12,5-100 μM). Después de cuatro días de tratamiento, se aplicó el método del MTT. La gráfica representa, para cada concentración de ganciclovir, el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la ausencia de tratamiento. Los datos corresponden a medias ± SEM. La significatividad de las diferencias respecto a las células de glioma C6 se expresa como \*\*\* p≤0,001 y \*\* p≤0,01 (test t de Student).

### III. Estudio de la expresión de la timidina kinasa del virus del herpes simple.

Una vez comprobado que las células de glioma C6TK eran sensibles al tratamiento con GCV, se estudió la expresión de la HSVtk y de la proteína roja fluorescente (RFP) en estas células. Para ello se extrajo el RNA total de las células de glioma C6 y C6TK, se trató con DNAsa y se llevó a cabo una RT-PCR, utilizando los oligonucleótidos correspondientes descritos en la sección Material y Métodos. Como control de carga se amplificó la β-actina. En la figura 45 se observa que las células C6TK expresaron la HSVtk, como muestra la aparición de una banda ligeramente superior a 1000 pb, que se corresponde con el tamaño de la HSVtk (1100 pb). Además, también se detectó la expresión de la RFP, como muestra la aparición de una banda situada por encima de 600 pb, que se corresponde con el tamaño del RNA mensajero de esta proteína de 677 pb. Se llevó a cabo también la RT-PCR, utilizando



como molde de la PCR el RNA tratado con DNAsa (control negativo). En este caso no existió amplificación. Por otro lado, en el caso de las células de glioma de rata C6 sin transfectar no se detectó expresión ni de la HSVtk ni de la RFP, pero sí de la  $\beta$ -actina.



**Figura 45. Estudio de la expresión de la timidina kinasa del virus del herpes simple y de la proteína roja fluorescente.**

El RNA total de las células de glioma de rata C6 y C6TK se extrajo según se describe en Material y Métodos. Posteriormente, se llevó a cabo la retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando, en cada caso, los oligonucleótidos correspondientes a la timidina kinasa del virus del herpes simple (HSVtk), la proteína roja fluorescente (RFP) y la  $\beta$ -actina. El producto de la amplificación se cargó en un gel de agarosa del 1%. Los controles negativos hacen referencia a la utilización del RNA tratado con DNAsa, como molde en la PCR. Las bandas presentan unos tamaños de 1100 pb (HSVtk), 677 pb (RFP) y 314 pb ( $\beta$ -actina).

#### 4.3.1.2. Estudio del efecto *bystander* del db-cAMP en células de glioma de rata C6. Implicación de las *gap junctions*.

Una vez establecido el modelo experimental de terapia génica suicida, se comenzó a estudiar el posible desarrollo del efecto *bystander* del db-cAMP en nuestro modelo. Algunos autores han observado previamente que el cAMP promueve el desarrollo del efecto *bystander* a través de las *gap junctions* (Carystinos *et al.*, 1999) en diferentes tipos de células, incluidas las células de glioma de rata C6 (Robe *et al.*,

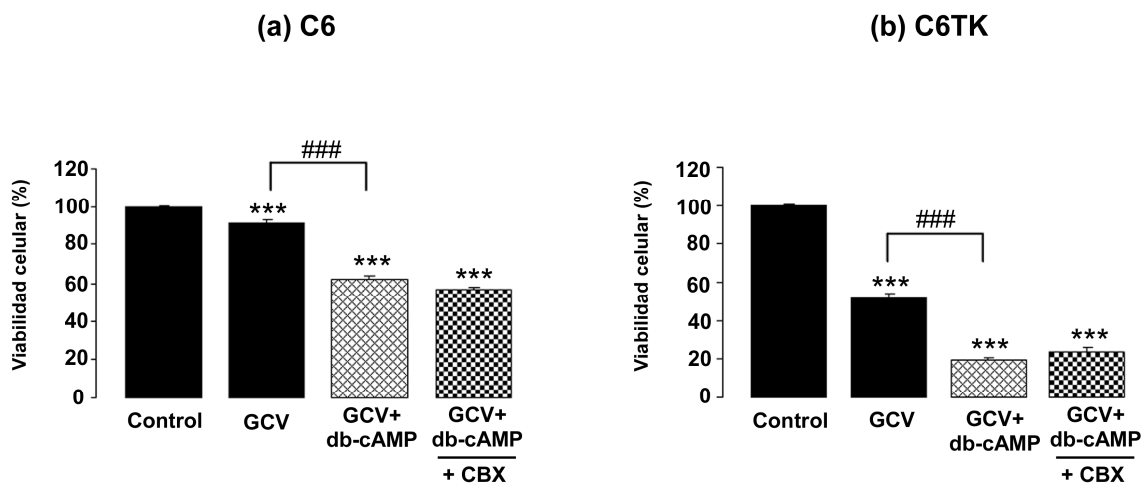
2000). De esta forma, el db-cAMP podría ser un buen control positivo para el estudio posterior del efecto *bystander* de la tolbutamida.

Para ello, se llevaron a cabo cultivos de células de glioma C6 y de células de glioma C6TK. Además, para simular una situación que permitiese estudiar el efecto *bystander*, se prepararon cocultivos de células C6TK y C6 en una proporción 10:90 (C6TK:C6), de forma que únicamente el 10 % de las células expresaran la HSVtk y el GCV trifosforilado pudiese difundir desde las células HSVtk positivas hasta las HSVtk negativas. En todos los casos las células se sembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup> y, pasados dos días, se incubaron en ausencia o en presencia de db-cAMP 1 mM. Al cabo de 24 horas se cambió el medio y se incubaron las células en ausencia (control) o en presencia de GCV 100 μM. Dos días después se repitió la dosis de GCV 100 μM. Al cabo de cuatro días del inicio del tratamiento con GCV, se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante el método del MTT. Además, para conocer la posible implicación de las *gap junctions* en el efecto *bystander*, en otra de las condiciones experimentales se incubaron las células pretratadas con db-cAMP, con carbenoxolona (CBX) 50 μM, un conocido inhibidor de las *gap junctions* (Davidson and Baumgarten, 1988; Goldberg *et al.*, 1996), de forma conjunta con el GCV.

En la figura 46a se representan los datos obtenidos para el cultivo de células de glioma de rata C6. De esta forma, se observa que el tratamiento de estas células con GCV promovió una reducción en la viabilidad celular respecto al control de un 10 %, aproximadamente. Por otro lado, cuando estas células se trataron con la mezcla de GCV más db-cAMP o con la mezcla de GCV más db-cAMP más CBX, la viabilidad con respecto a la situación control se redujo casi en un 40 % en el primer caso y en torno al 45 % en el segundo. Además, el análisis estadístico de los resultados demostró que la diferencia en el porcentaje de viabilidad celular entre las células tratadas con GCV y las tratadas con la mezcla de GCV más db-cAMP, es estadísticamente significativa y se situó en torno a un 30 %.

En el caso del cultivo de células de glioma de rata C6TK, como se observa en la figura 46b, el tratamiento con GCV, con la mezcla de GCV más db-cAMP o con la mezcla de GCV más db-cAMP más CBX, redujo significativamente la viabilidad celular con respecto al control. De esta forma, la reducción resultó ser de un 50 % cuando las células se trataron con GCV, mientras que el tratamiento con GCV más db-cAMP o

con la mezcla de GCV más db-cAMP más CBX promovió una reducción en la viabilidad celular en torno al 80 %. Además, la diferencia en el porcentaje de viabilidad entre las células tratadas con GCV y aquellas tratadas con la mezcla de GCV más db-cAMP, que fue de un 30 %, resultó ser estadísticamente significativa.

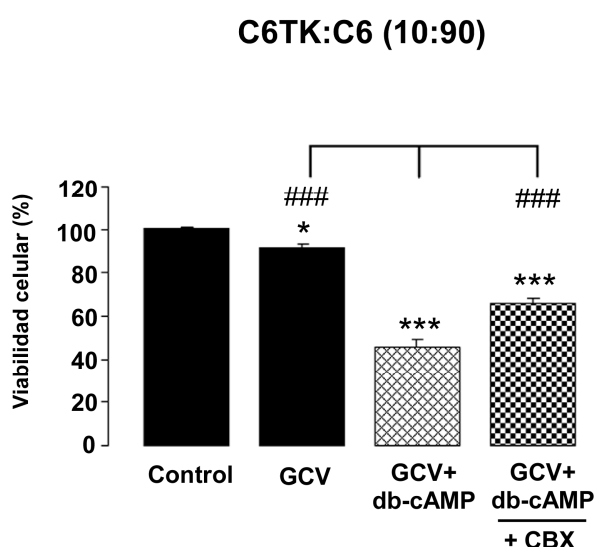


**Figura 46. Estudio del efecto del ganciclovir, el db-cAMP y la carbenoxolona sobre la viabilidad de las células de glioma de rata C6 y C6TK.**

Las células de glioma de rata C6 (a) y C6TK (b) se resembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Dos días después, las células se incubaron en ausencia o en presencia de db-cAMP 1 mM. Pasadas 24 horas, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de ganciclovir (GCV) 100 μM o de ganciclovir 100 μM más carbenoxolona (CBX) 50 μM, repitiéndose la dosis de ganciclovir dos días después. Al cabo de cuatro días del inicio del tratamiento con GCV, se determinó la viabilidad celular mediante el método del MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad respecto al control y son medias ± SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\* p≤0,001 y respecto a GCV + db-cAMP se expresa como ### p≤0,001 (One-way ANOVA. Bonferroni post-test).

En la figura 47 están recogidos los resultados del estudio en los cocultivos con un 10 % de células timidina kinasa positivas. De esta forma se puede observar que el tratamiento único con GCV redujo de forma significativa la viabilidad celular respecto al control en un 8 %. Por otro lado, esta reducción resultó ser de un 55 % cuando las células se trataron con la mezcla de GCV más db-cAMP. Además, cuando las células se trataron con la mezcla de GCV más db-cAMP más CBX, la reducción en el porcentaje de viabilidad no fue tan elevada como en el caso del tratamiento con GCV más db-cAMP, y estuvo en torno al 35 %. Por otro lado, el análisis estadístico de la

significatividad de los resultados respecto al tratamiento con GCV más db-cAMP, indica que las diferencias con el tratamiento único con GCV o con la mezcla de GCV más db-cAMP más CBX, son estadísticamente significativas. Por tanto, la presencia de db-cAMP mejoró la eficacia del GCV, 4, en torno a 2 y en torno a 7 veces en los cultivos de células C6, C6TK y en los cocultivos, respectivamente. Además, la inhibición de las *gap junctions* por la CBX no modificó significativamente la eficacia del tratamiento con GCV más db-cAMP en las células C6 y C6TK. Sin embargo, en los cocultivos la presencia de CBX redujo en un 36 % la eficacia del tratamiento con GCV más db-cAMP.



**Figura 47. Estudio del efecto *bystander* del db-cAMP en las células de glioma de rata C6 y C6TK.**

La mezcla de células de glioma de rata C6TK y C6 se resembró en una proporción 10:90 (C6TK 6B:C6) a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Dos días después, las células se incubaron en ausencia o en presencia de db-cAMP 1 mM. Pasadas 24 horas, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de ganciclovir (GCV) 100 μM o ganciclovir 100 μM más carbenoxolona (CBX) 50 μM, repitiéndose la dosis de ganciclovir dos días después. Al cabo de cuatro días del inicio del tratamiento con ganciclovir, se determinó la viabilidad celular mediante el método del MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad respecto al control y son medias ± SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\* p≤0,001 y \* p≤0,05 y respecto a GCV + db-cAMP se expresa como ### p≤0,001 (*One-way ANOVA*. Bonferroni post-test).

#### 4.3.1.3. Estudio del efecto *bystander* de la tolbutamida en células de glioma de rata C6. Implicación de las *gap junctions*.

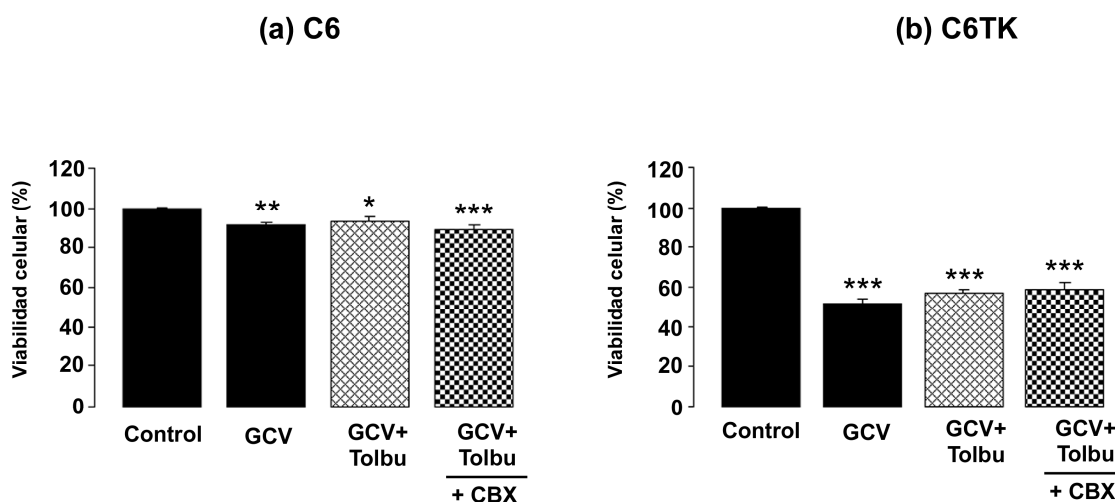
Para dilucidar si la tolbutamida promovía el desarrollo del efecto *bystander* en las células de glioma de rata C6, se llevaron a cabo cultivos de células de glioma C6 y de células de glioma C6TK y cocultivos de estas mismas células en una proporción

10:90 (C6TK:C6). En todos los casos las células se sembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup> y, pasados dos días, se incubaron en ausencia o en presencia de tolbutamida 400 µM. Al cabo de 24 horas, se cambió el medio y se incubaron las células en ausencia (control) o en presencia de GCV 100 µM o de GCV 100 µM más tolbutamida 400 µM. Dos días después se repitió la dosis de GCV 100 µM. Al cabo de cuatro días del inicio del tratamiento con GCV se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante el método del MTT. Además, para conocer la posible implicación de las *gap junctions* en el efecto *bystander*, en otra de las condiciones experimentales se incubaron las células, pretratadas con tolbutamida, con carbenoxolona (CBX) 50 µM, de forma conjunta con el GCV y la tolbutamida.

En la figura 48a, se observa que el tratamiento de las células de glioma de rata C6 con GCV, con GCV más tolbutamida o con GCV más tolbutamida más CBX, promovió una reducción significativa de la viabilidad celular que, en los tres casos, estuvo entre el 5 y el 10 %, aproximadamente. Por otro lado, en la figura 48b, se puede apreciar que el tratamiento de las células de glioma de rata C6TK con GCV, con la mezcla de GCV más tolbutamida o con la mezcla de GCV más tolbutamida más CBX, promovió una reducción significativa de la viabilidad celular que se situó en torno al 42-49 %, aproximadamente.

La figura 49 recoge los resultados del efecto de la tolbutamida en cocultivos de células de glioma C6TK y C6 con una proporción 10:90 (C6TK:C6). Se puede comprobar que el tratamiento de estas células con GCV promovió una reducción en la viabilidad celular respecto al control, de un 8 %, aproximadamente. Por otro lado, en el caso del tratamiento con la mezcla de GCV más tolbutamida, la reducción en la viabilidad celular respecto al control estuvo en torno al 17 %. Además, cuando las células se trataron con la mezcla de GCV más tolbutamida más CBX la reducción en la viabilidad celular fue tan sólo del 5 %.

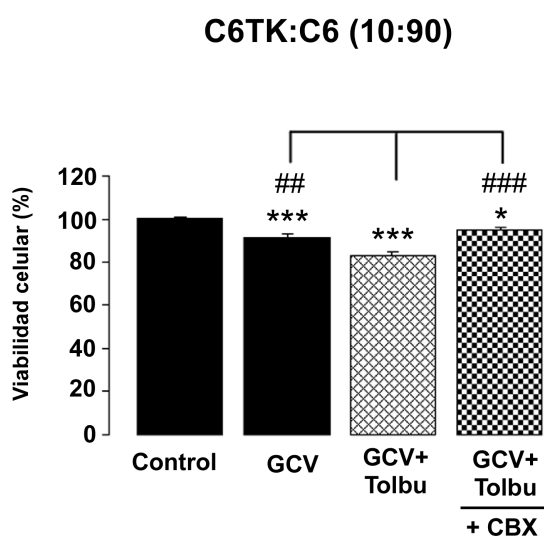
Por tanto, la presencia de tolbutamida duplicó la eficacia del ganciclovir en el cocultivo C6TK:C6, sin modificar la eficacia en los cultivos independientes de células C6 y C6TK. Además, la inhibición de las *gap junctions* por la CBX, revirtió el efecto de la tolbutamida en el cocultivo y no modificó el efecto en los cultivos independientes de células C6 y C6TK.



**Figura 48. Estudio del efecto del ganciclovir, la tolbutamida y la carbenoxolona sobre la viabilidad de las células de glioma de rata C6 y C6TK.**

Las células de glioma de rata C6 **(a)** y C6TK **(b)** se resembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Dos días después, las células se incubaron en ausencia o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M. Pasadas 24 horas, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de ganciclovir (GCV) 100  $\mu$ M, de ganciclovir 100 + tolbutamida 400  $\mu$ M o de ganciclovir 100  $\mu$ M más tolbutamida 400  $\mu$ M más carbenoxolona (CBX) 50  $\mu$ M, repitiéndose la dosis de ganciclovir dos días después. Al cabo de cuatro días del inicio del tratamiento con ganciclovir, se determinó la viabilidad celular mediante el método del MTT. Los resultados se expresan con porcentaje de viabilidad respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$  y \*  $p \leq 0,05$  (*One-way ANOVA*. Bonferroni post-test).

**Figura 49. Estudio efecto *bystander* de la tolbutamida en las células de glioma de rata C6 y C6TK.**



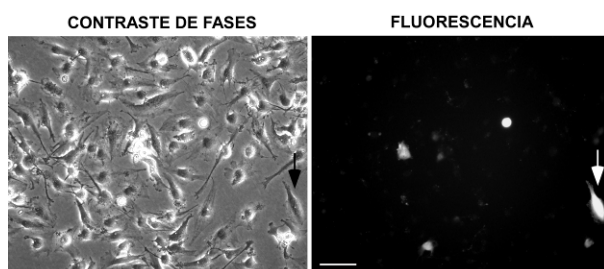
La mezcla de células de glioma de rata C6TK y C6 se resembró en una proporción 10:90 (C6TK:C6) a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Dos días después, las células se incubaron en ausencia o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M. Pasadas 24 horas, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de ganciclovir (GCV) 100  $\mu$ M, de ganciclovir 100  $\mu$ M más tolbutamida 400  $\mu$ M o de ganciclovir 100  $\mu$ M más tolbutamida 400  $\mu$ M más carbenoxolona (CBX) 50  $\mu$ M, repitiéndose la dosis de ganciclovir dos días después. Al cabo de cuatro días del inicio del tratamiento con ganciclovir se determinó la viabilidad celular mediante el método del MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad respecto al control y son medias  $\pm$  SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\*  $p \leq 0,001$  y \*  $p \leq 0,05$  y respecto a GCV + tolbu se expresa como ###  $p \leq 0,001$  y ##  $p \leq 0,01$  (*One-way ANOVA*. Bonferroni post-test).

### 4.3.2. Terapia génica suicida en células de glioma humano U373.

Una vez diseñado el modelo experimental de terapia génica suicida en células de glioma de rata C6, y comprobado que en dicho modelo, tanto la tolbutamida como el db-cAMP mejoraban la eficacia de la terapia génica suicida, el siguiente objetivo fue la aplicación de este modelo a las células de glioma humano U373, con objeto de estudiar el efecto de la tolbutamida en la eficacia de la terapia génica suicida.

