



## Actividad de la ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> en las vesículas de la membrana plasmática del carcinoma mamario

Edith Lucía Salazar Esquivel, \* Leobardo Calzada Sánchez\*\*

### RESUMEN

**Antecedentes:** la ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> es un marcador útil para precisar el origen de las células de tejidos de la mama con cáncer.

**Objetivo:** demostrar, mediante detección histoquímica, la actividad de la ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> y la viabilidad de las vesículas de la membrana plasmática aisladas de tejidos con carcinoma mamario.

**Pacientes y método:** se procesó tejido tumoral mamario de algunas de las pacientes que asistieron a consulta al servicio de oncología mamaria del Hospital de Ginecoobstetricia núm. 4 Dr. Luis Castelazo Ayala, IMSS. Parte del tejido del adenocarcinoma se homogeneizó en cuatro volúmenes de solución TED a 4°C (Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.0015 M y ditiotreitol 0.001 M, pH 7.4) y luego se centrifugó. El precipitado obtenido se homogenizó y estratificó en un gradiente discontinuo de sacarosa (del 20 al 55%), y luego se centrifugó durante 60 minutos a 30,000 xg. Con el fin de demostrar la actividad de la ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> en las vesículas de la membrana plasmática, la suspensión obtenida se incubó en un medio con Tris-maleato 0.04 M, adenosintrifosfato (ATP) 0.004 M, MgCl 20.004 M, NaCl 0.1 M y Pb (NO<sub>3</sub>) 20.005 M, pH 7.0. La reacción se realizó a 37°C durante 15 minutos, en vesículas prefijadas y no fijadas en una mezcla de glutaraldehido al 3% con amortiguador de cacodilatos 0.1 M, pH7.4, durante 60 min.

**Resultados:** el estudio de histoquímica demostró que las vesículas que se obtuvieron de tejidos de mama con cáncer son de origen membranal y que siguen siendo viables después de la progresión tumoral.

**Palabras clave:** ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, membrana plasmática, progresión tumoral.

### ABSTRACT

**Background:** -Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase is a useful marker which determines the origin of breast cancer cells.

**Objective:** -Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity, as well as viability of plasma membrane vesicles isolated from breast carcinoma tissues were demonstrated by histochemical detection.

**Patients and method:** Breast carcinoma tissue samples of patients who attended consultation in the oncology service at Hospital de Ginecoobstetricia Núm. 4 Dr. Luis Castelazo Ayala, IMSS were examined. Tissue samples from adenocarcinoma were homogenized in 4 volumes of TED solution at 4°C (Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.0015 M, ditiotreitol 0.001 M, pH 7.4) and subsequently centrifuged. The collected sample was homogenized and stratified in a discontinuous sucrose gradient (20 to 50%) and then centrifuged for 60 min at 30,000 xg. In order to determine -Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity in plasma membrane vesicles, suspension was incubated at Tris-maleate 0.04 M, adenosine triphosphate (ATP) 0.004 M, MgCl 20.004 M, NaCl 0.1 M y Pb (NO<sub>3</sub>) 20.005 M, pH 7.0. Reactions were carried out for 15 min at 37°C in prefixed vesicles in 3% glutaraldehyde in 0.1 M, cacodylate buffer stock, pH7.4 for 60 min.

**Results:** Histochemical detection demonstrated membrane vesicles from breast carcinoma tissues and proved their viability after tumoral progression.

**Key words:** -Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase, plasma membrane, tumoral progression.

### RÉSUMÉ

**Objectif :** démontrer, à l'aide de détection histoquímique, l'activité de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase et la viabilité des vésicules de la membrane plasmatique isolées de tissus avec carcinome mammaire.