#### 4.3.2.1. Estudio de la toxicidad del ganciclovir en células de glioma humano U373.

En primer lugar nos propusimos la obtención de un clon de células de glioma humano U373 que expresara el gen de la HSVtk y, por tanto, que fuera altamente sensible al GCV. Para ello, las células de glioma humano U373 se transfectaron con la construcción plasmídica pRFPHSVtk. En la figura 50 se muestran imágenes de contraste de fases y de fluorescencia, al cabo de 48 horas de transfección. Así, se puede observar que algunas células emiten fluorescencia. No obstante, al igual que ocurrió en las células de glioma de rata C6, esta fluorescencia fue, en general, poco intensa y se perdió al cabo de varios días. Tal y como se describe en Material y Métodos, se seleccionaron clones establemente transfectados, a los que se denominó: U373TK H, U373TK I y U373TK G. A continuación, se evaluó el efecto del GCV en dichos clones, para lo cual las células de glioma humano U373 y los clones seleccionados se sembraron a una densidad de 1100 células/cm<sup>2</sup>. Pasados tres días, se cambió el medio y se incubaron las células en ausencia (control) o en presencia de GCV 100 µM. Al cabo de cuatro días de tratamiento, se aplicó el método del MTT determinándose la absorbancia a 570 nm y, posteriormente, se calculó el porcentaje de viabilidad celular con respecto a la situación control.

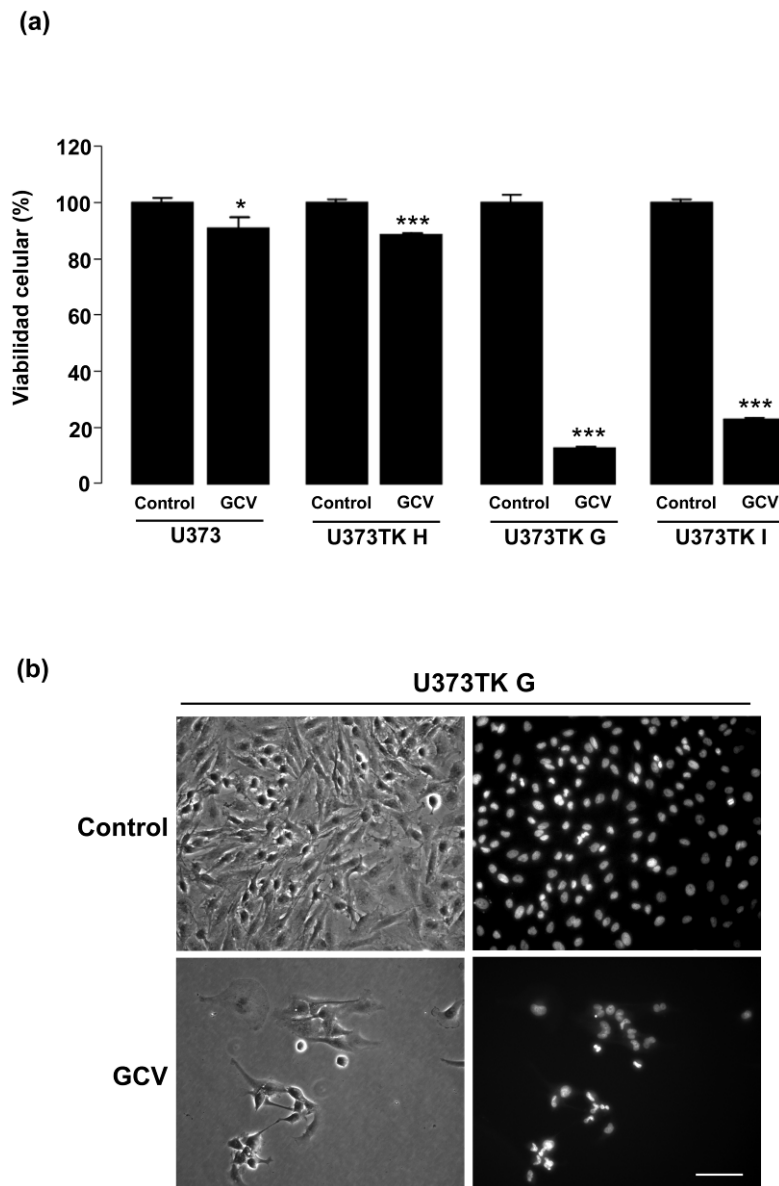


**Figura 50. Transfección de las células de glioma humano U373 con el plásmido pRFPHSVtk.**

Las células de glioma humano U373 se transfectaron con el plásmido pRFPHSVtk. Transcurridas 48 horas, las células se visualizaron con la ayuda de un microscopio de fluorescencia y se tomaron imágenes de contraste de fases y de la emisión de fluorescencia. Barra=40 µm.

En la figura 51a se observa que, en las células de glioma humano U373, el GCV promovió cierto efecto tóxico, puesto que la viabilidad celular se redujo un 10 % con respecto a la situación control. Por otro lado, se observa que los clones U373TK H, U373TK G y U373TK I presentaron diferente sensibilidad al GCV. De esta forma, el tratamiento del clon U373TK H con GCV promovió una reducción en la viabilidad celular muy similar a la promovida en las células U373, es decir, en torno al 10 %. En el caso del clon U373TK G, el tratamiento con GCV promovió una reducción en la viabilidad celular de un 85 %, mientras que, en el clon U373TK I, dicha reducción estuvo en torno al 75 %. En la figura 51b se observan imágenes de contraste de fases y de tinción con DAPI de las células U373TK G en la situación control y en presencia de GCV. En este sentido, se puede apreciar que el número total de células fue muy inferior en el caso de las células tratadas con GCV con respecto a la situación control. Además, se puede observar que las células tratadas con GCV presentaron una tinción con DAPI mucho más intensa que las células control. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó el clon U373TK G para llevar a cabo el estudio del efecto de la tolbutamida en la terapia génica suicida. Este clon pasó a denominarse, simplemente, U373TK.





**Figura 51. Evaluación de la toxicidad del ganciclovir en diferentes clones de células de glioma humano U373.**

Las células de glioma humano U373 y los clones U373TK H, U373TK G y U373TK I se sembraron a una densidad 1100 células/cm<sup>2</sup>. Pasados tres días, se cambió el medio y se incubaron las células en ausencia (control) o en presencia de GCV 100 µM. Después de cuatro días de tratamiento, se aplicó el método del MTT **(a)** Representación del porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas con ganciclovir con respecto a la situación control. Los datos son medias ± SEM. La significatividad de las diferencias respecto al control se expresa como \*\*\* p≤0,001 y \* p≤0,05 (test t de Student). **(b)** Fotomicrografías de contraste de fases y de tinción con DAPI de las células de glioma humano U373TK G incubadas en ausencia o en presencia de GCV 100 µM durante 4 días. Barra de calibrado=50 µm.

#### **4.3.2.2. Estudio del efecto *bystander* de la tolbutamida en células de glioma humano U373.**

En apartados previos se ha mostrado que la tolbutamida promueve el aumento de la permeabilidad de las *gap junctions* y de la expresión de la conexina 43 en las células de glioma humano U373 (figuras 8 y 9). Para dilucidar si la tolbutamida promueve en las células de glioma humano U373 el desarrollo del efecto *bystander*, se cocultivaron células HSVtk positivas y HSVtk negativas y se evaluó la toxicidad del GCV en ausencia o en presencia de tolbutamida. Así, en primer lugar, los cultivos de células de glioma humano U373 y U373TK se incubaron en ausencia o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron cocultivos (50:50) de las células de glioma U373 y U373TK, pretratadas o no con tolbutamida. Las células se resebraron a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup> y se incubaron en ausencia (control) o en presencia de GCV 100  $\mu$ M o de GCV 100  $\mu$ M más tolbutamida 400  $\mu$ M. Al cabo de 1, 2, 3 y 5 días se llevaron a cabo los experimentos correspondientes para determinar la eficacia de cada tratamiento. De esta forma se evaluó la eficacia mediante el método del MTT, la cuantificación de núcleos, la tinción con anexina-V y la técnica TUNEL, todo ello según se describe en la sección Material y Métodos.

En la figura 52a se muestran imágenes de contraste de fases del cocultivo de células incubadas en ausencia (control) o en presencia de GCV o de GCV más tolbutamida, durante dos días. Se puede comprobar que la densidad celular en ambos tratamientos fue claramente menor que en la situación control. Además, se observa que la densidad celular en los cocultivos tratados con la mezcla de GCV más tolbutamida fue claramente inferior a la observada en el tratamiento único con GCV. Las figuras 52b y 52c muestran la evolución a lo largo del tiempo del número de células viables, expresado en porcentaje, con respecto al número de células viables en el momento de la resiembra (día 0). De esta forma, se observa que en las células no tratadas (control; figura 52b) la viabilidad celular aumenta a lo largo del tiempo. Por otro lado, en la figura 52c se puede apreciar que el número de células viables, a pesar del tratamiento con GCV, aumentó durante el primer día en un 70 %. Por otro lado, la viabilidad permaneció estable del día 1 al día 2 y, a partir de este día, comenzó a caer hasta el día 5 de tratamiento. En el caso de las células tratadas con la mezcla de GCV más tolbutamida, el número de células viables aumentó en un 60 %,

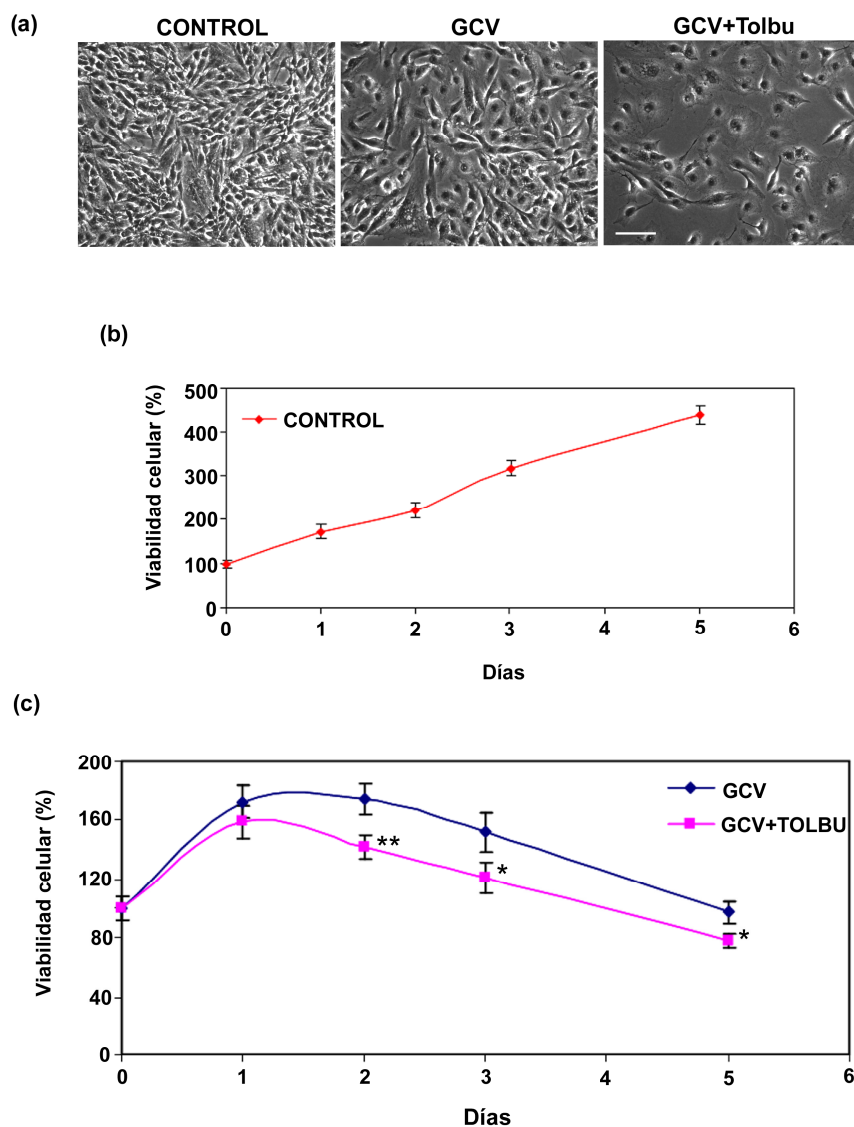
aproximadamente, durante el primer día de tratamiento y, a partir de este día, comenzó a caer hasta el día 5. Es importante destacar que las células tratadas con la mezcla de GCV más tolbutamida presentaron, en los días 2, 3 y 5 de tratamiento, una viabilidad inferior a la de las células tratadas únicamente con GCV. Además, es importante observar que la diferencia en la densidad celular entre el tratamiento con GCV y con GCV más tolbutamida, que se observa en las imágenes de contraste de fases de la figura 52a, es mayor que la diferencia en el porcentaje de viabilidad celular obtenida mediante el método del MTT (figura 52c). Por este motivo, se decidió estudiar el efecto de ambos tratamientos mediante la cuantificación de núcleos. Para ello, al cabo del tiempo de tratamiento establecido en cada caso, se tiñeron las células con el colorante fluorescente DAPI y se tomaron imágenes de diferentes campos, cuantificando, posteriormente, el número de núcleos por campo.

En la figura 53a se muestran imágenes de la tinción con DAPI de las células incubadas en ausencia (control) o en presencia de GCV o de GCV más tolbutamida, durante 5 días. Así, se puede comprobar que el número de núcleos presentes en los cultivos de células tratadas con GCV o con GCV más tolbutamida fue menor que en la situación control. Además, se observa que en el tratamiento con GCV más tolbutamida el número de núcleos fue menor que en el tratamiento único con GCV. La figura 53b representa la cuantificación del número de núcleos por campo en los días 3 y 5 de tratamiento. Así, se observa en el día 3, que la presencia de tolbutamida redujo casi en un 40 % el número de núcleos por campo con respecto al tratamiento único con GCV, mientras que dicha reducción fue de un 45 % en el día 5 de tratamiento.

Con respecto al mecanismo de acción del GCV, existen una gran variedad de estudios que apuntan a que dicho mecanismo se lleva a cabo a través de diferentes vías que conducen a la apoptosis (Beltinger *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2005; Hamel *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 1998). Por esta razón se decidió estudiar si la tolbutamida promovía el efecto *bystander* en los cocultivos, mediante dos técnicas de detección de células apoptóticas: la tinción con anexina-V y la técnica TUNEL.

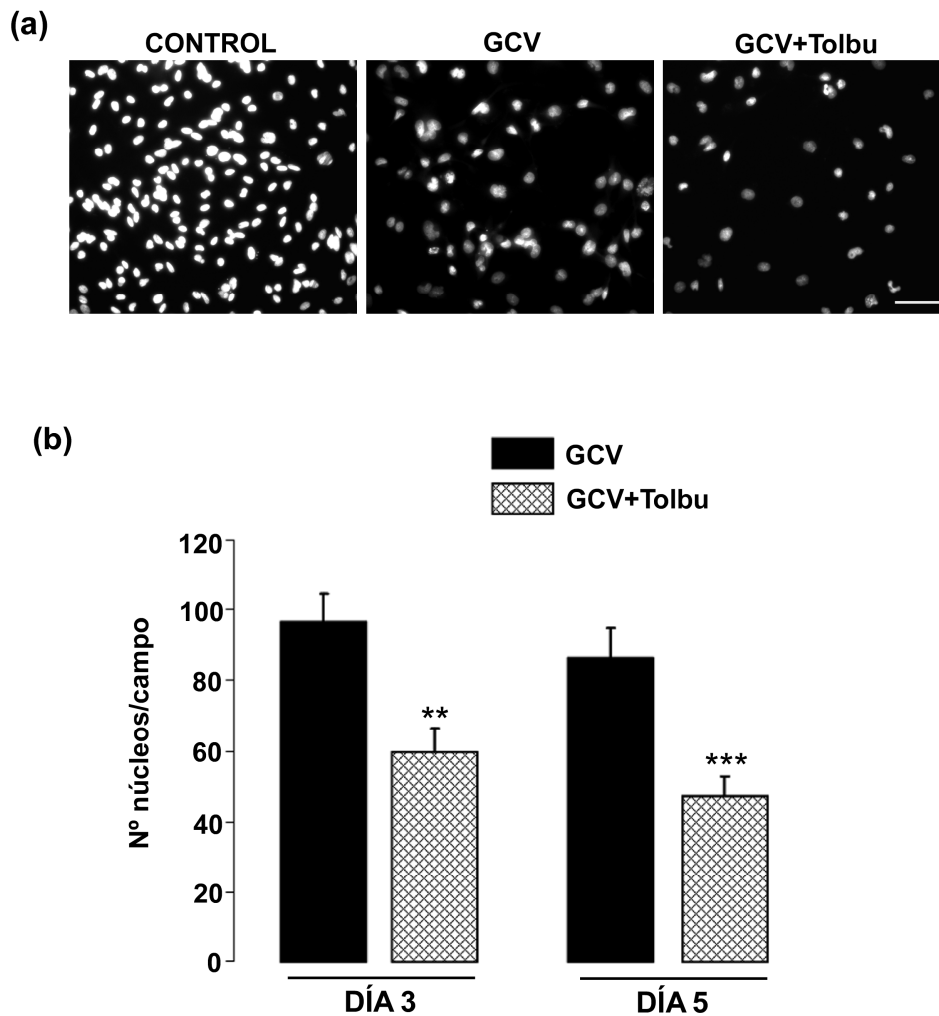
La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido de membrana que se localiza en la cara citoplasmática de la membrana de las células sanas. Sin embargo, en las células apoptóticas, incluso en estadios tempranos, la PS se transloca desde el interior hasta el exterior de la membrana, quedando así expuesta al medio extracelular. La anexina-

V es capaz de unirse a la PS cuando ésta se localiza en la cara externa de la membrana plasmática (Vermes *et al.*, 1995). Por tanto, cuando la anexina-V está marcada con algún tipo de fluorocromo permite identificar las células apoptóticas.



**Figura 52. Estudio del efecto *bystander* de la tolbutamida en células de glioma humano U373 mediante el método del MTT.**

La mezcla (50:50) de células de glioma humano U373 y U373TK se resembró a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup>, incubándose en ausencia (control) o en presencia de ganciclovir (GCV) 100 μM o de ganciclovir 100 μM + tolbutamida (tolbu) 400 μM. Al cabo de 1, 2, 3 y 5 días de tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante el método del MTT. **(a)** Fotomicrografías de contraste de fases correspondientes al día 2 de tratamiento. Barra de calibrado=50 μm. Las gráficas muestran la evolución a lo largo del tiempo del número de células viables, expresado en porcentaje, con respecto al momento de la resiembra (día 0), para la ausencia de tratamiento (control) **(b)** o para el tratamiento con GCV o con GCV más tolbutamida **(c)**. Los datos corresponden a medias ± SEM de, al menos, tres experimentos independientes. La significatividad de las diferencias respecto al tratamiento con GCV se expresa como \*\* p≤0.01 v \* p≤0.05 (test t de Student).



**Figura 53. Estudio del efecto *bystander* de la tolbutamida en células de glioma humano U373 mediante cuantificación de núcleos.**

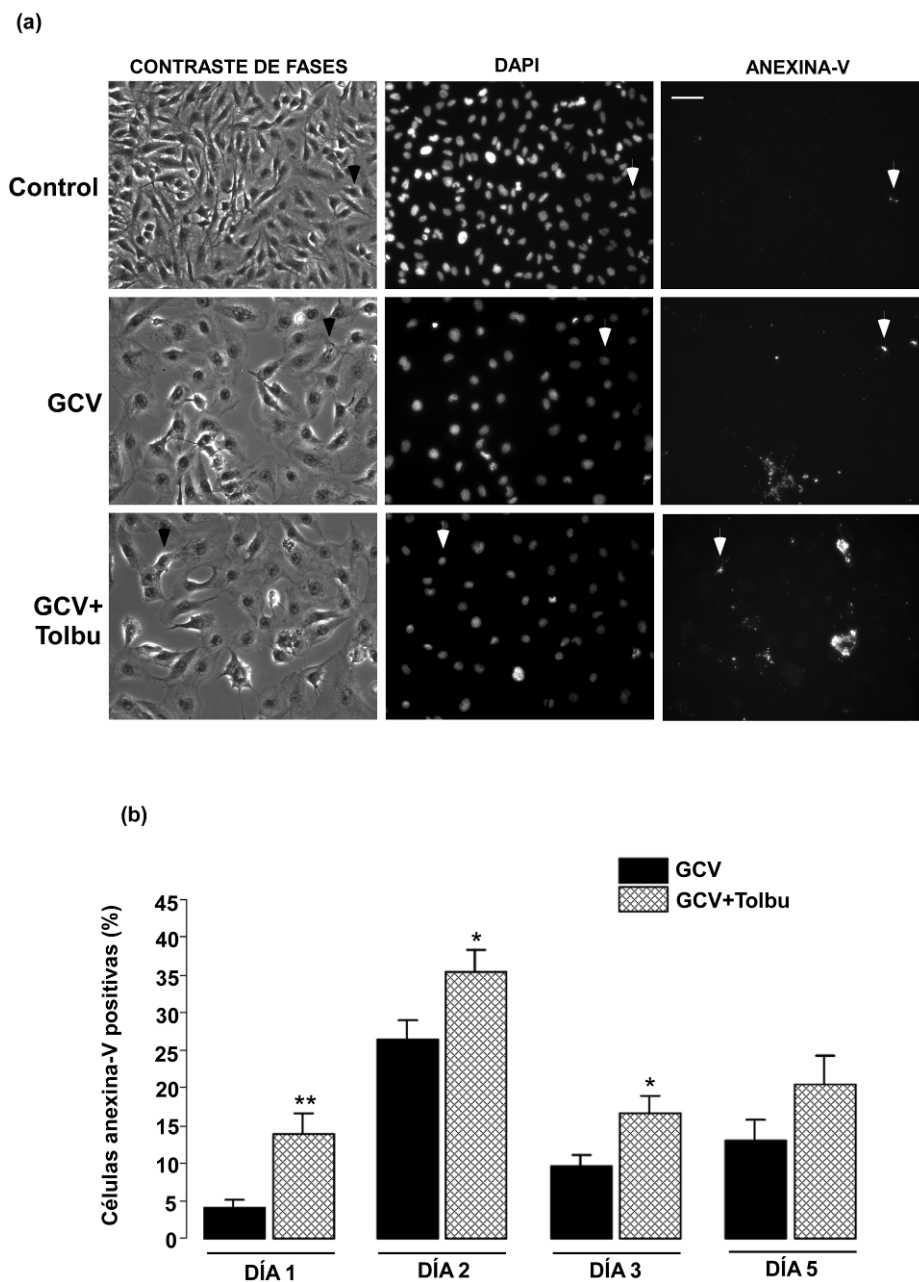
La mezcla (50:50) de células de glioma humano U373 y U373TK se resemebró a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup>, incubándose en ausencia (control) o en presencia de ganciclovir (GCV) 100 μM o de ganciclovir 100 μM + tolbutamida (tolbu) 400 μM. Al cabo de 3 y 5 días de tratamiento, las células se tiñeron con el colorante fluorescente DAPI (1,25 μg/ml) y se tomaron imágenes de diferentes campos por placa. **(a)** Fotomicrografías de núcleos teñidos con DAPI correspondientes al día 5 de tratamiento. Barra de calibrado=50 μm. **(b)** Representación del número de núcleos por campo. Los datos corresponden a medias ± SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto al ganciclovir se representa como \*\*\* p≤0,001 y \*\* p≤0,01 (test de de Student).

En la figura 54a se observan imágenes de contraste de fases, tinción con DAPI y tinción con anexina-V de los cocultivos incubados en ausencia (control) o en presencia de GCV o de GCV más tolbutamida, durante dos días. Para cada situación

se indica con una flecha un ejemplo de célula anexina-V positiva. Así, se puede apreciar que en la situación control el número de células teñidas con anexina-V es prácticamente insignificante. Sin embargo, cuando las células se trataron con GCV o con GCV más tolbutamida se puede observar que, después de dos días de tratamiento, hay un gran número de células anexina-V positivas en relación al número total de células, representadas por los núcleos teñidos con DAPI. Además, se observa que en el tratamiento con GCV más tolbutamida el número de células anexina-V positivas es aún mayor que en el tratamiento único con GCV.

La figura 54b representa el porcentaje de células anexina-V positivas después de 1, 2, 3, y 5 días de tratamiento con GCV o con la mezcla de GCV más tolbutamida. De esta forma, se puede comprobar que, en los días 1, 2 y 3 de tratamiento, el porcentaje de células positivas para la anexina-V fue mayor en las células tratadas con GCV más tolbutamida que en las tratadas únicamente con GCV. Así, después de 1 día de tratamiento la presencia de tolbutamida triplicó el porcentaje de células anexina-V positivas con respecto al tratamiento único con GCV. Al cabo de 2 días de tratamiento, el porcentaje de células anexina-V positivas en presencia de tolbutamida fue 1,3 veces superior al observado en el tratamiento único con GCV. Finalmente, después de 3 días de tratamiento, el porcentaje de células anexina-V positivas en presencia de tolbutamida fue 1,7 veces superior al del tratamiento único con GCV. Por otro lado, después de 5 días, las diferencias en el porcentaje de células anexina-V positivas no fueron significativas entre las células tratadas con GCV más tolbutamida y aquellas tratadas únicamente con GCV.

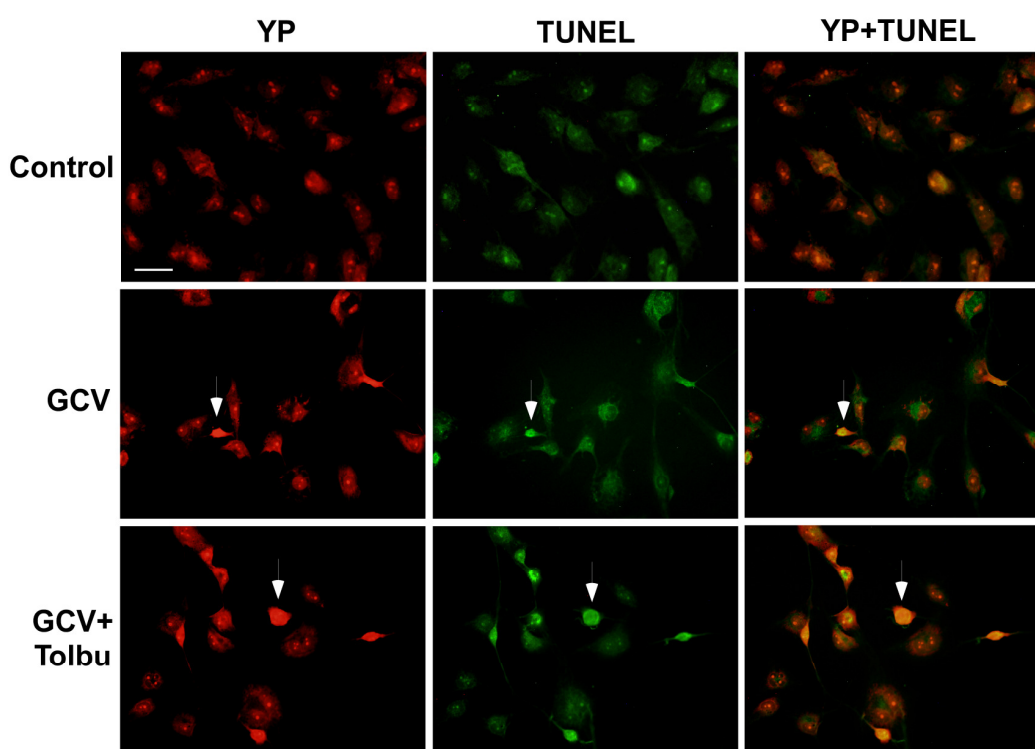
Una característica morfológica de las células en las fases tardías de la apoptosis es la fragmentación del DNA. Teniendo en cuenta esta característica, Gavrieli y col. describieron una técnica conocida como TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotine nick end labeling*) (Gavrieli *et al.*, 1992) que consiste, básicamente, en el marcaje de los extremos 3'-OH de los fragmentos de DNA.



**Figura 54. Estudio del efecto *bystander* de la tolbutamida en células de glioma humano U373 mediante tinción con anexina-V.**

La mezcla (50:50) de células de glioma humano U373 y U373TK se resembró a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup>, incubándose en ausencia (control) o en presencia de ganciclovir (GCV) 100 μM o de ganciclovir 100 μM + tolbutamida (tolbu) 400 μM. Al cabo de 1, 2, 3 y 5 días de tratamiento, las células se tiñeron con anexina-V y con DAPI y se tomaron imágenes de diferentes campos por placa. **(a)** Fotomicrografías de contraste de fases, tinción con DAPI y tinción con anexina-V correspondientes al día 2. Las flechas indican células anexina-V positivas. Barra de calibrado=40 μm. **(b)** Representación del porcentaje de células anexina-V positivas, con respecto al número total de células, a lo largo de los diferentes días de tratamiento. Los datos corresponden a medias ± SEM (n=4). La significatividad de las diferencias respecto al tratamiento con GCV se expresa como \*\* p≤0,01 y \* p≤0,05 (test t de Student).

En la figura 55 se muestran imágenes de las células incubadas en ausencia (control) o en presencia de GCV o de GCV más tolbutamida, durante 4 días. Las imágenes muestran, para un mismo campo celular, la tinción con yoduro de propidio (YP) y la tinción TUNEL, así como la superposición de ambas imágenes, que da información de las células TUNEL positivas (en amarillo-anaranjado). De esta forma, se puede observar que en la situación control no existe ninguna célula TUNEL positiva, a juzgar por la inexistencia de células de color amarillo-anaranjado. Sin embargo, tanto en el tratamiento con GCV como con GCV más tolbutamida, se pueden apreciar células TUNEL positivas en color amarillo-anaranjado. Se señala con una flecha un ejemplo de célula TUNEL positiva para cada tratamiento. Además, cabe destacar que el número de células TUNEL positivas es mayor en el tratamiento con GCV más tolbutamida que en el tratamiento único con GCV.



**Figura 55. Estudio del efecto *bystander* de la tolbutamida en células de glioma humano U373 mediante tinción TUNEL.**

La mezcla (50:50) de células de glioma humano U373 y U373TK se resebró a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup>, incubándose en ausencia (control) o en presencia de ganciclovir (GCV) 100  $\mu$ M o de ganciclovir 100  $\mu$ M + tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M, durante 4 días. Posteriormente, las células se marcaron mediante la técnica TUNEL utilizando como control, del número total de células, la tinción con yoduro de propidio (YP) (1,5  $\mu$ g/ml). Para cada tratamiento, se muestran imágenes de un mismo campo celular teñido con yoduro de propidio, con TUNEL o bien la suma de ambos, que muestra las células TUNEL positivas en amarillo-anaranjado. Se indica con una flecha un ejemplo de célula TUNEL positiva para cada tratamiento. Barra de calibrado=20  $\mu$ m.



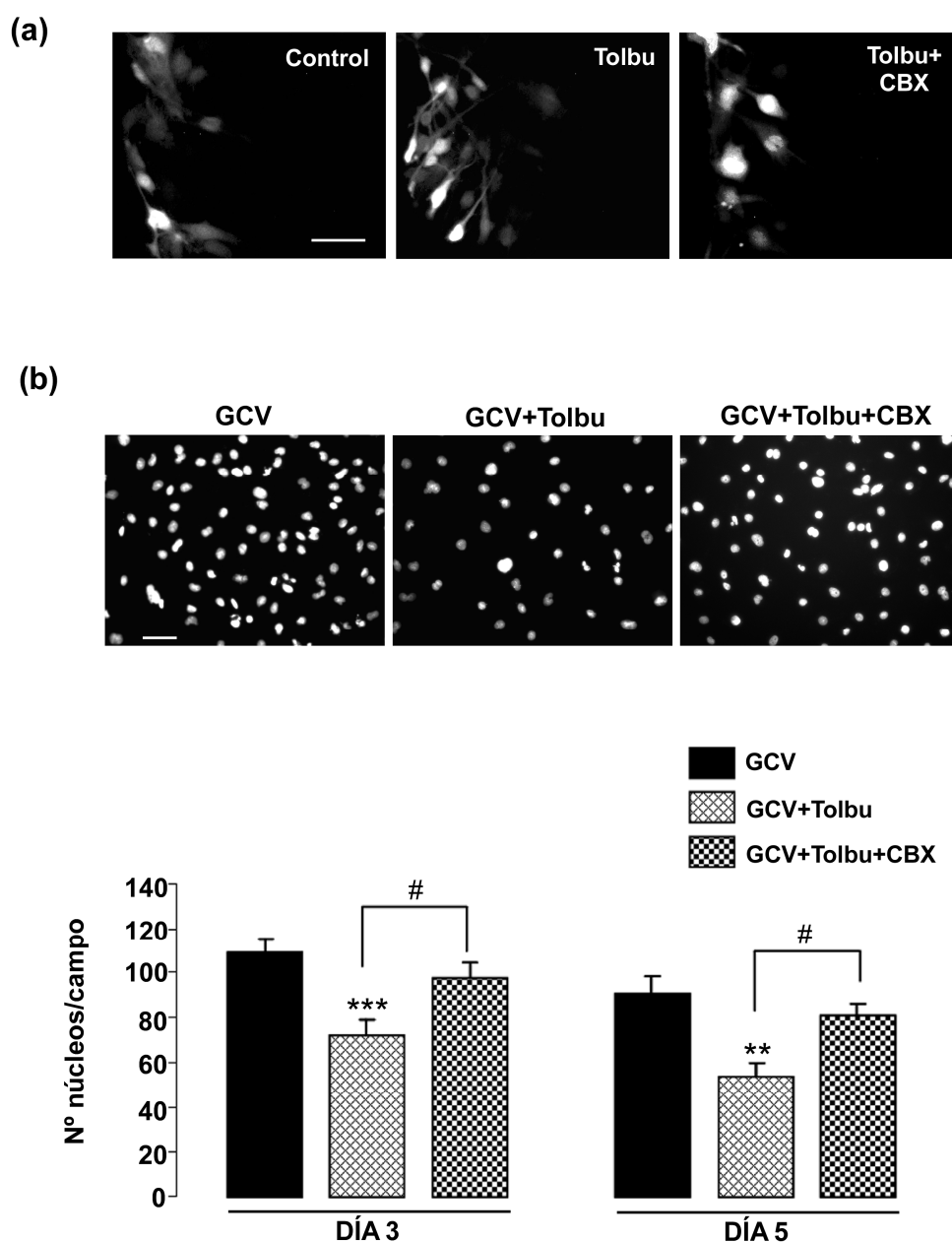
#### 4.3.2.3. Estudio de la implicación de las *gap junctions* y de la conexina 43 en el efecto *bystander* de la tolbutamida en células de glioma humano U373.

En el apartado anterior se ha mostrado la mayor eficacia de la terapia génica suicida, utilizando la mezcla de GCV más tolbutamida con respecto a la utilización única de GCV. Con el objetivo de dilucidar si la mayor eficacia aportada por la presencia de tolbutamida era debida al aumento de la permeabilidad de las *gap junctions* que ésta promueve (figura 8), se decidió estudiar el efecto de esta sulfonilurea en presencia de carbenoxolona (CBX), un inhibidor de las *gap junctions* (Davidson and Baumgarten, 1988; Goldberg *et al.*, 1996).

Para ello, los cultivos de células de glioma humano U373 y U373TK se incubaron en ausencia o en presencia de tolbutamida 400  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas. Pasado este tiempo, se llevaron a cabo cocultivos (50:50) de las células de glioma U373 y U373TK, pretratadas o no con tolbutamida. Las células se sembraron a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup> y se incubaron en ausencia (control) o en presencia de GCV 100  $\mu\text{M}$ , de GCV 100  $\mu\text{M}$  más tolbutamida 400  $\mu\text{M}$  o de GCV 100  $\mu\text{M}$  más tolbutamida 400  $\mu\text{M}$  más CBX 50  $\mu\text{M}$ . Posteriormente, se evaluó la eficacia de cada tratamiento mediante la cuantificación de núcleos y la tinción con anexina-V.

En la figura 56a se observa el efecto de la presencia de CBX sobre la permeabilidad de las *gap junctions* en células de glioma humano U373 previamente tratadas con tolbutamida. El cultivo de células de glioma humano U373, en estado de confluencia, se incubó durante 24 horas en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida. Pasado el tiempo de incubación, las células pretratadas con tolbutamida se incubaron en ausencia o en presencia de CBX 50  $\mu\text{M}$  durante media hora. Posteriormente, se determinó la permeabilidad mediante la técnica de *scrape loading*. Así, se puede apreciar que la presencia de tolbutamida promovió el aumento de la permeabilidad de las *gap junctions* con respecto al control, puesto que la difusión del amarillo de Lucifer fue mayor. Sin embargo, cuando las células pretratadas con tolbutamida se incubaron con CBX, la CBX revirtió el aumento de la permeabilidad promovido por la tolbutamida.

En la figura 56b se observan imágenes de la tinción nuclear con DAPI, de los cocultivos tratados con GCV, GCV más tolbutamida o GCV más tolbutamida más CBX,



**Figura 56. Estudio de la implicación de las *gap junctions* en el efecto *bystander* de la tolbutamida, en células de glioma humano U373, mediante cuantificación de núcleos.**

(a) *Scrape loading* de células de glioma humano U373. Se muestran imágenes de células incubadas en ausencia (control) o en presencia de tolbutamida (tolbu) 400  $\mu\text{M}$  o de tolbutamida 400  $\mu\text{M}$  + carbenoxolona (CBX) 50  $\mu\text{M}$ . Barra de calibrado=30  $\mu\text{m}$ . (b) La mezcla (50:50) de células de glioma humano U373 y U373TK se resembró a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup>, incubándose en presencia de ganciclovir (GCV) 100  $\mu\text{M}$ , de ganciclovir 100  $\mu\text{M}$  + tolbutamida (tolbu) 400  $\mu\text{M}$  o de ganciclovir 100  $\mu\text{M}$  más tolbutamida 400  $\mu\text{M}$  más carbenoxolona (CBX) 50  $\mu\text{M}$ . Al cabo de 3 y 5 días de tratamiento, las células se tiñeron con DAPI, se tomaron imágenes y se cuantificó el número de núcleos por campo. Las imágenes corresponden al día 3. Barra de calibrado=40  $\mu\text{m}$ . Los datos corresponden a medias  $\pm$  SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al GCV se expresa como \*\*\* $p \leq 0,001$  y \*\* $p \leq 0,01$  y respecto a GCV + tolbu, como #  $p \leq 0,05$  (*One-way ANOVA*. Bonferroni post-test).

durante 3 días. Así, se puede apreciar que el número de núcleos en el tratamiento con GCV más tolbutamida fue menor que en el tratamiento único con GCV. Además, la presencia de CBX revirtió el efecto de la tolbutamida, pues el número de núcleos que se observa cuando las células se trataron con la mezcla de GCV más tolbutamida más CBX fue mayor que en el tratamiento con GCV más tolbutamida. En la gráfica se recoge la cuantificación de los resultados. Así, se observa que, tanto a día 3 como a día 5, el tratamiento con GCV más tolbutamida resultó ser más eficaz, puesto que redujo el número de núcleos por campo en un 40 %, aproximadamente, con respecto al tratamiento único con GCV. Por otro lado, tanto a día 3 como a día 5, se observa que la presencia de CBX revirtió el efecto de la tolbutamida. De esta forma, a día 3, el número de núcleos por campo en presencia de CBX fue un 28 % superior que en el tratamiento con GCV más tolbutamida, y a día 5, fue un 37 % más alto.