**Matériel et méthode :** on a fait suivre un processus au tissu tumoral mammaire de quelques-unes des patientes qui ont assisté à consultation dans le service d'oncologie mammaire de l'Hôpital de Gynéco-obstétrique numéro 4 Dr. Luis Castelazo Ayala, IMSS. Une partie du tissu d'adénocarcinome s'est homogénéisé dans quatre volumes de solution TED à 4°C (Tris-HCl 0.001 M, EDTA 0.0015 M et dithiothréitol 0.001 M, pH 7.4) et après on l'a centrifugée. Le précipité obtenu s'est homogénéisé et stratifié dans un gradient discontinu de saccharose (du 20 au 55%), et après on l'a centrifugé pendant 60 minutes à 30,000 g. Afin de démontrer l'activité de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase dans les vésicules de la membrane plasmatique, la suspension obtenue s'est incubé dans un milieu avec Tris-maléate 0.04 M, adénosine triphosphate (ATP) 0.004 M, MgCl 20.004 M, NaCl 0.1 M et Pb (NO<sub>3</sub>) 20.005 M, pH 7.0. La réaction s'est effectuée à 37°C pendant 15

minutes, dans des vésicules préfixées et non fixées dans un mélange de glutaraldéhyde au 3% avec amortisseur de cacodylates 0.1 M, pH 7.4, pendant 60 minutes.

**Résultats :** l'étude d'histochimie a démontré que les vésicules qui se sont obtenues de tissus de sein avec cancer sont d'origine membranaire et qui continuent d'être viables après la progression tumorale.

**Mots-clé :** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, membrane plasmatische, progression tumorale.

## RESUMO

**Antecedentes:** a ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> é um marcador útil para precisar a origem das células de tecidos da mama com câncer.

**Objetivo:** demonstrar, mediante detecção histoquímica, a atividade da ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> e a viabilidade das vesículas da membrana plasmática isoladas de tecidos com carcinoma mamário.

**Material e método:** se processou tecido tumoroso mamário de algumas das pacientes que foram a consulta de oncologia mamária do Hospital de Ginecoobstetricia núm. 4 Dr. Luis Castelazo Ayala, IMSS. Parte do tecido de adenocarcinoma foi homogeneizado em quatro volumes de solução TED a 4°C (Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,0015 M e ditiotreitol 0,001 M, pH 7,4) e depois centrifugou-se. O precipitado que se obteve foi homogeneizado e estratificado num gradiente descontínuo de sacarose (do 20 ao 55%), e depois foi centrifugado durante 60 minutos a 30,000 xg. Com o objetivo de demonstrar a atividade da ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> nas vesículas da membrana plasmática, a suspensão que se obteve, incubou-se num médio com Tris-maleato 0,04 M, adenosintrifosfato (ATP) 0,004 M, MgCl 20,004 M, NaCl 0,1 M y Pb (NO<sub>3</sub>) 20,005 M, pH 7,0. A reação foi realizada a 37°C durante 15 minutos, em vesículas pre-fixadas e não fixadas numa mistura de glutaraldeído ao 3% com amortecedor de cacodilatos 0,1 M, pH 7,4, durante 60 min.

**Resultados:** o estudo de histoquímica demonstrou que as vesículas que foram obtidas de tecidos mamários com câncer são de origem membranal e que continuam sendo viáveis após da progressão tumorosa.

**Palavras chave:** ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, membrana plasmática, progressão tumorosa.

**L**a glándula mamaria contiene células epiteliales y mioepiteliales.<sup>1</sup> Dadas las diferencias estructurales, las células epiteliales se distinguen fácilmente,<sup>2</sup> mientras que las células mioepiteliales se diferencian al mostrar su afinidad por las tinciones argentometrías.<sup>3</sup>

El cáncer de mama y las alteraciones en las células mioepiteliales incluyen cambios en la membrana plasmática y pérdida de microfilamentos.<sup>4</sup> En las células epiteliales estos microfilamentos se encuentran aumentados en el citoplasma y reducen su organización y ensamble de actina;<sup>5</sup> además, se observa pérdida importante en su polaridad.<sup>6</sup>

La ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> es una enzima que normalmente se encuentra en la membrana plasmática de las células mioepiteliales de la glándula mamaria sana, cuya actividad no varía durante el proceso de transformación maligna.<sup>4</sup>