En la figura 57a se muestran imágenes de contraste de fases, tinción con DAPI y tinción con anexina-V de los cocultivos incubados en presencia de GCV, GCV más tolbutamida o GCV más tolbutamida más CBX, durante dos días. En cada una de las condiciones se ha señalado con una flecha un ejemplo de célula anexina-V positiva. Así, se puede apreciar la existencia de un mayor número de células anexina-V positivas, respecto al número total de células, en el tratamiento con GCV más tolbutamida, en comparación con el tratamiento único con GCV. Además, se observa que, en el campo seleccionado, la existencia de células marcadas con anexina-V en el tratamiento con GCV más tolbutamida más CBX fue, prácticamente, inexistente. En la figura 57b está recogida la cuantificación de estos resultados. Se puede apreciar que el tratamiento conjunto con GCV más tolbutamida aumentó el porcentaje de células anexina-V positivas con respecto al tratamiento único con GCV y que la presencia de CBX revirtió tal efecto. De esta forma, después de 1 día de tratamiento, la mezcla de GCV más tolbutamida resultó más eficaz que el tratamiento único con GCV, pues el porcentaje de células anexina-V positivas fue 3,5 veces superior en el primer caso. La superioridad de la eficacia del tratamiento con GCV más tolbutamida se mantuvo también en los días 2 y 3, al observarse una eficacia 1,4 y 1,6 veces superior, respectivamente, al tratamiento único con GCV. En cuanto a la presencia de la CBX, se puede apreciar, como se ha mencionado previamente, que revirtió el efecto de la tolbutamida. De esta forma, a día 1, la presencia de CBX redujo aproximadamente un 60 % el efecto promovido por la tolbutamida. A día 2, el efecto obtenido en presencia de CBX fue un 75 % inferior al del tratamiento con GCV más tolbutamida y, finalmente,

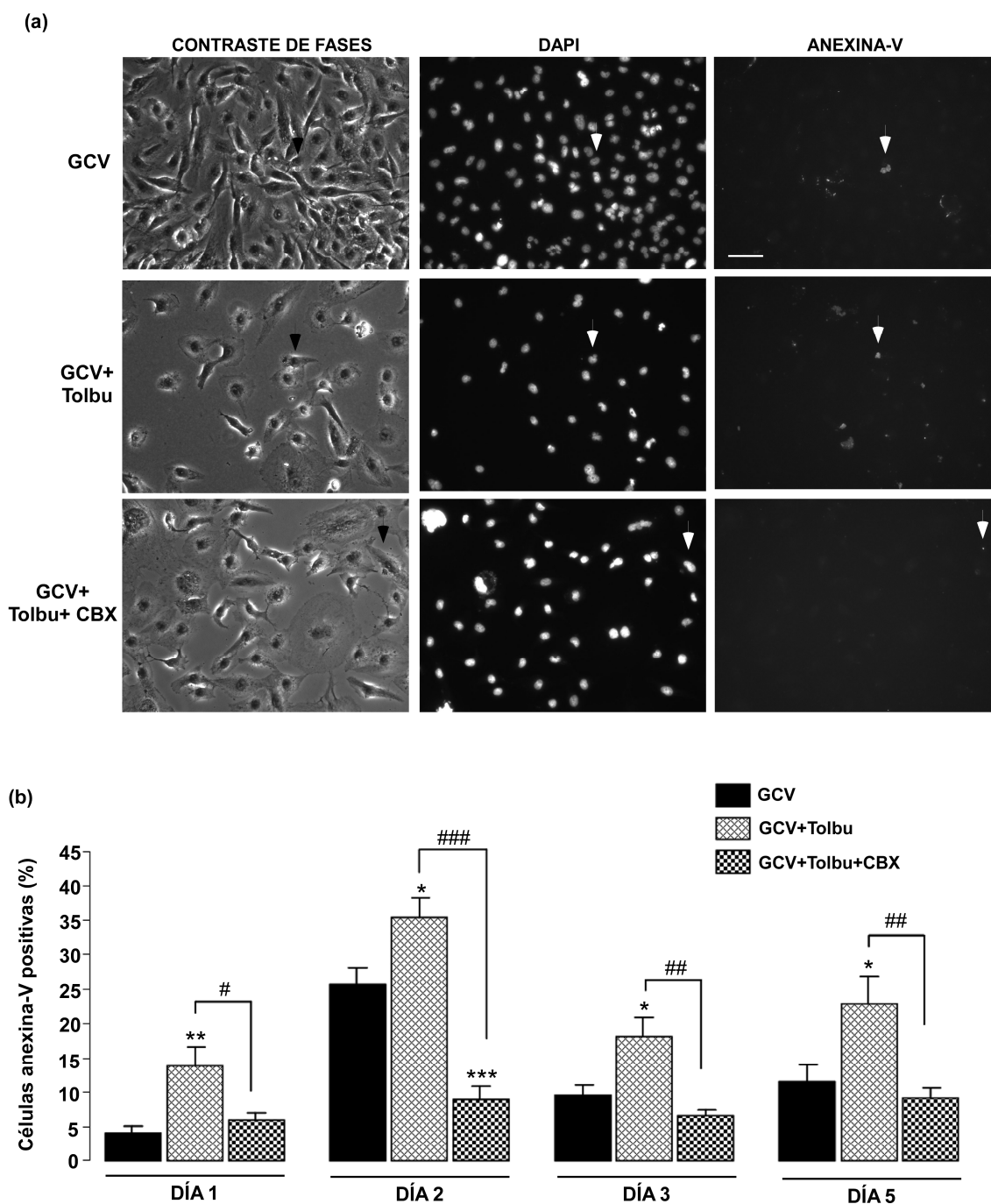


Figura 57. Estudio de la implicación de las *gap junctions* en el efecto *bystander* de la tolbutamida, en células de glioma humano U373, mediante tinción con anexina-V.

La mezcla (50:50) de células de glioma humano U373 y U373TK se resembró a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup>, incubándose en presencia de ganciclovir (GCV) 100  $\mu$ M, de ganciclovir 100  $\mu$ M + tolbutamida (tolbu) 400  $\mu$ M o de ganciclovir 100  $\mu$ M más tolbutamida 400  $\mu$ M más carbenoxolona (CBX) 50  $\mu$ M. Al cabo de 1, 2, 3 y 5 días de tratamiento, las células se tiñeron con anexina-V y con DAPI y se calculó el porcentaje de células anexina-V positivas. (a) Imágenes correspondientes al día 2 de tratamiento. Las flechas indican células anexina-V positivas. Barra de calibrado=40  $\mu$ m. (b) Los datos corresponden a medias  $\pm$  SEM (n=5). La significatividad de las diferencias respecto al GCV se expresa como \*\*\*p $\leq$ 0,001, \*\* p $\leq$ 0,01 y \*p $\leq$ 0,05 y respecto a GCV + tolbu, como ### p $\leq$ 0,001, ## p $\leq$ 0,01 y # p $\leq$ 0,05 (One-way ANOVA. Bonferroni post-test).

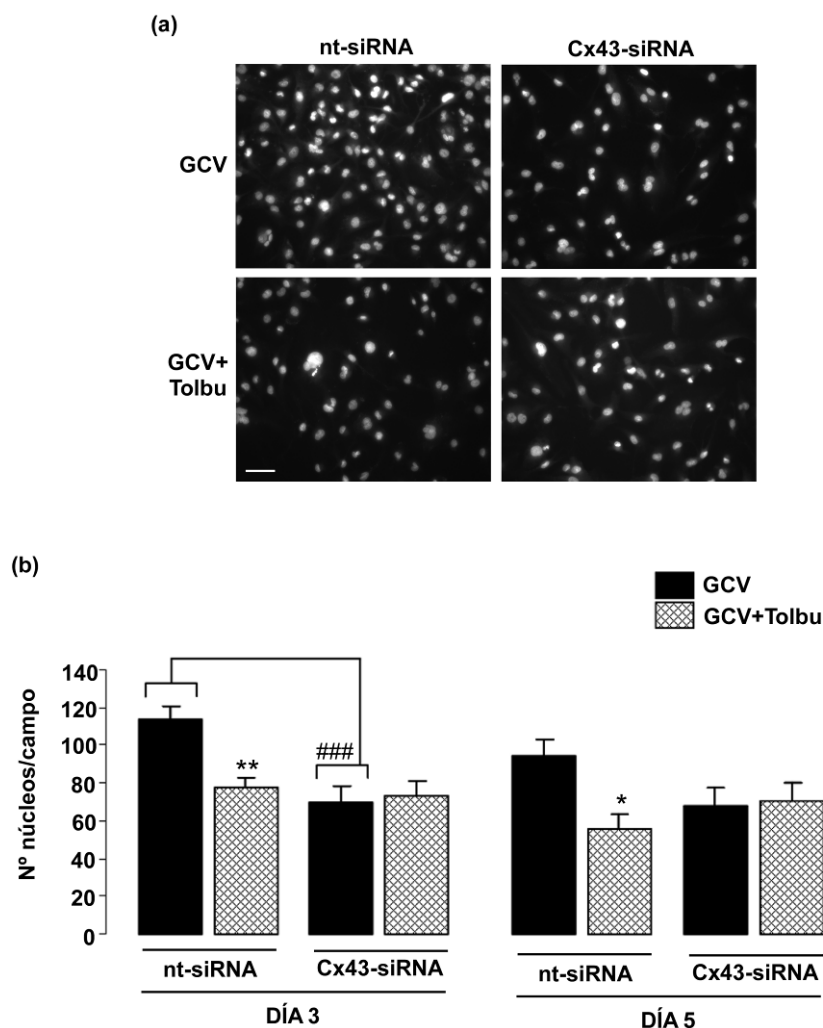
a día 3, la CBX redujo el efecto de la tolbutamida en más de un 60 %. Por otro lado, aunque a día 5, las diferencias entre el tratamiento con GCV y con GCV más tolbutamida, no resultaron estadísticamente significativas, la gráfica muestra que se mantuvo la misma tendencia que en los días anteriores observándose, además, que en el tratamiento con GCV más tolbutamida más CBX se obtuvo una eficacia un 55 % inferior a la del tratamiento con GCV más tolbutamida.

Después de comprobar que el cierre de las *gap junctions* revertía el efecto de la tolbutamida en nuestro modelo de terapia génica suicida y teniendo en cuenta que en las células de glioma humano U373, la tolbutamida promueve el aumento de la expresión de la conexina 43 (figura 9), la proteína mayoritaria de las *gap junctions*, se decidió estudiar el efecto de la tolbutamida en la terapia génica suicida, en cocultivos de células HSVtk positivas y HSVtk negativas, con la conexina 43 silenciada.

Para ello, los cultivos de células de glioma humano U373 y U373TK se incubaron en ausencia o en presencia de tolbutamida 400  $\mu$ M, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se realizaron cocultivos (50:50) de las células U373 y U373TK, pretratadas o no con tolbutamida. Las células se sembraron a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup> y se transfectaron con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA de la conexina 43 (Cx43-siRNA), tal y como se describe en Material y Métodos. Pasadas 24 horas, las células se incubaron en ausencia (control) o en presencia de GCV 100  $\mu$ M o de GCV 100  $\mu$ M más tolbutamida 400  $\mu$ M. Al cabo de 1, 2, 3 y 5 días, se determinó la eficacia de cada tratamiento mediante la cuantificación de núcleos y la tinción con anexina-V.

En la figura 58a se muestran imágenes correspondientes al día 3 de tratamiento. Se puede observar que, en los cocultivos transfectados con el nt-siRNA, el número de núcleos es menor en el tratamiento con GCV más tolbutamida que en el tratamiento único con GCV. Estos resultados son similares a los observados cuando las células no estaban transfectadas (figura 53). Por otro lado, cuando los cocultivos se transfectaron con el Cx43-siRNA no se observan diferencias en el número de núcleos entre los dos tratamientos. En la figura 58b se representa la cuantificación del número de núcleos por campo. Se puede observar que, tanto a día 3 como a día 5, el tratamiento con GCV más tolbutamida promovió una reducción en el número de

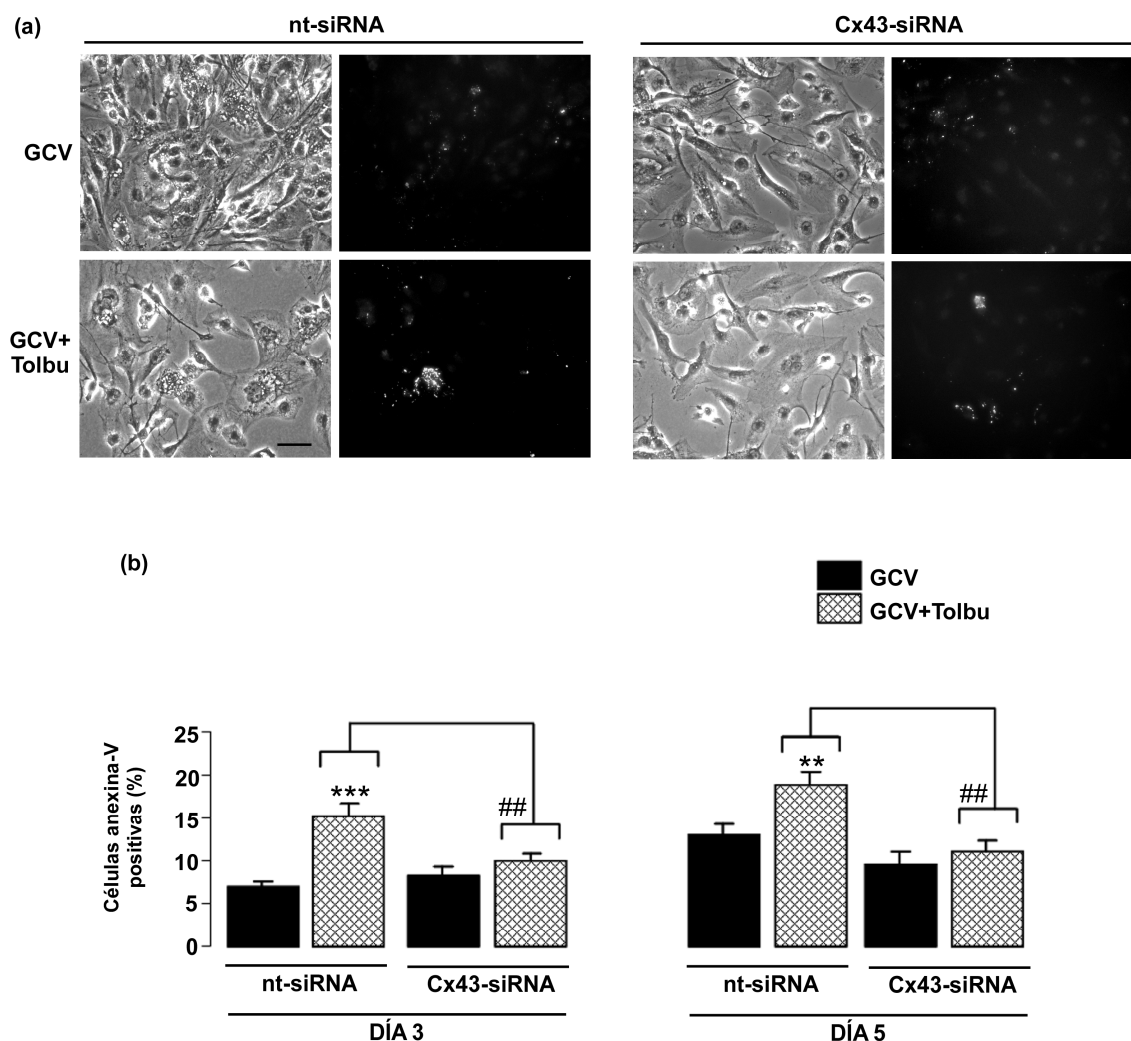
núcleos por campo con respecto al tratamiento único con GCV, en las células transfectadas con el nt-siRNA. Sin embargo, en las células que tenían la conexina 43 silenciada, no existieron diferencias en el número de núcleos por campo entre los dos tratamientos. Además, a día 3, las células tratadas con GCV, presentaron un menor número de núcleos por campo en las células transfectadas con el Cx43-siRNA que en aquellas transfectadas con el nt-siRNA.



**Figura 58. Estudio de la implicación de la conexina 43 en el efecto *bystander* de la tolbutamida, en células de glioma humano U373, mediante cuantificación de núcleos.**

La mezcla (50:50) de células de glioma humano U373 y U373TK se resembró a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup>, y se transfectó con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA de la conexina 43 (Cx43-siRNA). Pasadas 24 horas, las células se incubaron en presencia de ganciclovir (GCV) 100 μM o de ganciclovir 100 μM más tolbutamida (tolbu) 400 μM. Al cabo de 3 y 5 días respectivamente, se tiñeron los núcleos con DAPI, se tomaron imágenes y se cuantificó el número de núcleos por campo. **(a)** Fotomicrografías correspondientes al día 3. Barra de calibrado=40 μm. **(b)** Los datos corresponden a medias ± SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al GCV se expresa como \*\* p≤0,01 y \* p ≤0,05 (test t de Student). La significatividad de las diferencias nt-siRNA vs. Cx43-siRNA se expresa como ### p≤0,001 (*One-way ANOVA*. Bonferroni post-test).

En la figura 59a se muestran imágenes de contraste de fases y tinción con anexina-V correspondientes al día 3 de tratamiento. Se puede apreciar que en los cocultivos transfectados con el nt-siRNA, el tratamiento con la mezcla de GCV más tolbutamida promovió un aumento en el número de células anexina-V positivas, comparado con el tratamiento único con GCV. Por otro lado, en los cocultivos que tenían la conexina 43 silenciada, el número de células anexina-V positivas fue similar en ambos casos. La cuantificación de los resultados recogidos en la figura 59b, muestra que, tanto a día 3 como a día 5, el tratamiento de los cocultivos transfectados con el nt-siRNA, con la mezcla de GCV más tolbutamida resultó más eficaz que el tratamiento único con GCV. Así, a día 3, el tratamiento con GCV más tolbutamida duplicó el porcentaje de células anexina-V positivas observado en el tratamiento con GCV, mientras que a día 5, la eficacia del tratamiento con GCV más tolbutamida fue, aproximadamente, 1,5 veces superior a la del tratamiento único con GCV. Por otro lado, cuando los cocultivos estaban transfectados con el Cx43-siRNA, no existieron diferencias significativas en el porcentaje de células anexina-V positivas, entre el tratamiento con GCV y con GCV más tolbutamida, ni en el día 3 ni en el día 5. Además, al comparar las células transfectadas con el nt-siRNA con aquellas transfectadas con el Cx43-siRNA, se observa que la eficacia del tratamiento con GCV más tolbutamida fue menor cuando las células tenían la conexina 43 silenciada. Así, esa eficacia fue un 30 % menor en el día 3 y un 40 % menor en el día 5.



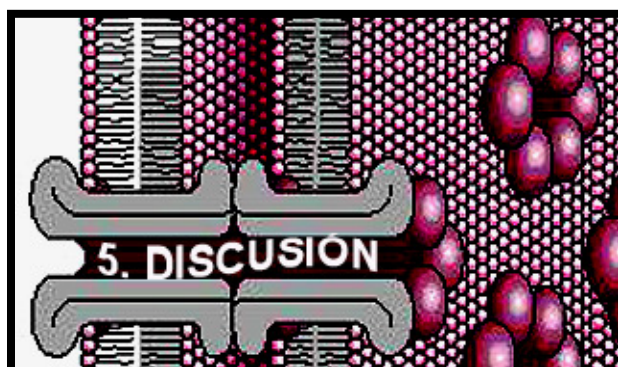
**Figura 59. Estudio de la implicación de la conexina 43 en el efecto *bystander* de la tolbutamida, en células de glioma humano U373, mediante tinción con anexina-V.**

La mezcla (50:50) de células de glioma humano U373 y U373TK se resembró a una densidad de 11000 células/cm<sup>2</sup>, y se transfeció con un siRNA sin diana (nt-siRNA) o con el siRNA de la conexina 43 (Cx43-siRNA). Pasadas 24 horas, las células se incubaron en presencia de ganciclovir (GCV) 100 μM o de ganciclovir 100 μM más tolbutamida (tolbu) 400 μM. Al cabo de 3 y 5 días respectivamente, las células se tiñeron con anexina-V y se cuantificó el porcentaje de células anexina-V positivas. **(a)** Fotomicrografías de contraste de fases y tinción con anexina-V, correspondientes al día 3. Barra=40 μm. **(b)** Los datos son medias ± SEM (n=3). La significatividad de las diferencias respecto al GCV se expresa como \*\*\* p<0,001 y \*\* p<0,01 (test t de Student). La significatividad de las diferencias nt-siRNA vs. Cx43-siRNA, se expresa como ## p<0,01 (*One-way* ANOVA. Bonferroni post-test).



“Las verdades científicas, de cualquier orden que sean, se alcanzan eliminando los factores perturbadores o contradictorios y reconociendo tan sólo los factores fundamentales”.

**Herbert Spencer**





### 5.1. Efecto antiproliferativo de la tolbutamida en las células de glioma. Participación de la conexina 43.

En el Sistema Nervioso Central (SNC), los astrocitos se encuentran comunicados a través de las *gap junctions*, formando una red sincitial que mantiene la homeostasis iónica, metabólica y funcional. La comunicación intercelular es fundamental para controlar, entre otros, procesos como la proliferación y la diferenciación de las células (Loewenstein and Kanno, 1966). No obstante, los mecanismos moleculares que relacionan la comunicación intercelular con la proliferación no están todavía claros. Se ha observado que en los gliomas, los tumores más frecuentes del SNC, los niveles de comunicación intercelular y la expresión de la conexina 43, la proteína mayoritaria de las *gap junctions* en astrocitos (Dermietzel *et al.*, 1991; Giaume *et al.*, 1991a), son muy bajos (Holden *et al.*, 1997; Laird *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 2001). Asimismo, se ha observado en células altamente proliferativas que, tanto la introducción directa del gen de la conexina 43 (Hirschi *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 1991; Mesnil *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1991), como la estimulación farmacológica de la permeabilidad de las *gap junctions* reducen la proliferación. No obstante, a pesar del efecto antiproliferativo derivado de la transfección del gen de la conexina 43, con los vectores disponibles en la actualidad no se alcanza a transfectar la totalidad de la población tumoral. Por ello, la estimulación farmacológica de la expresión de la conexina 43 y de la comunicación intercelular puede resultar una alternativa más atractiva. Sin embargo, no son muchos los agentes descritos hasta el momento, con capacidad para incrementar la comunicación intercelular (véase tabla 1 de la introducción). Entre ellos, destacan el segundo mensajero, cAMP (Atkinson *et al.*, 1995; Azarnia *et al.*, 1981 Burghardt, 1995, 243; De Mello, 1984; Ghosh and Singh, 1997; Paulson *et al.*, 2000; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001), los retinoides (Mehta *et al.*, 1989) y, como ha sido mostrado por nuestro grupo de investigación, las sulfonilureas tales como la tolbutamida (Granda *et al.*, 1998; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). Por todo ello, en este trabajo hemos abordado el estudio del efecto de la tolbutamida sobre la expresión de la conexina 43 y la proliferación de las células de glioma, utilizando como control un agente cuyo efecto sobre la comunicación intercelular está ampliamente establecido, como es el cAMP.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, se observó que la tolbutamida promovía un aumento de la comunicación intercelular a través de las *gap junctions* y

de la expresión de la conexina 43, así como una disminución de la proliferación en la línea celular de glioma de rata C6 (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2005; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). Se observó, también, que el dibutilil-cAMP (db-cAMP), un derivado del cAMP capaz de atravesar la membrana plasmática, promovía en las células de glioma de rata C6, unos efectos similares a los de la tolbutamida (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2005; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001) y que los efectos conjuntos de la tolbutamida más el db-cAMP eran aditivos (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2005; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001).

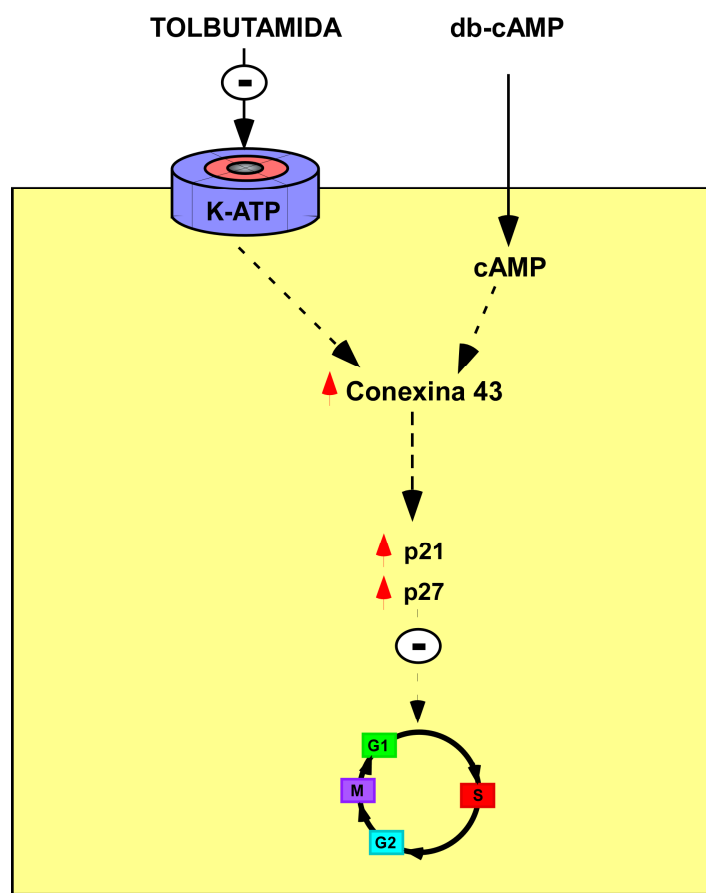
Nuestros resultados corroboran los obtenidos previamente por Sanchez-Álvarez y col. (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001), puesto que el tratamiento de las células de glioma de rata C6 con tolbutamida o con db-cAMP, aumenta la permeabilidad de las *gap junctions* y la expresión de la conexina 43 en una proporción similar, mientras que, el tratamiento conjunto con ambos agentes, da lugar a un efecto aditivo (figuras 1 y 2). De acuerdo con nuestros resultados, tanto la tolbutamida como el db-cAMP, ejercen un efecto antiproliferativo en las células de glioma C6 a juzgar por la reducción en la expresión del marcador de proliferación Ki-67 (figura 3), una proteína que se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en la fase G0 (Gerdes *et al.*, 1983). Estos resultados complementan los obtenidos previamente en nuestro laboratorio mediante análisis del ciclo celular por citometría de flujo, incorporación de bromo-desoxiuridina y captación de glucosa (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2005; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). Además, nuestros resultados sugieren que el efecto antiproliferativo de la tolbutamida y del db-cAMP en las células de glioma de rata C6, se lleva a cabo a través de la inhibición del ciclo celular, puesto que ambos tratamientos promueven el aumento de p21, un inhibidor de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs), en aquellas células que no expresan Ki-67 (figura 3). La participación de otro inhibidor de las CDKs, p27, también ha sido descrita en nuestro laboratorio (Sanchez-Alvarez *et al.*, 2006).

Con objeto de determinar la posible participación de la conexina 43 en el efecto antiproliferativo de la tolbutamida y del db-cAMP en las células de glioma de rata C6, decidimos silenciar esta proteína mediante la técnica del siRNA (*small interfering RNA*). Según nuestros resultados, esta técnica reduce de forma eficaz la expresión de la conexina 43 en las células de glioma C6 e impide los efectos de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de dicha proteína (figura 4a). En estas circunstancias, ni la tolbutamida ni el db-cAMP ejercen su efecto antiproliferativo, a juzgar por la

ausencia de modificaciones en la expresión de Ki-67 en las células que poseen la conexina 43 silenciada (figura 4c). Además, tampoco se observan modificaciones en la expresión de p21 (figura 4c). Todo ello sugiere que el efecto antiproliferativo de la tolbutamida y del db-cAMP en las células de glioma de rata C6, se lleva a cabo a través del aumento de la conexina 43 que, a su vez, promueve el aumento de p21.

Por otro lado, el hecho de que los efectos del tratamiento conjunto con tolbutamida y db-cAMP sobre la expresión de la conexina 43 y la proliferación, sean aditivos (figuras 2 y 3), sugiere que el mecanismo por el cual aumentan la expresión de la conexina 43 es diferente y que, a partir de esta proteína, la vía de señalización es común. Puesto que la tolbutamida es un conocido inhibidor de los canales de potasio sensibles al ATP (K-ATP) (para revisión, véase: (Proks *et al.*, 2002)), hemos empleado agentes abridores de dicho canal, como son el diazóxido y el pinacidilo, para conocer la implicación del canal K-ATP en el efecto de la tolbutamida. Así, la presencia del diazóxido y del pinacidilo impide el efecto de la tolbutamida sobre la expresión de la conexina 43 pero no el del db-cAMP (figuras 31 y 32). Esto sugiere que el mecanismo por el que la tolbutamida aumenta la expresión de la conexina 43 está relacionado con su interacción con el canal K-ATP, y es diferente al mecanismo por el que el db-cAMP aumenta la expresión de esta proteína (véase esquema 12). En este sentido, los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Granda *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 2000), indicaban que el efecto de la tolbutamida sobre las *gap junctions* estaba relacionado con la despolarización de la membrana plasmática debido al cierre de los canales K-ATP. De hecho, se ha propuesto que las *gap junctions* podrían comportarse como canales voltaje dependientes (Enkvist and McCarthy, 1994).

Con objeto de conocer si el efecto antiproliferativo de la tolbutamida en las células de glioma de rata C6 era extensible a células de glioma humano, decidimos estudiar el efecto de esta sulfonilurea en varias líneas de glioma humano con diferentes grados de malignidad. En concreto, utilizamos la línea T98-G (grado IV, glioblastoma multiforme, GBM), la línea U373 (grado III), la línea HTB12 (grado III) y la línea HTB138 (grado II). En primer lugar, analizamos los niveles de la conexina 43 y del marcador de proliferación, Ki-67, en estas células. Así, la línea T98-G, presenta, de acuerdo con su grado IV, una elevada expresión de Ki-67, y una reducida expresión de conexina 43 (figura 5 y tabla 3). Por otro lado, en las líneas U373 y HTB12, con grado



Esquema 12. Mecanismo de acción de la tolbutamida y del db-cAMP.

III, la expresión de Ki-67 es marcadamente inferior, mientras que los niveles de conexina 43 son superiores y muy similares entre ellos (figura 5 y tabla 3). La línea HTB138, de acuerdo con su grado de malignidad (grado II), presenta muy baja tasa de proliferación puesto que, en nuestras condiciones experimentales, la expresión de Ki-67 resultó prácticamente indetectable. Sin embargo, el nivel de expresión de conexina 43 en estas células no es tan alto como cabría esperar, siendo, de hecho, más bajo que en las líneas U373 y HTB12 (figura 5 y tabla 3). Teniendo en cuenta todos estos resultados, se puede concluir que, con la excepción de la línea HTB138, en las líneas de glioma humano ensayadas, existe una relación inversa entre los niveles del marcador de proliferación Ki-67 y los niveles de la conexina 43. En este sentido, nuestros resultados se ajustan a los obtenidos previamente por diversos autores que

han descrito la existencia de una relación inversa entre el grado de malignidad de los gliomas y la expresión de la conexina 43 (Huang *et al.*, 1999; Soroceanu *et al.*, 2001).

	Ki-67	Conexina 43
<b>T98-G (grado IV)</b>	<b>++</b>	<b>-</b>
<b>U373 (grado III)</b>	<b>+</b>	<b>++</b>
<b>HTB12 (grado III)</b>	<b>+</b>	<b>++</b>
<b>HTB138 (grado II)</b>	<b>-</b>	<b>+</b>

**Tabla 3. Expresión de Ki-67 y de la conexina 43 en las células de glioma humano.**

++: expresión abundante; +: expresión moderada;  
-: expresión baja o ausencia de expresión.

Una vez conocidos los niveles de la conexina 43 en las diferentes líneas de glioma humano, analizamos el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la expresión de esta proteína así como sobre la comunicación intercelular a través de las *gap junctions*. En este sentido, aunque el db-cAMP es un conocido estimulador de la comunicación intercelular y de la expresión de la conexina 43 en las células de glioma de rata C6 y en otros tipos de células (Atkinson *et al.*, 1995; Azarnia *et al.*, 1981; Burghardt, 1995, 243; Ghosh and Singh, 1997; Paulson *et al.*, 2000; Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001), en ninguna de las líneas de glioma humano ensayadas, incrementó la expresión de la conexina 43, disminuyendo incluso dicha expresión en las líneas U373 y HTB138, y observándose cierto incremento de la comunicación intercelular en las células HTB12 (figuras 6-13 y tabla 4).

	Permeabilidad	Conexina 43	Ki-67 395 KDa	Ki-67 345 KDa	p21	p27
<b>T98-G</b> (grado IV)	=	=	=	↓	=	=
<b>U373</b> (grado III)	=	↓	↓	↓	=	↑
<b>HTB12</b> (grado III)	↑	=	↓	↓	↓	=
<b>HTB138</b> (grado II)	=	↓	no se detecta	no se detecta	=	↑

**Tabla 4. Efecto del db-cAMP en las células de glioma humano.**

=: no se modifica; ↓: disminuye; ↑: aumenta.

Con respecto al efecto de la tolbutamida, únicamente se observó un aumento de la expresión de la conexina 43 en la línea de glioma humano U373, en la que además, aumentó la comunicación intercelular (figuras 8 y 9 y tabla 5), unos efectos similares a los observados en la línea de glioma de rata C6. Además, la tolbutamida también promovió el aumento de la comunicación intercelular en la línea HTB12 (figura 10 y tabla 5).

A continuación, analizamos el efecto de la tolbutamida y del db-cAMP sobre la proliferación de las diferentes líneas de glioma humano. Nuestros resultados muestran un efecto antiproliferativo del db-cAMP en las líneas U373 y HTB12 a juzgar por la reducción en la expresión del marcador de proliferación Ki-67 (figuras 17 y 21 y tabla 4). Este efecto antiproliferativo no está relacionado con el aumento de la expresión de la conexina 43. En este sentido, otros estudios han mostrado que el efecto antiproliferativo del cAMP es independiente de la conexina 43 (Hanna *et al.*, 1999). Además, en estas dos líneas celulares el efecto antiproliferativo del db-cAMP no posee



un mecanismo molecular común relacionado con modificaciones en los inhibidores de CDKs, p21 ó p27 (figuras 18, 19, 22, 23 y tabla 4).

	Permeabilidad	Conexina 43	Ki-67 395 KDa	Ki-67 345 KDa	p21	p27
<b>T98-G (grado IV)</b>	=	=	=	=	=	↓
<b>U373 (grado III)</b>	↑	↑	↓	↓	↑	↑
<b>HTB12 (grado III)</b>	↑	↓	=	↓	=	=
<b>HTB138 (grado II)</b>	=	=	no se detecta	no se detecta	=	=

**Tabla 5. Efecto de la tolbutamida en las células de glioma humano.**

=: no se modifica; ↓: disminuye; ↑: aumenta.

Al analizar los efectos de la tolbutamida, se aprecia que el tratamiento de las células de glioma humano U373 y HTB12 con esta sulfonilurea, promueve un efecto antiproliferativo, como indica la reducción en la expresión de Ki-67 (figuras 17 y 21 y tabla 5). Llama la atención el hecho de que en las células HTB12 la reducción de Ki-67 no está relacionada con el aumento de la conexina 43, pudiendo, sin embargo relacionarse con el aumento de la comunicación intercelular. En este sentido, está descrito que el aumento de la comunicación intercelular por sí mismo regula la proliferación (Loewenstein, 1992; Mehta *et al.*, 1986). Además, nuestros resultados sugieren que este efecto no está relacionado con los inhibidores de CDKs, p21 y p27 (figuras 22 y 23 y tabla 5). Por otro lado, el efecto antiproliferativo de la tolbutamida en las células U373 parece estar relacionado con el aumento de la comunicación intercelular, así como de la expresión de la conexina 43 y de los inhibidores de CDKs, p21 y p27 (figuras 9, 18 y 19 y tabla 5), de forma similar a lo observado en las células

de glioma de rata C6. De hecho, las células tratadas con tolbutamida que expresan p27 no expresan Ki-67 (figura 20).

Con objeto de confirmar la participación de la conexina 43 en el efecto antiproliferativo de la tolbutamida en las células de glioma humano U373, se llevó a cabo el silenciamiento de esta proteína mediante siRNA y se estudió el efecto de la tolbutamida en estas circunstancias. Así, en ausencia de conexina 43, la tolbutamida no ejerce su efecto antiproliferativo en las células U373, puesto que, en estas condiciones no disminuye la expresión de Ki-67 (figura 27). Además, tampoco aumenta la expresión de p21 (figura 28) y p27 (figura 29), indicando que la conexina 43 actúa a través de estos inhibidores de CDKs. Previamente, ya ha sido descrita por otros autores la relación existente entre la actividad supresora de tumores de la conexina 43 y el aumento de la expresión de p21 (Kamei *et al.*, 2003) y p27 (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003b). Además, el aumento en la expresión de p27 promovido por la tolbutamida a través de la conexina 43, podría tener valor clínico puesto que se han asociado los bajos niveles de p27 en los gliomas con un mal pronóstico (Kirla *et al.*, 2003) y, en general, con tumores de alto grado (Philipp-Staheli *et al.*, 2001).

De forma contraria a lo esperado, el silenciamiento de la conexina 43 en las células de glioma humano U373, promueve también un marcado efecto antiproliferativo, al reducir la expresión de Ki-67 (figura 27) y aumentar la expresión de p27 (figura 29). De hecho, las células que tienen la conexina 43 silenciada, presentan una curva de crecimiento inferior a la de las células control (figura 30a), lo cual se confirma al observar las imágenes de contraste de fases de una y otra situación (figura 30b). Además, nuestros resultados indican que el menor número de células no se debe a un aumento de la muerte por apoptosis (figuras 30b y 30c). Cabe mencionar que, aunque en mayor medida, se ha asociado la conexina 43 con un efecto antiproliferativo y supresor de tumores (Hirschi *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 1991; Mesnil *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1991) (para revisión, ver: (Naus, 2002; Yamasaki, 1990; Yamasaki *et al.*, 1999), también se ha sugerido que la conexina 43 puede ser necesaria para la proliferación celular. Así, se ha observado que los astrocitos procedentes de ratones knock-out de conexina 43, presentan una reducida tasa de proliferación (Dermietzel *et al.*, 2000; Naus *et al.*, 1997). Asimismo la conexina 43 está implicada en la proliferación de las células del músculo liso vascular (Jia *et al.*, 2008) y se fosforila durante la mitosis por la cdc2 (Kanemitsu *et al.*, 1998). Todos estos

datos, tomados en su conjunto, sugieren que la importancia de la conexina 43 en la regulación de la proliferación se debe no sólo a que esta proteína esté o no presente, sino a que su presencia tenga lugar en los niveles adecuados.

En resumen, los resultados discutidos hasta el momento, indican que, en las células de glioma de rata C6 y de glioma humano U373, la tolbutamida aumenta la expresión de la conexina 43 y la comunicación intercelular y lleva a cabo un efecto antiproliferativo a través del aumento de los inhibidores de CDKs, p21 y p27. Estos efectos no se observan cuando las células tienen la conexina 43 silenciada, por lo que se deduce que el efecto antiproliferativo se desarrolla a través del aumento de esta proteína. Por otro lado, nuestros resultados ponen de manifiesto un hecho bien conocido como es la diferente sensibilidad a los tratamientos que de forma intrínseca presenta cada tipo de célula tumoral. En el caso de la tolbutamida, nuestros resultados indican que si no se produce un aumento de la comunicación intercelular o de la conexina 43 no cabe esperar un efecto antiproliferativo.

Se conoce que las sulfonilureas, incluida la tolbutamida, actúan a través de los canales de potasio sensibles al ATP (K-ATP) promoviendo su cierre (para revisión, véase: (Proks *et al.*, 2002)). Estos canales constan de dos tipos de subunidades: las subunidades Kir6.x, que constituyen el poro del canal y entre las que se encuentran las isoformas Kir6.1 y Kir6.2, y las subunidades SUR, que constituyen el receptor de las sulfonilureas y entre las que destacan las isoformas SUR1 y SUR2. Como ya se ha mencionado previamente, parece que el efecto de la tolbutamida sobre la permeabilidad de las *gap junctions* está relacionado con la despolarización de la membrana plasmática debido al cierre de los canales K-ATP (Granda *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 2000). De hecho, hemos observado que el aumento de la conexina 43 promovido por la tolbutamida está mediado por el canal K-ATP (figuras 31 y 32). Por esta razón, decidimos llevar a cabo la caracterización del canal K-ATP en las células de glioma. Nuestros resultados indican que las células de glioma de rata C6 expresan tanto la subunidad SUR1 como la SUR2 (figura 33a). Sin embargo, únicamente expresan la subunidad Kir6.2 (figuras 33a y 33c) pero no la Kir6.1, que sí se expresa en cerebro, astrocitos y neuronas (figuras 33a y 33b). Estos resultados sugieren que el efecto de la tolbutamida se llevaría a cabo a través de canales K-ATP constituidos por la subunidad Kir6.2 pero no por Kir6.1. Por otro lado, llama la atención el hecho de que las células C6 presenten mayor nivel de expresión de Kir6.2 que los astrocitos (figura

33c). Por tanto, se podría sugerir que la ausencia de Kir6.1 es compensada por la sobreexpresión de Kir6.2 y que estas proteínas podrían formar parte del mecanismo de transformación tumoral. En este sentido, Olsen y col. también observaron la sobreexpresión de otros tipos de subunidades Kir en células de glioma. Según estos autores, estas subunidades Kir se encuentran deslocalizadas en el interior de la célula y no generaban corrientes de potasio (Olsen and Sontheimer, 2004). En cuanto a la caracterización de los canales Kir en las células de glioma humano T98-G, U373, HTB12 y HTB138, nuestros resultados muestran un patrón similar al de las células de glioma de rata C6, con la ausencia de expresión de Kir6.1 (figuras 34a y 34b) y la marcada expresión de Kir6.2 (figuras 34a y 34c).