Este estudio se realizó con la finalidad de demostrar, mediante detección histoquímica, la actividad de la ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> y la viabilidad de las vesículas de la membrana plasmática aisladas de los tejidos con carcinoma mamario.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se procesó el tejido tumoral mamario de algunas pacientes que asistieron a consulta al servicio de oncología mamaria del Hospital de Ginecoobstetricia Núm. 4 Dr. Luis Castelazo Ayala, IMSS.<sup>7,8</sup> Parte del tejido de adenocarcinoma se homogeneizó en cuatro volúmenes de solución TED a 4°C (Tris-HCl 0,01 M, EDTA 0,0015 M y ditiotreitol 0,001 M, pH 7,4) y luego se centrifugó.<sup>8,9</sup> El precipitado obtenido se homogeneizó y estratificó en un gradiente discontinuo de sacarosa (del 20 al 55%) y, posteriormente, se centrifugó durante 60 minutos a 30,000 xg. La fracción subcelular de la membrana plasmática (interfase del 25 al 35%) se resuspendió y centrifugó en 10 volúmenes de solución TED fría y 12,000 xg durante

\* Investigadora nacional. Adscrita a la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Ginecología y Obstetricia núm. 4 Luis Castelazo Ayala. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

\*\* Investigador nacional. Adscrito al Centro de Salud (T-H) Dr. Manuel Escontríz. Jurisdicción sanitaria Álvaro Obregón, Servicios de Salud Pública del Distrito Federal, México, DF.

Correspondencia: Dra. Edith Lucía Salazar Esquivel. Coordinación de Investigación Médica. Unidad de Investigación en Enfermedades Endocrinas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Tel./fax: 5588-7521. Apartado postal 86-056, CP 14391, México, DF.

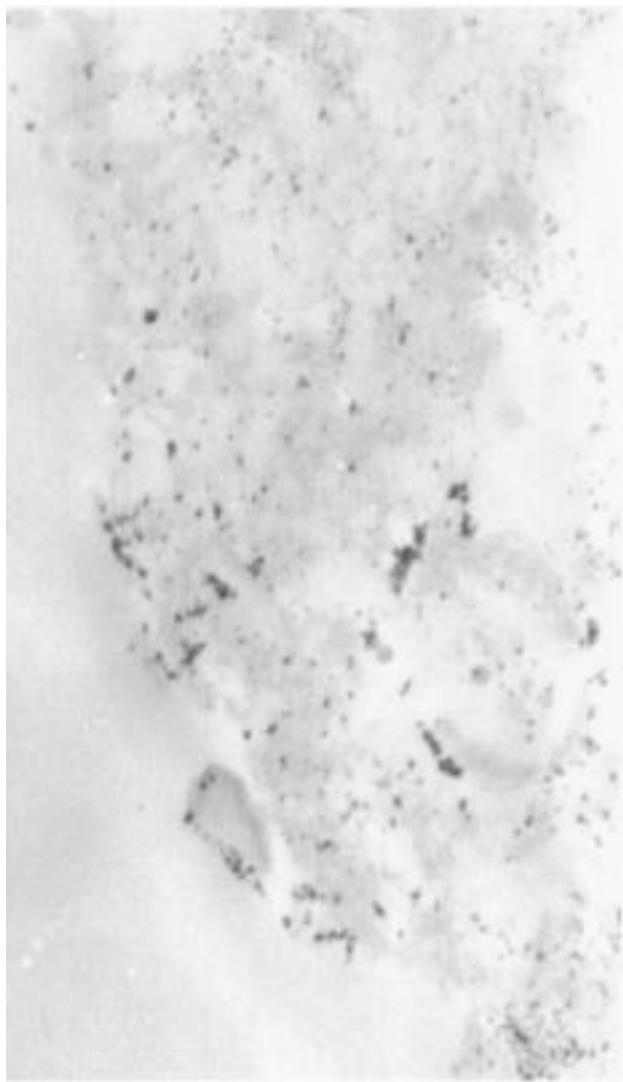
E-mail: edith\_lsالazar@hotmail.com

Recibido: diciembre, 2004. Aceptado: enero, 2005.