En resumen, la caracterización molecular del canal K-ATP en las células de glioma sugiere que la pérdida de Kir6.1 y la sobreexpresión de Kir6.2 podrían estar implicadas en el mecanismo de formación de gliomas. Por otro lado, los datos que tenemos hasta el momento sobre la composición del canal K-ATP en las diferentes líneas celulares no nos permiten establecer una relación entre dicha composición y la presencia o ausencia de efecto de la tolbutamida sobre la conexina 43 y la proliferación. Por tanto, serán necesarios más experimentos para profundizar en el estudio de las características intrínsecas de los diferentes tipos de glioma, con el objetivo de dilucidar los requisitos celulares que llevan al efecto antiproliferativo de la tolbutamida.

## **5.2. Efecto *bystander* de la tolbutamida en la terapia génica suicida en las células de glioma.**

Debido a la escasa eficacia de los tratamientos convencionales utilizados en los gliomas, la terapia génica suicida se perfila como una nueva alternativa que podría resultar más selectiva y eficaz. No obstante, a pesar de los buenos resultados obtenidos en ensayos *in vitro* (Ammerpohl *et al.*, 2004; Asklund *et al.*, 2003; Robe *et al.*, 2000) así como en modelos animales (Miura *et al.*, 2002; Vincent *et al.*, 1996), los ensayos clínicos, aún siendo seguros (Sandmair *et al.*, 2000; Smitt *et al.*, 2003), no han resultado del todo eficaces (Rainov, 2000), razón por la cual son múltiples los estudios orientados a mejorar la eficacia de esta terapia. Uno de los sistemas de terapia génica suicida más empleado es el de la timidina kinasa del virus del herpes simple (HSVtk)/ganciclovir (GCV). Cuando las células son transfectadas con la HSVtk

y, posteriormente, tratadas con GCV, la HSVtk transforma el GCV en la forma monofosforilada, el GCV-P (Moolten, 1986). Posteriormente, la guanilato kinasa de la célula convierte el GCV-P en GCV-PP (Brady *et al.*, 1996) y, a continuación, diferentes kinasas inespecíficas de la célula lo transforman en el metabolito tóxico, es decir, la forma trifosforilada o GCV-PPP. Éste se incorpora al DNA de las células en división, impidiendo la incorporación de su análogo fisiológico, la desoxiguanosina-trifosfato (dGTP) y, por tanto, impidiendo la elongación de la cadena de DNA (Mesnil and Yamasaki, 2000). Puesto que con los vectores disponibles en la actualidad, se consiguen, en general, bajos porcentajes de transfección, la potenciación del efecto *bystander* es un elemento clave para aumentar la eficacia de la terapia génica suicida. En este sentido, se ha descrito el efecto *bystander* como el paso del GCV-PPP a través de las *gap junctions* desde las células transfectadas con la HSVtk hasta aquéllas que no lo están (Asklund *et al.*, 2003; Fick *et al.*, 1995; Mesnil *et al.*, 1996) (para revisión, véase: (Mesnil and Yamasaki, 2000)). Dado que nuestros resultados indican que la tolbutamida aumenta la comunicación intercelular a través de las *gap junctions* en las células de glioma de rata C6 y de glioma humano U373, decidimos estudiar el posible efecto *bystander* de la tolbutamida en la terapia génica suicida.

Para ello, diseñamos un modelo de terapia génica suicida en células de glioma de rata C6 en cultivo, que también se aplicó con éxito en células de glioma humano U373. En primer lugar, se diseñó un plásmido bicistrónico (pRFPHSVtk) que codificase la timidina kinasa del virus del herpes simple (HSVtk) y la proteína roja fluorescente (RFP) (véase apartado 4.3.1.1., sección I), comprobando que las células transfectadas con dicha construcción expresan el RNA mensajero de ambas proteínas (figura 45). Además, comprobamos que las células transfectadas con nuestra construcción plasmídica, pRFPHSVtk, son sensibles al GCV (figuras 43 y 51), a una concentración, 100  $\mu$ M, a la cual las células que carecen de la HSVtk (figura 45) son prácticamente insensibles (figuras 42, 43 y 51). De hecho, de todas las concentraciones ensayadas, la concentración 100  $\mu$ M resulta ser la más eficaz (figura 44) y es la máxima a partir de la cual, el GCV resulta tóxico para las células que carecen de la HSVtk (figura 42). No obstante, para una misma concentración de GCV, cada clon transfectado con el plásmido portador de la HSVtk, presenta una sensibilidad específica a este fármaco (figuras 43 y 51). En este sentido, se conoce que la sensibilidad al GCV depende de diferentes factores. Así mediante estudios de PET (Tomografía de Emisión de Positrones) se ha monitorizado la localización y magnitud de la expresión de la HSVtk,

observándose que una mayor expresión de la HSVtk, está directamente relacionada con una mayor eficacia del sistema de terapia génica (Jacobs *et al.*, 2001). Además, el estado de proliferación en el que se encuentra la célula también es fundamental para que el GCV pueda ser incorporado al DNA. Por otro lado, algunos tipos celulares se han mostrado resistentes al efecto del GCV. En este sentido, se conoce la existencia de bombas de resistencia a múltiples fármacos (MDR) que son capaces de eliminar los fármacos fuera de la célula y se ha observado que el silenciamiento de los genes MDR en combinación con la terapia génica suicida mejora la eficacia de esta terapia (Park *et al.*, 2008b). Por otro lado, según Tomacic y col. la  $\beta$ -polimerasa, al reparar los fallos que implica la incorporación del GCV en la cadena de DNA, reduce la eficacia del GCV (Tomicic *et al.*, 2001).

Con objeto de estudiar el posible efecto *bystander* promovido por la tolbutamida, se llevaron a cabo cocultivos de células HSVtk positivas y HSVtk negativas. De esta forma, se pretende conseguir una situación similar a la observada *in vivo* con los vectores que existen actualmente, con los cuales los porcentajes de transfección obtenidos son relativamente bajos y no alcanzan toda la población tumoral. Entre los agentes descritos hasta el momento con capacidad para mejorar la eficacia de la terapia génica suicida al potenciar el efecto *bystander* a través de las *gap junctions*, destacan el cAMP y sus derivados (Carystinos *et al.*, 1999; Kunishige *et al.*, 1998; Robe *et al.*, 2000). Para determinar la validez de nuestro modelo de terapia génica suicida, estudiamos el efecto del db-cAMP observando que en cocultivos de células de glioma C6 con un 10 % de células portadoras del gen de la HSVtk (C6TK), el tratamiento conjunto de GCV más db-cAMP resulta más eficaz que el tratamiento único con GCV (figura 47). No obstante, hay que mencionar que en los cultivos de células de glioma C6 sin transfectar o en las células C6TK, el tratamiento con la mezcla de GCV más db-cAMP también resulta más eficaz que el tratamiento único con GCV (figura 46). Sin embargo, en los cocultivos el aumento de la eficacia del tratamiento que promueve el db-cAMP es mayor (figura 47). Todo esto sugiere que el db-cAMP tiene efecto *per se* sobre la viabilidad de las células y que, además, en los cocultivos promueve el efecto *bystander*. De hecho, en los cocultivos la presencia de un inhibidor de las *gap junctions* como es la carbenoxolona (CBX) revierte parte del efecto del db-cAMP (figura 47) sugiriendo que el aumento de la comunicación intercelular a través de las *gap junctions* está aumentado la eficacia de la terapia génica suicida. Todos estos resultados nos permiten concluir que disponemos de un

modelo de terapia génica suicida adecuado para el estudio del efecto *bystander* así como de un agente, el db-cAMP, que promueve el efecto *bystander* en nuestro modelo y, que por lo tanto, puede ser utilizado como control positivo. Por consiguiente, decidimos abordar el estudio del posible efecto *bystander* de la tolbutamida en la terapia génica suicida.

Nuestros resultados indican que en los cultivos de células C6 sin transfectar ó C6TK, la tolbutamida no afecta significativamente a la viabilidad celular (figura 48). Sin embargo, en los cocultivos con un 10 % de células C6TK, la tolbutamida mejora la eficacia del GCV al reducir la viabilidad celular (figura 49). Además, la presencia de un inhibidor de las *gap junctions* como es la CBX revierte el efecto de la tolbutamida (figura 49) indicando que la tolbutamida promueve el efecto *bystander* en las células de glioma de rata C6 debido al aumento de la permeabilidad de las *gap junctions*.

Dado que en las células de glioma humano U373, la tolbutamida aumentó también la comunicación intercelular, decidimos estudiar el efecto de la tolbutamida en la terapia génica suicida en estas células. De esta forma, en cocultivos con un 50 % de células HSVtk positivas, la tolbutamida mejora la eficacia del tratamiento con GCV a lo largo del tiempo, ya que reduce la viabilidad celular (figura 52) y disminuye el número de células presentes en los cultivos (figura 53). Llama la atención el hecho de que las imágenes de microscopía (figura 52a) o la cuantificación de núcleos (figura 53) muestren un efecto mayor de la tolbutamida que el obtenido en la cuantificación de la viabilidad por el método del MTT (figura 52c). Puesto que está descrita la presencia de canales K-ATP mitocondriales en el cerebro (Bajgar *et al.*, 2001), es posible que la tolbutamida altere la mitocondria repercutiendo en la reducción del MTT por parte de las deshidrogenadas mitocondriales.

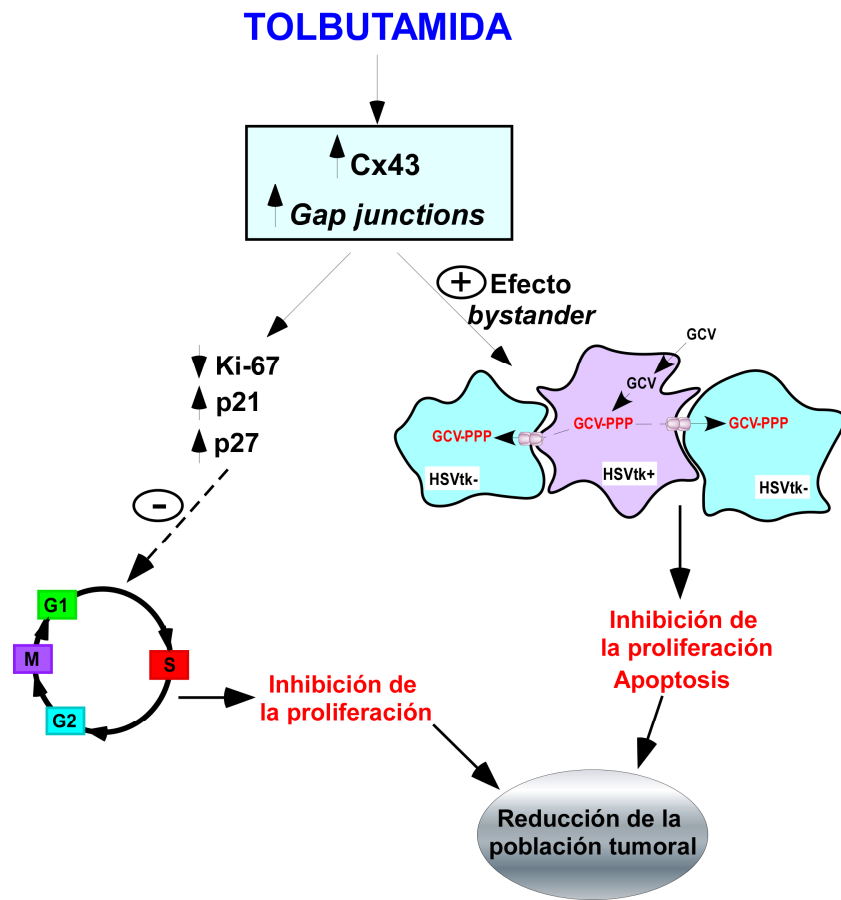
Los estudios realizados mediante dos técnicas que detectan apoptosis como son la tinción con anexina-V y la técnica TUNEL, muestran también una mayor eficacia de la terapia génica suicida en presencia de tolbutamida (figuras 54 y 55), lo cual aporta mayor solidez a la idea de que la tolbutamida promueve el efecto *bystander*. En este sentido, está ampliamente descrito que el GCV promueve la muerte de las células por apoptosis (Beltinger *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2005; Hamel *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 1998). Además, en presencia de tolbutamida, los eventos tempranos de apoptosis, determinados mediante la tinción con anexina-V, se observan

de forma importante desde el día 1 de tratamiento (figura 54b), mientras que en ausencia de tolbutamida se observan a partir del día 2. Es decir, que la tolbutamida adelanta los efectos de la terapia génica suicida. De hecho, mientras que en el tratamiento único con GCV la caída de la viabilidad celular se aprecia a partir del día 2 de tratamiento, cuando la tolbutamida está presente, esa caída es visible desde el día 1 de tratamiento (figura 52).

Los experimentos realizados en presencia de un inhibidor de las *gap junctions* como la CBX muestran una reversión del efecto de la tolbutamida indicando que, al igual que ocurre en las células de glioma de rata C6, el efecto *bystander* promovido por la tolbutamida en las células de glioma humano U373 se debe a su capacidad para aumentar la comunicación intercelular (figuras 56 y 57). Es más, el silenciamiento de la conexina 43 impide el efecto de la tolbutamida (figuras 58 y 59), lo que indica que el aumento de la permeabilidad de las *gap junctions* promovido por la tolbutamida y, por lo tanto, el efecto *bystander*, están directamente relacionados con la conexina 43, posiblemente debido al aumento de la formación de canales de comunicación intercelular. En este sentido, existen trabajos que muestran que la transfección de las células tumorales con el gen de la conexina 43 incrementa el efecto *bystander* (Dilber *et al.*, 1997; Marconi *et al.*, 2000).

Todos nuestros resultados, tomados en su conjunto, sugieren que los efectos promovidos por la tolbutamida en las células de glioma pueden tener un doble beneficio al inhibir la proliferación de estas células y promover el efecto *bystander* aumentando la eficacia de la terapia génica suicida (véase esquema 13). En este sentido, los canales K-ATP, a través de los cuales la tolbutamida ejerce su acción, podrían ser importantes dianas terapéuticas a la hora de diseñar nuevos fármacos para el tratamiento de los gliomas, aunque nuestro trabajo indica que no todos los tipos de glioma responden al tratamiento con esta sulfonilurea. Además, los resultados recogidos en esta memoria apoyan la idea de que la conexina 43 es una importante diana terapéutica en los gliomas, ya que aumenta la expresión de inhibidores de la proliferación, como son p21 y p27, y además, permite aumentar la eficacia de la terapia génica suicida al potenciar el efecto *bystander*.





Esquema 13. Efectos de la tolbutamida en las células de glioma.



“Un buen científico es aquel que puede unir su imaginación con la realidad mediante el puente de la ciencia”.

**A. Bernardin**





**1<sup>a</sup>:** La tolbutamida y el dibutiril-cAMP reducen la proliferación de las células de glioma de rata C6. Dicho efecto está mediado por el aumento de la expresión de la conexina 43 que promueve, a su vez, el aumento del inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas, p21.

**2<sup>a</sup>:** En las células de glioma humano T98, U373 y HTB12, existe una relación inversa entre el nivel de proliferación, determinado mediante la expresión de Ki-67, y la expresión de la conexina 43.

**3<sup>a</sup>:** La tolbutamida reduce la proliferación de las células de glioma humano U373 a través del aumento de la conexina 43, de forma similar a las células de glioma de rata C6. En las células de glioma U373, el efecto antiproliferativo de la tolbutamida lleva consigo el aumento de los inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas, p21 y p27, a través de la conexina 43. Por su parte, el dibutiril-cAMP reduce la proliferación de las células de glioma humano U373 y HTB12 de forma independiente de la conexina 43.

**4<sup>a</sup>:** En las células de glioma humano U373, el silenciamiento de la conexina 43 promueve un marcado efecto antiproliferativo relacionado, probablemente, con el aumento de p27.

**5<sup>a</sup>:** La implicación de los canales de potasio sensibles al ATP en el aumento de la conexina 43 promovido por la tolbutamida en las células de glioma de rata C6, sugiere que el efecto antiproliferativo de la tolbutamida en estas células se lleva a cabo a través de estos canales.

**6<sup>a</sup>:** Tanto en los astrocitos como en las células de glioma de rata C6, se expresan las subunidades SUR1 y SUR2 del canal de potasio sensible al ATP. Sin embargo, todas las líneas de glioma de rata y humano ensayadas se caracterizan por la ausencia de expresión de la subunidad Kir6.1 y la sobreexpresión de la subunidad Kir6.2 del canal de potasio sensible al ATP. Estos resultados sugieren la posible implicación de estas proteínas en el proceso de malignización celular en los gliomas.

**7<sup>a</sup>:** La tolbutamida promueve el efecto *bystander* mejorando la eficacia de la terapia génica suicida en las células de glioma de rata C6 y de glioma humano U373, gracias al aumento de la comunicación intercelular a través de las *gap junctions*. Además,

nuestros resultados sugieren que en las células U373, el aumento de la comunicación intercelular que da lugar al efecto *bystander* está directamente relacionado con el aumento de la conexina 43.

**Conclusión final:** Nuestros resultados, tomados en su conjunto, sugieren que los efectos promovidos por la tolbutamida en las células de glioma, a través del aumento de la conexina 43, pueden tener un doble beneficio al inhibir la proliferación de estas células y promover el efecto *bystander*, aumentando la eficacia de la terapia génica suicida. En este sentido, los canales de potasio sensibles al ATP, a través de los cuales la tolbutamida aumenta la expresión de la conexina 43, así como la propia conexina 43 pueden constituir importantes dianas terapéuticas en el tratamiento de los gliomas.

“El Arte es yo; la Ciencia es nosotros”.

**Claude Bernard**







Abdul M, Santo A, Hoosein N (2003). Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. *Anticancer Res* **23**: 3347-51.

Aghi M, Kramm CM, Chou TC, Breakefield XO, Chiocca EA (1998). Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J Natl Cancer Inst* **90**: 370-80.

Aguado T, Carracedo A, Julien B, Velasco G, Milman G, Mechoulam R *et al* (2007). Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J Biol Chem* **282**: 6854-62.

Aguilar-Bryan L, Bryan J (1999). Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* **20**: 101-35.

Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement IV JP, Boyd III AE, González G *et al* (1995). Cloning of the  $\beta$  cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**: 423-426.

Akyurek LM, Nallamshetty S, Aoki K, San H, Yang ZY, Nabel GJ *et al* (2001). Coexpression of guanylate kinase with thymidine kinase enhances prodrug cell killing in vitro and suppresses vascular smooth muscle cell proliferation in vivo. *Mol Ther* **3**: 779-86.

Ammerpohl O, Thormeyer D, Khan Z, Appelskog IB, Gojkovic Z, Almqvist PM *et al* (2004). HDACi phenylbutyrate increases bystander killing of HSV-tk transfected glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 8-14.

Amoroso S, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M (1990). Glucose, sulfonylureas and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Science* **247**: 852-854.

Ashcroft FM, Gribble FM (2000). New windows on the mechanism of action of K(ATP) channel openers. *Trends Pharmacol Sci* **21**: 439-45.

Ashcroft SJH, Ashcroft FM (1990). Properties and functions of ATP-sensitive k-channels. *Cell Signal* **2**: 197-214.

Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJ, Ashcroft FM (1999). Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. *Diabetes* **48**: 1341-7.

Asklund T, Appelskog IB, Ammerpohl O, Ekstrom TJ, Almqvist PM (2004). Histone deacetylase inhibitor 4-phenylbutyrate modulates glial fibrillary acidic protein and connexin 43 expression, and enhances gap-junction communication, in human glioblastoma cells. *Eur J Cancer* **40**: 1073-81.

Asklund T, Appelskog IB, Ammerpohl O, Langmoen IA, Dilber MS, Aints A *et al* (2003). Gap junction-mediated bystander effect in primary cultures of human malignant gliomas with recombinant expression of the HSVtk gene. *Exp Cell Res* **284**: 185-95.

Atkinson MM, Lampe PD, Lin HH, Kollander R, Li XR, Kiang DT (1995). Cyclic AMP modifies the cellular distribution of connexin43 and induces a persistent increase in the junctional permeability of mouse mammary tumor cells. *J Cell Sci* **108 ( Pt 9)**: 3079-90.

Auer RN, Del Maestro RF, Anderson R (1981). A simple and reproducible experimental in vivo glioma model. *Can J Neurol Sci* **8**: 325-31.

Azarnia R, Dahl G, Loewenstein WR (1981). Cell junction and cyclic AMP: III. Promotion of junctional membrane permeability and junctional membrane particles in a junction-deficient cell type. *J Membr Biol* **63**: 133-46.

Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, Garlid KD, Paucek P (2001). Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain. *J Biol Chem* **276**: 33369-74.

Barnett FH, Scharer-Schuksz M, Wood M, Yu X, Wagner TE, Friedlander M (2004). Intra-arterial delivery of endostatin gene to brain tumors prolongs survival and alters tumor vessel ultrastructure. *Gene Ther* **11**: 1283-9.

Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Meyer E, Uckert W, Debatin KM (1999). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8699-704.

Bennett MVL (1977). Electrical transmission: a functional analysis and comparison with chemical transmission. In: Kandel E (ed). *Cellular biology of neurons, Handbook of Physiology, The nervous system*. Williams and Wilkins: Baltimore. pp 357-416.

Bettinger I, Thanos S, Paulus W (2002). Microglia promote glioma migration. *Acta Neuropathol* **103**: 351-5.

Bex V, Mercier T, Chaumontet C, Gaillard-Sanchez I, Flechon B, Mazet F *et al* (1995). Retinoic acid enhances connexin43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells. *Cell Biochem Funct* **13**: 69-77.

Binmoeller FJ, Muller CM (1992). Postnatal-development of dye-coupling among astrocytes in rat visual-cortex. *Glia* **6**: 127-137.

Blazquez C, Gonzalez-Feria L, Alvarez L, Haro A, Casanova ML, Guzman M (2004). Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res* **64**: 5617-23.

Blazquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, Gonzalez-Feria L *et al* (2008). Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res* **68**: 1945-52.

Bolaños JP, Medina JM (1996). Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **66**: 2091-2099.

Bordey A, Sontheimer H (1998). Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells In situ: enigma of spiking glial cells. *J Neurophysiol* **79**: 2782-93.

Boucher PD, Im MM, Freytag SO, Shewach DS (2006). A novel mechanism of synergistic cytotoxicity with 5-fluorocytosine and ganciclovir in double suicide gene therapy. *Cancer Res* **66**: 3230-7.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Brady WA, Kokoris MS, Fitzgibbon M, Black ME (1996). Cloning, characterization, and modeling of mouse and human guanylate kinases. *J Biol Chem* **271**: 16734-40.

Brown FR, Jr., Friskey RW, Grindle L, Kinsell LW, Splitter S (1956). Treatment of diabetic patients; observations on the use of carbutamide and tolbutamide. *Calif Med* **85**: 285-8.

Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA (1985). Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* **56**: 1106-11.

Burt JM, Spray DC (1988). Ionotropic agents modulate gap junctional conductance between cardiac myocytes. *Am J Physiol* **254**: H1206-H1210.

Cao L, Si J, Wang W, Zhao X, Yuan X, Zhu H *et al* (2006). Intracellular localization and sustained prodrug cell killing activity of TAT-HSVTK fusion protein in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cells* **21**: 104-11.

Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann JL, Klatzmann D (1993). Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7024-8.

Carystinos G, Katabi M, Laird D, Galipeau J, Chan H, Alaoui-Jamali M *et al* (1999). Cyclic-AMP induction of gap junctional intercellular communication increases bystander effect in suicide gene therapy. *Clin. Cancer Res.* **5**: 61-68.

Cascante A, Abate-Daga D, Garcia-Rodriguez L, Gonzalez JR, Alemany R, Fillat C (2007). GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model. *Gene Ther* **14**: 1471-80.

Cascante A, Huch M, Rodriguez LG, Gonzalez JR, Costantini L, Fillat C (2005). Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression in vivo. *Hum Gene Ther* **16**: 1377-88.

Castro MG, Cowen R, Williamson IK, David A, Jimenez-Dalmaroni MJ, Yuan X *et al* (2003). Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther* **98**: 71-108.

Cole WC, Gardfield RE (1986). Evidence for physiological regulation of gap junction permeability. *Am. J. Physiol.* **215**: C411- C.

Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA (2001). Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* **276**: 41270-8.

Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK (1996). Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* **56**: 2405-10.

Craperi D, Vicat JM, Nissou MF, Mathieu J, Baudier J, Benabid AL *et al* (1999). Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line. *Hum Gene Ther* **10**: 679-88.

Chen W, Yan C, Hou J, Pu J, Ouyang J, Wen D (2008). ATRA enhances bystander effect of suicide gene therapy in the treatment of prostate cancer. *Urol Oncol* **26**: 397-405.

D'Abaco GM, Kaye AH (2007). Integrins: molecular determinants of glioma invasion. *J Clin Neurosci* **14**: 1041-8.

Dang X, Jeyaraman M, Kardami E (2006). Regulation of connexin-43-mediated growth inhibition by a phosphorylatable amino-acid is independent of gap junction-forming ability. *Mol Cell Biochem* **289**: 201-7.

Davidson JS, Baumgarten IM (1988). Glycyrrhetic acid derivatives: a novel class of inhibitors of gap-junctional intercellular communication. Structure-activity relationships. *J Pharmacol Exp Ther* **246**: 1104-7.

Davidson JS, Baumgarten IM, Harley EH (1986). Reversible inhibition of intercellular junctional communication by glycyrrhetic acid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **134**: 29-36.

De Mello WC (1984). Effect of intracellular injection of cAMP on the electrical coupling of mammalian cardiac cells. *Biochem Biophys Res Commun* **119**: 1001-7.

Delmar M, Coombs W, Sorgen P, Duffy HS, Taffet SM (2004). Structural bases for the chemical regulation of Connexin43 channels. *Cardiovasc Res* **62**: 268-75.

Dell'Acqua ML, Scott JD (1997). Protein kinase A anchoring. *J Biol Chem* **272**: 12881-4.

Demuth T, Berens ME (2004). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* **70**: 217-28.

Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M *et al* (2000). Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev* **32**: 45-56.

Dermietzel R, Hertzberg EL, Kessler JA, Spray DC (1991). Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular and electrophysiological analysis. *J. Neurosci.* **11**: 1421-1432.

Dewey RA, Morrissey G, Cowsill CM, Stone D, Bolognani F, Dodd NJ *et al* (1999). Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat Med* **5**: 1256-63.

Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, Bjorkstrand B, Kidder GM, Naus CC *et al* (1997). Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res* **57**: 1523-8.

Dwain I, Xiangpeng Y, Zeng Z, Patricia T, Joh SY (2006). Neural stem cells--a promising potential therapy for brain tumors. *Curr Stem Cell Res Ther* **1**: 79-84.

El-Fouly MH, Trosko JE, Chang C-C (1987). A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp. Cell Res.* **168**: 422-430.

Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI *et al* (1996). Gap junctions play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro. *Gene Ther* **3**: 85-92.

Enkvist MOK, McCarthy KD (1994). Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K<sup>+</sup> concentrations. *J. Neurochem.* **62**: 489-495.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V *et al* (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* **343**: 1350-4.

Fick J, Barker FG, 2nd, Dazin P, Westphale EM, Beyer EC, Israel MA (1995). The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11071-5.

Fischer U, Steffens S, Frank S, Rainov NG, Schulze-Osthoff K, Kramm CM (2005). Mechanisms of thymidine kinase/ganciclovir and cytosine deaminase/ 5-fluorocytosine suicide gene therapy-induced cell death in glioma cells. *Oncogene* **24**: 1231-43.

Folkins C, Man S, Xu P, Shaked Y, Hicklin DJ, Kerbel RS (2007). Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res* **67**: 3560-4.

Franco-Hernandez C, Martinez-Glez V, Rey JA (2007). [Biology molecular of glioblastomas]. *Neurocirugia (Astur)* **18**: 373-82.

Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL *et al* (1993). The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* **53**: 5274-83.

Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC (2004). CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem* **279**: 36943-50.

Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1999). Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* **155**: 387-94.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A *et al* (2007). Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* **21**: 2683-710.

Gagandeep S, Brew R, Green B, Christmas SE, Klatzmann D, Poston GJ *et al* (1996). Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther* **3**: 83-8.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S *et al* (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* **64**: 7011-21.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**: 493-501.

Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M *et al* (2004). Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* **279**: 36931-42.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C *et al* (1991). Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* **138**: 867-73.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* **31**: 13-20.

Ghosh P, Singh UN (1997). Intercellular communication in rapidly proliferating and differentiated C6 glioma cells in culture. *Cell Biol Int* **21**: 551-7.

Giaume C, Cordier J, Glowinski J (1992). Endothelins inhibit junctional permeability in cultured mouse astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* **4**: 877-881.

Giaume C, Fromaget C, El Aoumari A, Cordier J, Glowinski J, Gros D (1991a). Gap junction in cultured astrocytes: single channel currents and characterization of channel-forming protein. *Neuron* **6**: 133-143.

Giaume C, Marin P, Cordier J, Glowinski J, Premont J (1991b). Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5577-5581.

Giaume C, Taberner A, Medina JM (1997). Metabolic trafficking through astrocytic gap junctions. *Glia* **21**: 114-123.

Giepmans BN, Hengeveld T, Postma FR, Moolenaar WH (2001). Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* **276**: 8544-9.

Gilbertson RJ, Rich JN (2007). Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer* **7**: 733-6.

Gladson CL, Cheresch DA (1991). Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* **88**: 1924-32.

Gladson CL, Wilcox JN, Sanders L, Gillespie GY, Cheresh DA (1995). Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. *J Cell Sci* **108 ( Pt 3)**: 947-56.

Goldberg G, Moreno A, Bechberger J, Hearn S, Shivers R, MacPhee D *et al* (1996). Evidence that disruption of connexon particle arrangements in gap junction plaques is associated with inhibition of gap junctional communication by a glycyrrhetic acid derivative. *Exp. Cell Res.* **222**: 48-53.

Gonzalez-Aguero G, Gutierrez AA, Gonzalez-Espinosa D, Solano JD, Morales R, Gonzalez-Arenas A *et al* (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* **32**: 129-35.

Granda B, Tabernero A, Sánchez-Abarca LI, Medina JM (1998). The K-ATP channel regulates the effect of Ca<sup>2+</sup> on gap junction permeability in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* **427**: 41-45.

Gribble FM, Davis TM, Higham CE, Clark A, Ashcroft FM (2000). The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K-channels. *Br J Pharmacol* **131**: 756-60.

Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997a). The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J* **16**: 1145-52.

Gribble FM, Tucker SJ, Ashcroft FM (1997b). The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol* **504 ( Pt 1)**: 35-45.

Gribble FM, Tucker SJ, Seino S, Ashcroft FM (1998). Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K(ATP) channels. *Diabetes* **47**: 1412-8.

Guan X, Wilson S, Schlender KK, Ruch RJ (1996). Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18 beta-glycyrrhetic acid. *Mol. Carcinog.* **16**: 157-64.

Gudinaviciene I, Pranys D, Juozaityte E (2004). Impact of morphology and biology on the prognosis of patients with gliomas. *Medicina (Kaunas)* **40**: 112-20.

Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP, Israel MA (1996). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res* **56**: 2697-702.

Hampson ECGM, Vaney DI, Weiler R (1992). Dopaminergic Modulation of Gap Junction Permeability Between Amacrine Cells in Mammalian Retina. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE* **12**: 4911-4922.

Hanna E, Umhauer S, Roshong S, Piechocki M, Fernstrom M, Fanning J *et al* (1999). Gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas in vivo and in vitro. *Carcinogenesis* **20**: 1369-1373.

Hasselblatt M, Bunte M, Dringen R, Tabernero A, Medina JM, Giaume C *et al* (2003). Effect of endothelin-1 on astrocytic protein content. *Glia* **42**: 390-7.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M *et al* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 997-1003.

Higgins CF (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 67-113.

Hirschi K, Xu C, Tsukamoto T, Sager R (1996). Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell Growth Diff.* **7**: 861-870.

Holden PR, McGuire B, Stoler A, Balmain A, Pitts JD (1997). Changes in gap junctional intercellular communication in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* **18**: 15-21.

Huang Q, Pu P, Xia Z, You Y (2007). Exogenous wt-p53 enhances the antitumor effect of HSV-TK/GCV on C6 glioma cells. *J Neurooncol* **82**: 239-48.

Huang R-P, Hossain M, Sehgal A, Boynton A (1999). Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. *J. Surg. Oncol.* **70**: 21-24.

Huang R, Fan Y, Hossain M, Peng A, Zeng Z, Boynton A (1998). Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res.* **58**: 5089-5096.

Immonen A, Vapalahti M, Tyynela K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R *et al* (2004). AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther* **10**: 967-72.

Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J *et al* (1996). A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **16**: 1011-7.

Inagaki N, Gono T, Clement JPI, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G *et al* (1995a). Reconstitution of  $I_{KATP}$ : An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**: 1166-1170.

Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M *et al* (1995b). Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* **270**: 5691-4.

Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y *et al* (1996). A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* **271**: 24321-4.

Izquierdo M, Martin V, de Felipe P, Izquierdo JM, Perez-Higueras A, Cortes ML *et al* (1996). Human malignant brain tumor response to herpes simplex thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir gene therapy. *Gene Ther* **3**: 491-5.



Jacobs A, Voges J, Reszka R, Lercher M, Gossmann A, Kracht L *et al* (2001). Positron-emission tomography of vector-mediated gene expression in gene therapy for gliomas. *Lancet* **358**: 727-9.

Jeon JY, An JH, Kim SU, Park HG, Lee MA (2008). Migration of human neural stem cells toward an intracranial glioma. *Exp Mol Med* **40**: 84-91.

Jia G, Cheng G, Gangahar DM, Agrawal DK (2008). Involvement of connexin 43 in angiotensin II-induced migration and proliferation of saphenous vein smooth muscle cells via the MAPK-AP-1 signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* **44**: 882-90.

Jimenez T, Fox WP, Naus CC, Galipeau J, Belliveau DJ (2006). Connexin over-expression differentially suppresses glioma growth and contributes to the bystander effect following HSV-thymidine kinase gene therapy. *Cell Commun Adhes* **13**: 79-92.

Johannessen AL, Torp SH (2006). The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res* **12**: 143-7.

Kamei J, Toyofuku T, Hori M (2003). Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **312**: 380-7.

Kanemitsu MY, Jiang W, Eckhart W (1998). Cdc2-mediated phosphorylation of the gap junction protein, connexin43, during mitosis. *Cell Growth Differ* **9**: 13-21.

Kanzawa T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2003). Current and Future Gene Therapy for Malignant Gliomas. *J Biomed Biotechnol* **2003**: 25-34.

Kardami E, Dang X, Iacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W *et al* (2007). The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog Biophys Mol Biol* **94**: 245-64.

Keating MR (1999). Antiviral agents for non-human immunodeficiency virus infections. *Mayo Clin Proc* **74**: 1266-83.

Kettenmann H, Ransom BR (eds) (1995) *Neuroglia*. Oxford University Press: New York, 1079pp.

Kim SK, Cargioli TG, Machluf M, Yang W, Sun Y, Al-Hashem R *et al* (2005). PEX-producing human neural stem cells inhibit tumor growth in a mouse glioma model. *Clin Cancer Res* **11**: 5965-70.

Kirla RM, Haapasalo HK, Kalimo H, Salminen EK (2003). Low expression of p27 indicates a poor prognosis in patients with high-grade astrocytomas. *Cancer* **97**: 644-8.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* **3**: 255-68.

Kleihues P, Sobin LH (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer* **88**: 2887.

Koffler L, Roshong S, Kyu Park I, Cesen-Cummings K, Thompson DC, Dwyer-Nield LD *et al* (2000). Growth inhibition in G(1) and altered expression of cyclin D1 and p27(kip-1) after forced connexin expression in lung and liver carcinoma cells. *J Cell Biochem* **79**: 347-54.

Komata T, Kanzawa T, Kondo Y, Kondo S (2002). Telomerase as a therapeutic target for malignant gliomas. *Oncogene* **21**: 656-63.

Kondo S, Kondo Y, Li G, Silverman RH, Cowell JK (1998). Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene* **16**: 3323-30.

Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 781-6.

Konduri SD, Srivenugopal KS, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M *et al* (2003). Promoter methylation and silencing of the tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), a gene encoding an inhibitor of matrix metalloproteinases in human glioma cells. *Oncogene* **22**: 4509-16.

Koul D, Parthasarathy R, Shen R, Davies MA, Jasser SA, Chintala SK *et al* (2001). Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN. *Oncogene* **20**: 6669-78.

Kren BT, Kumar NM, Wang SQ, Gilula NB, Steer CJ (1993). Differential regulation of multiple gap junction transcripts and proteins during rat liver regeneration. *J Cell Biol* **123**: 707-18.

Kumar NM, Gilula NB (1996). The gap junction communication channel. *Cell* **84**: 381-388.

Kunishige I, Samejima Y, Moriyama A, Saji F, Murata Y (1998). cAMP stimulates the bystander effect in suicide gene therapy of human choriocarcinoma. *Anticancer Res* **18**: 3411-9.

Kuriyama S, Masui K, Sakamoto T, Nakatani T, Kikukawa M, Tsujinoue H *et al* (1998). Bystander effect caused by cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine in vitro is substantially mediated by generated 5-fluorouracil. *Anticancer Res* **18**: 3399-406.

Kwak BR, Jongsma HJ (1996). Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol Cell Biochem* **157**: 93-9.

Laird D, Fistouris P, Batist G, Alpert L, Huynh H, Carystinos G *et al* (1999). Deficiency of connexin43 gap junctions is an independent marker for breast tumors. *Cancer Res* **59**: 4104-4110.

Laird DW, Puranam KL, Revel JP (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *Biochem J* **273(Pt 1)**: 67-72.

- Lampe PD, Kurata WE, Warn-Cramer BJ, Lau AF (1998). Formation of a distinct connexin43 phosphoisoform in mitotic cells is dependent upon p34cdc2 kinase. *J Cell Sci* **111** ( Pt 6): 833-41.
- Lampe PD, Lau AF (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* **384**: 205-15.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J *et al* (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**: 645-8.
- Lavado E, Sánchez-Abarca LI, Tabernero A, Bolaños JP, Medina JM (1997). Oleic acid inhibits gap junction permeability and increases glucose uptake in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **69**: 721-728.
- Lin JH, Takano T, Cotrina ML, Arcuino G, Kang J, Liu S *et al* (2002). Connexin 43 enhances the adhesion and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci* **22**: 4302-11.
- Loewenstein W (1992). The cell-cell channel in the control of growth. *Semin. Cell Biol.* **3**: 59-79.
- Loewenstein WR (1987). The cell-to-cell channel of gap junctions. *Cell* **48**: 725-726.
- Loewenstein WR, Kanno Y (1966). Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature* **209**: 1248-1249.
- Macfarlane S, Sontheimer H (1997). Electrophysiological changes that accompany reactive gliosis in vitro. *J. Neurosci.* **17**: 7316-7329.
- Malhi H, Irani AN, Rajvanshi P, Suadcani SO, Spray DC, McDonald TV *et al* (2000). KATP channels regulate mitogenically induced proliferation in primary rat hepatocytes and human liver cell lines. Implications for liver growth control and potential therapeutic targeting. *J Biol Chem* **275**: 26050-7.
- Mantz J, Cordier J, Giaume C (1993). Effects of general anesthetics on intercellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture. *Lab. Invest.* **78**: 892-901.
- Marconi P, Tamura M, Moriuchi S, Krisky DM, Niranjana A, Goins WF *et al* (2000). Connexin 43-enhanced suicide gene therapy using herpesviral vectors. *Mol Ther* **1**: 71-81.
- Martínez AD, Eugenin EA, Branes MC, Bennett MV, Saez JC (2002). Identification of second messengers that induce expression of functional gap junctions in microglia cultured from newborn rats. *Brain Res* **943**: 191-201.
- Martinez AD, Saez JC (1999). Arachidonic acid-induced dye uncoupling in rat cortical astrocytes is mediated by arachidonic acid byproducts. *Brain Res* **816**: 411-23.