La versión completa de este artículo también está disponible en internet: [www.revistasmedicasmexicanas.com.mx](http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx)

15 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de solución TED y se traspasó 50 veces por una aguja del número 27 de una jeringa de 3 mL.<sup>10,11</sup>

Con el fin de determinar la actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+ \text{-K}^+$  en estas vesículas de membrana plasmática, la suspensión obtenida se incubó en un medio con Tris-maleato 0.04 M, adenosintrifosfato (ATP) 0.004 M, MgCl<sub>2</sub> 0.004 M, NaCl 0.1 M y Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.005 M, pH 7.0 u. La reacción se realizó a 37°C durante 15 minutos, en vesículas prefijadas y no fijadas en una mezcla de glutaraldehído al 3% con amortiguador de cacodilatos 0.1 M, pH7.4, durante 60 minutos.<sup>12,13</sup>



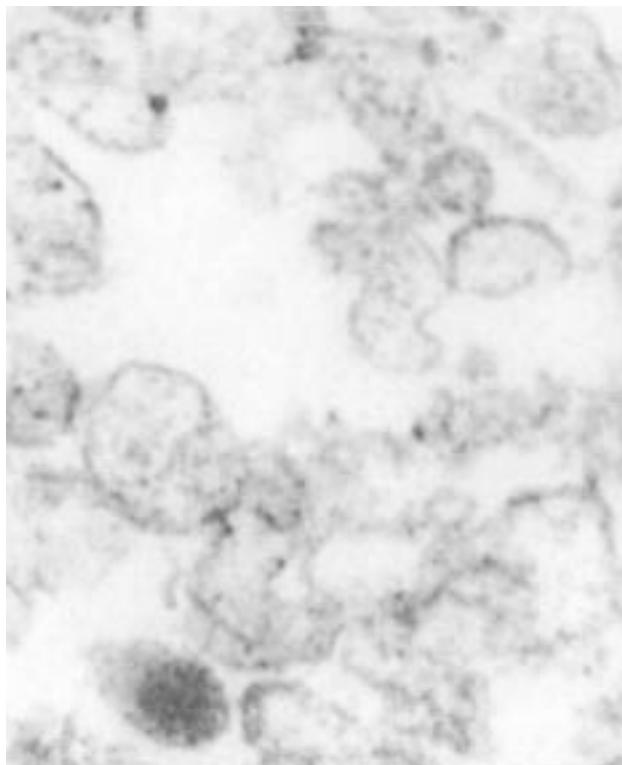
**Figura 1.** Posterior a la reacción, los precipitados de fosfato de plomo se observan de forma y distribución irregular, a lo largo de las vesículas de la membrana plasmática (x 100,000).

Las muestras se deshidrataron a concentraciones ascendentes de etanol y embebidas en araldita. Las fracciones en el rango plateado se colectaron en gradillas de cobre y se observaron con microscopio electrónico.

## RESULTADOS

La actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+ \text{-K}^+$  se localizó en las vesículas de la membrana plasmática de cada adenocarcinoma mamario, cuyo sitio de actividad se distinguió por depósitos electrodensos de fosfato de plomo a lo largo de la superficie de la membrana. Se observaron precipitados de estructuras densas, distribuidas irregularmente, confinados y expuestos en la superficie de la membrana (figura 1).

Cuando las vesículas se preincubaron con ouabaína 2mM no mostraron ninguna actividad enzimática, ya que es una respuesta característica de la ATPasa- $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ <sup>14</sup> bajo este efecto. La misma respuesta se observó



**Figura 2.** No se observa ningún producto de reacción en las vesículas de la membrana plasmática en ausencia de ATP o prefijados en el glutaraldehído (x 100,000).

cuando las vesículas se incubaron con p-cloromercuribenzoato/p-cloroniercuribeuzensulfonato (PCMBS).<sup>7</sup>

Los experimentos se realizaron con muestras prefijadas con glutaraldehído<sup>12,13</sup> o en ausencia de adenosintrifosfato. No se encontraron depósitos de plomo (figura 2).