Matono S, Tanaka T, Sueyoshi S, Yamana H, Fujita H, Shirouzu K (2003). Bystander effect in suicide gene therapy is directly proportional to the degree of gap junctional intercellular communication in esophageal cancer. *Int J Oncol* **23**: 1309-15.

McDonough WS, Johansson A, Joffe H, Giese A, Berens ME (1999). Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility. *Int J Dev Neurosci* **17**: 601-11.

Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR (1986). Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell* **44**: 187-96.

Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR (1989). The actions of retinoids on cellular growth correlate with their actions on gap junctional communication. *J Cell Biol* **108**: 1053-65.

Mehta PP, Hotz-Wagenblatt A, Rose B, Shalloway D, Loewenstein WR (1991). Incorporation of the gene for a cell-cell channel protein into transformed cells leads to normalization of growth. *J Membr Biol* **124**: 207-25.

Mehta PP, Lokeshwar BL, Schiller PC, Bendix MV, Ostenson RC, Howard GA *et al* (1996). Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. *Mol Carcinog* **15**: 18-32.

Mehta PP, Yamamoto M, Rose B (1992). Transcription of the gene for the gap junctional protein connexin43 and expression of functional cell-to-cell channels are regulated by cAMP. *Mol Biol Cell* **3**: 839-50.

Mesnil M, Piccoli C, Krutovskikh V, Elfgang C, Traub O, Willecke K *et al* (1995). Negative growth control of HeLa cells by connexin genes: connexin-species specificity. *Cancer Res*. **55**: 629-639.

Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H (1996). Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1831-5.

Mesnil M, Yamasaki H (2000). Bystander effect in herpes simple virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: Role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res*. **60**: 3989-3999.

Miura F, Moriuchi S, Maeda M, Sano A, Maruno M, Tsanaclis AM *et al* (2002). Sustained release of low-dose ganciclovir from a silicone formulation prolonged the survival of rats with gliosarcomas under herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene therapy. *Gene Ther* **9**: 1653-8.

Mizuno M, Yoshida J, Colosi P, Kurtzman G (1998). Adeno-associated virus vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene causes complete regression of intracerebrally implanted human gliomas in mice, in conjunction with ganciclovir administration. *Jpn J Cancer Res* **89**: 76-80.

Moolten FL (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* **46**: 5276-81.

Moorby C, Patel M (2001). Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res* **271**: 238-48.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.

Mugnaini E (1986). Cell junctions of astrocytes, ependyma and related cells in the mammalian central nervous system, with emphasis on the hypothesis of a generalized functional syncytium of supporting cells. In: Fedoroff S and Vernadakis A (eds). *Astrocytes*. Academic Press, Inc.: New York. pp 329-371.

Mukai S, Kondo Y, Koga S, Komata T, Barna BP, Kondo S (2000). 2-5A antisense telomerase RNA therapy for intracranial malignant gliomas. *Cancer Res* **60**: 4461-7.

Nabors LB, Mikkelsen T, Rosenfeld SS, Hochberg F, Akella NS, Fisher JD *et al* (2007). Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* **25**: 1651-7.

Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y *et al* (2001a). p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* **11**: 159-68.

Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001b). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* **22**: 1715-9.

Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001c). Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* **81**: 77-82.

Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH *et al* (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-7.

Naus CC (2002). Gap junctions and tumour progression. *Can J Physiol Pharmacol* **80**: 136-41.

Naus CC, Bechberger JF, Zhang Y, Venance L, Yamasaki H, Juneja SC *et al* (1997). Altered gap junctional communication, intercellular signaling, and growth in cultured astrocytes deficient in connexin 43. *J. Neurosci. Res.* **49**: 528-540.

Naus CCG, Bechberger JF, Caveney S, Wilson JX (1991). Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. *Neurosci. Lett.* **126**: 33-36.

Nnamani C, Godwin A, Ducsay CA, Longo LD, Fletcher WH (1994). Regulation of cell-cell communication mediated by connexin 43 in rabbit myometrial cells. *Biol Reprod* **50**: 377-89.

Noma A (1983). ATP regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* **305**: 147-148.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL *et al* (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* **64**: 6892-9.

Ohgaki H, Kleihues P (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* **170**: 1445-53.

Oliveira R, Christov C, Guillamo JS, de Bouard S, Palfi S, Venance L *et al* (2005). Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol* **6**: 7.

Olsen ML, Sontheimer H (2004). Mislocalization of Kir channels in malignant glia. *Glia* **46**: 63-73.

Park JY, Elshami AA, Amin K, Rizk N, Kaiser LR, Albelda SM (1997). Retinoids augment the bystander effect in vitro and in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated gene therapy. *Gene Ther* **4**: 909-17.

Park K, Kim WJ, Cho YH, Lee YI, Lee H, Jeong S *et al* (2008a). Cancer gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Front Biosci* **13**: 2653-9.

Park SY, Lee W, Lee J, Kim IS (2008b). Combination gene therapy using multidrug resistance (MDR1) gene shRNA and herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Lett* **261**: 205-14.

Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG (2005). Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* **65**: 6207-19.

Paulson AF, Lampe PD, Meyer RA, TenBroek E, Atkinson MM, Walseth TF *et al* (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci* **113**: 3037-49.

Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ (2001). p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* **264**: 148-68.

Pitts JD, Hamilton AE, Kam E, Burk RR, Murphy JP (1986). Retinoic acid inhibits junctional communication between animal cells. *Carcinogenesis* **7**: 1003-10.

Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F (2002). Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* **51 Suppl 3**: S368-76.

Pu P, Xia Z, Yu S, Huang Q (2004). Altered expression of Cx43 in astrocytic tumors. *Clin Neurol Neurosurg* **107**: 49-54.

Qin H, Shao Q, Curtis H, Galipeau J, Belliveau DJ, Wang T *et al* (2002). Retroviral delivery of connexin genes to human breast tumor cells inhibits in vivo tumor growth by a mechanism that is independent of significant gap junctional intercellular communication. *J Biol Chem* **277**: 29132-8.

Rainov NG (2000). A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther* **11**: 2389-401.

- Rainov NG, Ren H (2003). Gene therapy for human malignant brain tumors. *Cancer J* **9**: 180-8.
- Ransom CB, Sontheimer H (1995). Biophysical and pharmacological characterization of inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in rat spinal cord astrocytes. *J Neurophysiol* **73**: 333-46.
- Rao CN, Lakka SS, Kin Y, Konduri SD, Fuller GN, Mohanam S *et al* (2001). Expression of tissue factor pathway inhibitor 2 inversely correlates during the progression of human gliomas. *Clin Cancer Res* **7**: 570-6.
- Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP (1993). Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* **53**: 2736-9.
- Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP (1994). Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* **54**: 4299-303.
- Reimann F, Tucker SJ, Proks P, Ashcroft FM (1999). Involvement of the n-terminus of Kir6.2 in coupling to the sulphonylurea receptor. *J Physiol* **518** ( Pt 2): 325-36.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nat* **414**: 105-111.
- Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL *et al* (2004). Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* **22**: 133-42.
- Robe PA, Jolois O, N'Guyen M, Princen F, Malgrange B, Merville MP *et al* (2004). Modulation of the HSV-TK/ganciclovir bystander effect by n-butyrate in glioblastoma: correlation with gap-junction intercellular communication. *Int J Oncol* **25**: 187-92.
- Robe PA, Princen F, Martin D, Malgrange B, Stevenaert A, Moonen G *et al* (2000). Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system: effects of dibutyl adenine 3',5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetic acid, and cytosine arabinoside. *Biochem Pharmacol* **60**: 241-9.
- Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, Freytag SO (1997). Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther* **8**: 73-85.
- Sáez JC, Connor JA, Spray DC, Bennet MVL (1989). Hepatocyte gap junctions are permeable to second messenger, inositol 1,4,5-triphosphate, and to calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2708-2712.
- Sagar GD, Larson DM (2006). Carbenoxolone inhibits junctional transfer and upregulates Connexin43 expression by a protein kinase A-dependent pathway. *J Cell Biochem* **98**: 1543-51.

Saito T, Nishimura M, Kudo R, Yamasaki H (2001). Suppressed gap junctional intercellular communication in carcinogenesis of endometrium. *Int J Cancer* **93**: 317-23.

Saleh M, Stacker SA, Wilks AF (1996). Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res* **56**: 393-401.

Sanchez-Alvarez R, Paino T, Herrero-Gonzalez S, Medina JM, Tabernero A (2006). Tolbutamide reduces glioma cell proliferation by increasing connexin43, which promotes the up-regulation of p21 and p27 and subsequent changes in retinoblastoma phosphorylation. *Glia* **54**: 125-34.

Sánchez-Alvarez R, Tabernero A, Medina JM (2004). Endothelin-1 stimulates the translocation and upregulation of both glucose transporter and hexokinase in astrocytes: relationship with gap junctional communication. *J Neurochem* **89**: 703-714.

Sánchez-Alvarez R, Tabernero A, Medina JM (2005). The increase in gap junctional communication decreases the rate of glucose uptake in C6 glioma cells by releasing hexokinase from mitochondria. *Brain Res* **1039**: 189-98.

Sánchez-Alvarez R, Tabernero A, Sanchez-Abarca LI, Orfao A, Giaume C, Medina JM (2001). Proliferation of C6 glioma cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide. *FEBS Lett.* **509**: 202-6.

Sanchez C, de Ceballos ML, del Pulgar TG, Rueda D, Corbacho C, Velasco G *et al* (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* **61**: 5784-9.

Sandmair AM, Loimas S, Puranen P, Immonen A, Kossila M, Puranen M *et al* (2000). Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther* **11**: 2197-205.

Sanson M, Marcaud V, Robin E, Valery C, Sturtz F, Zalc B (2002). Connexin 43-mediated bystander effect in two rat glioma cell models. *Cancer Gene Ther* **9**: 149-55.

Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002). The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* **99**: 507-12.

Schlegel J, Merdes A, Stumm G, Albert FK, Forsting M, Hynes N *et al* (1994). Amplification of the epidermal-growth-factor-receptor gene correlates with different growth behaviour in human glioblastoma. *Int J Cancer* **56**: 72-7.

Schlingensiepen KH, Schlingensiepen R, Steinbrecher A, Hau P, Bogdahn U, Fischer-Blass B *et al* (2006). Targeted tumor therapy with the TGF-beta2 antisense compound AP 12009. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**: 129-39.

Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP (1994). CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* **54**: 6321-4.



- Schwartz B, Benoist C, Abdallah B, Rangara R, Hassan A, Scherman D *et al* (1996). Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain. *Gene Ther* **3**: 405-11.
- Seino S, Miki T (2003). Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Prog Biophys Mol Biol* **81**: 133-76.
- Shah MM, Martinez AM, Fletcher WH (2002). The connexin43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: in vivo and in vitro studies. *Mol Cell Biochem* **238**: 57-68.
- Shao Q, Wang H, McLachlan E, Veitch GI, Laird DW (2005). Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. *Cancer Res* **65**: 2705-11.
- Shapiro JR (2002). Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors. *Am J Med Genet* **115**: 194-201.
- Shaw MM, Gurr WK, Watts PA, Littler E, Field HJ (2001). Ganciclovir and penciclovir, but not acyclovir, induce apoptosis in herpes simplex virus thymidine kinase-transformed baby hamster kidney cells. *Antivir Chem Chemother* **12**: 175-86.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501-12.
- Shimato S, Natsume A, Takeuchi H, Wakabayashi T, Fujii M, Ito M *et al* (2007). Human neural stem cells target and deliver therapeutic gene to experimental leptomeningeal medulloblastoma. *Gene Ther* **14**: 1132-42.
- Shyng S, Ferrigni T, Nichols CG (1997). Regulation of KATP channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol* **110**: 643-54.
- Simpson L, Galanis E (2006). Recurrent glioblastoma multiforme: advances in treatment and promising drug candidates. *Expert Rev Anticancer Ther* **6**: 1593-607.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J *et al* (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**: 5821-8.
- Skatchkov SN, Rojas L, Eaton MJ, Orkand RK, Biedermann B, Bringmann A *et al* (2002). Functional expression of Kir 6.1/SUR1-K(ATP) channels in frog retinal Muller glial cells. *Glia* **38**: 256-67.
- Smitt PS, Driesse M, Wolbers J, Kros M, Avezaat C (2003). Treatment of relapsed malignant glioma with an adenoviral vector containing the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. *Mol Ther* **7**: 851-8.
- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K (2005). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* **6**: 191-200
- Sontheimer H (2004). Ion channels and amino acid transporters support the growth and invasion of primary brain tumors. *Mol Neurobiol* **29**: 61-71.

Soroceanu L, Manning T, Sontheimer H (2001). Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* **33**: 107-117.

Stark AM, Nabavi A, Mehdorn HM, Blomer U (2005). Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution. *Surg Neurol* **63**: 162-9; discussion 169.

Stewart BW, Kleihues, P. (2003). pp 351.

Sturgess NC, Kozlowski RZ, Carrington CA, Hales CN, Ashford ML (1988). Effects of sulphonylureas and diazoxide on insulin secretion and nucleotide-sensitive channels in an insulin-secreting cell line. *Br J Pharmacol* **95**: 83-94.

Tabernero A, Giaume C, Medina JM (1996). Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured rat astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* **16**: 187-195.

Tabernero A, Jimenez C, Velasco A, Giaume C, Medina JM (2001). The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication is due to an increase in astrocyte proliferation. *J. Neurochem.* **78**: 890-8.

Tang Q, Zhang D, Wan M, Jin L (2007). Experimental study of the RV-HSV-TK/GCV suicide gene therapy system in gastric cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **22**: 755-61.

Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**: 971-1005.

Thomas CE, Schiedner G, Kochanek S, Castro MG, Lowenstein PR (2000). Peripheral infection with adenovirus causes unexpected long-term brain inflammation in animals injected intracranially with first-generation, but not with high-capacity, adenovirus vectors: toward realistic long-term neurological gene therapy for chronic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7482-7.

Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y *et al* (1998). PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**: 684-9.

Tomicic MT, Thust R, Sobol RW, Kaina B (2001). DNA polymerase beta mediates protection of mammalian cells against ganciclovir-induced cytotoxicity and DNA breakage. *Cancer Res* **61**: 7399-403.

Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M (1998). Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 12725-12731.

Trojan J, Johnson TR, Rudin SD, Ilan J, Tykocinski ML (1993). Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I RNA. *Science* **259**: 94-7.

Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM (1997). Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**: 179-83.

Ueda K, Matsuo M, Tanabe K, Morita K, Kioka N, Amachi T (1999). Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1461**: 305-13.

Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efield JT, von Deimling A, Louis DN (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* **56**: 150-3.

Ural AU, Takebe N, Adhikari D, Ercikan-Abali E, Banerjee D, Barakat R *et al* (2000). Gene therapy for endometrial carcinoma with the herpes simplex thymidine kinase gene. *Gynecol Oncol* **76**: 305-10.

Velasco A, Tabernero A, Granda B, Medina JM (2000). ATP-sensitive potassium channel regulates astrocytic gap junction permeability by a Ca<sup>2+</sup> independent mechanism. *J. Neurochem.* **74**: 1249-1256.

Vera B, Sánchez-Abarca LI, Bolaños JP, Medina JM (1996). Inhibition of astrocyte gap junctional communication by ATP depletion is reversed by calcium sequestration. *FEBS Lett.* **392**: 225-228.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**: 39-51.

Vile RG, Castleden S, Marshall J, Camplejohn R, Upton C, Chong H (1997). Generation of an anti-tumour immune response in a non-immunogenic tumour: HSVtk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of intratumoural cytokine expression. *Int J Cancer* **71**: 267-74.

Vincent AJ, Vogels R, Someren GV, Esandi MC, Noteboom JL, Avezaat CJ *et al* (1996). Herpes simplex virus thymidine kinase gene therapy for rat malignant brain tumors. *Hum Gene Ther* **7**: 197-205.

Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Reardon DA, Quinn JA *et al* (2007). Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* **13**: 1253-9.

Wang X, Zhang GR, Yang T, Zhang W, Geller AI (2000). Fifty-one kilobase HSV-1 plasmid vector can be packaged using a helper virus-free system and supports expression in the rat brain. *Biotechniques* **28**: 102-7.

Wei SJ, Chao Y, Hung YM, Lin WC, Yang DM, Shih YL *et al* (1998). S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Exp Cell Res* **241**: 66-75.

Willmon CL, Krabbenhoft E, Black ME (2006). A guanylate kinase/HSV-1 thymidine kinase fusion protein enhances prodrug-mediated cell killing. *Gene Ther* **13**: 1309-12.

Wondergem R, Cregan M, Strickler L, Miller R, Suttles J (1998). Membrane potassium channels and human bladder tumor cells: II. Growth properties. *J Membr Biol* **161**: 257-62.

Woodfork KA, Wonderlin WF, Peterson VA, Strobl JS (1995). Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *J Cell Physiol* **162**: 163-71.

Yamamoto T, Ochalski A, Hertzberg EL, Nagy JI (1990). On the organization of astrocytic gap-junctions in rat-brain as suggested by LM-immunohistochemistry and EM-immunohistochemistry of connexin-43 expression. *J. Comp. Neurol.* **302**: 853-883.

Yamasaki H (1990). Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**: 1051-1058.

Yamasaki H, Omori Y, Krutovskikh V, Zhu W, Mironov N, Yamakage K *et al* (1999). Connexins in tumour suppression and cancer therapy. *Novartis Found Symp* **219**: 241-54.

Yang SH, Oh TK, Kim ST (2005). Increased anti-tumor effect by a combination of HSV thymidine kinase suicide gene therapy and interferon-gamma/GM-CSF cytokine gene therapy in CT26 tumor model. *J Korean Med Sci* **20**: 932-7.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4407-11.

Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N (1998). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **274**: C25-37.

Yoshida T, Mizuno M, Taniguchi K, Nakayashiki N, Wakabayashi T, Yoshida J (2001). Rat glioma cell death induced by cationic liposome-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene followed by ganciclovir treatment. *J Surg Oncol* **76**: 19-25.

Zhang JH, Wan MX, Pan BR, Yu B (2004). Cytotoxicity of HSVtk and hrTNF-alpha fusion genes with IRES in treatment of gastric cancer. *Cancer Biol Ther* **3**: 1075-80.

Zhang XF, Ren ZY, Fang FD, Zuo J, Su CB, Wang RZ *et al* (2002). [Synergistic effect of all-trans retinoic acid and herpes simplex virus thymidine kinase gene on glioma]. *Ai Zheng* **21**: 473-9.

Zhang YW, Kaneda M, Morita I (2003a). The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem* **278**: 44852-6.

Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW, Murota S (2001). Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* **20**: 4138-49.

Zhang YW, Nakayama K, Morita I (2003b). A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* **63**: 1623-30.

Zhao P, Wang C, Fu Z, You Y, Cheng Y, Lu X *et al* (2007). Lentiviral vector mediated siRNA knock-down of hTERT results in diminished capacity in invasiveness and in vivo

growth of human glioma cells in a telomere length-independent manner. *Int J Oncol* **31**: 361-8.

Zheng S, Ulasov IV, Han Y, Tyler MA, Zhu ZB, Lesniak MS (2007a). Fiber-knob modifications enhance adenoviral tropism and gene transfer in malignant glioma. *J Gene Med* **9**: 151-60.

Zheng X, Shen G, Yang X, Liu W (2007b). Most C6 cells are cancer stem cells: evidence from clonal and population analyses. *Cancer Res* **67**: 3691-7.

Zhu D, Caveney S, Kidder GM, Naus CCG (1991). Transfection of C6 glioma-cells with connexin-43 cDNA - analysis of expression, intercellular coupling, and cell-proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1883-1887.

Zhu DG, Kidder GM, Caveney S, Naus CCG (1992). Growth retardation in glioma cells cocultured with cells overexpressing a gap junction protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10218-10221.

Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP *et al* (2001). Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K<sup>+</sup> conductance. *Neuron* **31**: 233-45.

Zolota V, Tsamandas AC, Aroukatos P, Panagiotopoulos V, Maraziotis T, Poulos C *et al* (2008). Expression of cell cycle inhibitors p21, p27, p14 and p16 in gliomas. Correlation with classic prognostic factors and patients' outcome. *Neuropathology* **28**: 35-42.

Zou L, Zhou H, Pastore L, Yang K (2000). Prolonged transgene expression mediated by a helper-dependent adenoviral vector (hdAd) in the central nervous system. *Mol Ther* **2**: 105-13.