## DISCUSIÓN

Los estudios histoquímicos realizados en la glándula mamaria sana y con carcinoma de la cepa BALB/C demostraron que la actividad de la ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> se localiza en la membrana plasmática de las células mioepiteliales,<sup>4</sup> mientras que en otras células la actividad de la ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> se encuentra en la membrana vesicular o en la superficie del núcleo.<sup>12-16</sup>

Este estudio no sólo indica el origen celular, también reporta que el material obtenido es de origen plasmático.<sup>4</sup> Dada la actividad de la ATPasa-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>, se confirma la viabilidad de este organelo en el tejido tumoral mamario.

## REFERENCIAS

1. Russo J, Russo IH. Development of the human mammary gland. In: Neville MD, Daniel C, eds. *The mammary gland*. New York: Plenum Publishing, 1987.
2. Russo Wells P. Ultrastructural localizations of adenosine triphosphatase activity in resting mammary gland. *J Histochem Cytochem* 1977;25:160-5.
3. Richardson KC. Contractile tissues in the mammary gland, with special reference to myoepithelium in the goat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1948;136:30- 4.
4. Russo J, Isenberg W, Ireland M, Russo IH. Adenosine triphosphatase as a histochemical marker for the cell of origin in experimental mammary carcinoma. *Cancer Res* 1977;37:1088-92.
5. Karasaki S, Okigaki T. Surface membrane nucleoside triphosphatase activity and tumorigenicity of cultivated liver epithelial cells. *Cancer Res* 1976;36:4491-96.
6. Russo J, Isenberg W, Ireland M, Russo IH. Ultrastructural changes in the mammary epithelial cell population during neoplastic development induced by a chemical carcinogen. *Proc Electron Microsc Soc Am* 1976;34:250-5.
7. Calzada L, Martínez M, Salazar EL. Evaluation of glaucomide receptor assays in human breast cancer tissues. *Med Sci Res* 1993;21:645-8.
8. Calzada L, Salazar EL, Pedrón N. Relationship between the outcome of tamoxifen therapy in ductal and lobular infiltrating breast cancer and estradiol and progesterone receptor values. *Med Sci Res* 1995;23:771-3.
9. Salazar EL, Calzada L, Pedrón N. Infiltrating ductal/lobular carcinoma: an evaluation of prognostic factors in primary breast cancer. *Arch AIDS Res* 1996;10:75-79.
10. Calzada L, Wusterhaus AH, Salazar EL. Binding sites specific to steroid hormones on the plasma membrane of hormone-dependent breast tumors. *Arch AIDS Res* 1995;9:189-93.
11. Marchesi VT, Palade GE. The localization of Mg-Na-K-activated adenosine triphosphatase on red cell ghost membranes. *J Cell Biol* 1967;35:385-9.
12. Sosa A, González-Angulo A, Calzada L, Alva S. Presence of ATPase on the vesicular membrane of *cysticercus cellulosae*. A high resolution cytochemical study. *Experientia* 1978;34:175-8.
13. Sosa A, Calzada L, Alva S, González-Angulo. Distribution of ATPase in isolated human spermatozoa nuclei: a high resolution cytochemical study. *Int J Fertil* 1979;24:125-9.
14. Salazar EL, Calzada L. Contribution of ouabain-sensitive Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> transport to membrane potential on human spermatozoa. *Adv Contr Deliv Syst* 1991;7:261-5.
15. Karasaki S. Subcellular localization on surface adenosine triphosphatase activity in preneoplastic liver parenchyma. *Cancer Res* 1972;32:1703-8.
16. Sosa A, Calzada L, Rosado A. Metabolic capacity of isolated human spermatozoa nuclei. *Gac Med Mex* 1974;108:385-9.