

---

*Na,K-ATPase  $\alpha$  subunit isoforms  
expression in glioblastoma*

*Expresión de isoformas  $\alpha$  de la  
Na,K-ATPasa en glioblastoma*

---



**Universidad**  
de La Laguna



SECCIÓN DE  
**BIOLOGÍA**

FACULTAD  
DE CIENCIAS

*Luisa Ayelen Ramos Navas*

*Tutores: Dr. Pablo Martín Vasallo y Dra. Deborah Rotoli*

*Grado en Biología*

*Julio de 2019*

*A Alba, Raquel, Agoney, Clesay y  
todos esos grandes luchadores.*

## **Agradecimientos**

Al Dr. Pablo Martín Vasallo por darme esta oportunidad y por compartir conmigo sus conocimientos, profesionalidad y entusiasmo por la ciencia.

A la Dra. Deborah Rotoli por su gran dedicación, apoyo y confianza durante el desarrollo de este trabajo.

A la Asociación Española Contra el Cáncer, en especial, a mi coordinadora Salka Buyema por apoyarme siempre en este camino y por hacerme ver la otra cara de la realidad, el trato con los pacientes.

A esos grandes e incansables luchadores por inspirarme y darme la fuerza necesaria para luchar por mi objetivo, poder ayudarles algún día.

A mi familia, por ser mi apoyo incondicional, por acompañarme en cada paso y por enseñarme a levantarme cada vez que tropecé.

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

## Abstract

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive glioma in humans. Its high proliferation rate, aggressiveness, insensitivity to radio and chemotherapy, and invasive capacity give it a fatal prognosis. Ion channels and transporters are considered active participants in the development of GB. Na, K-ATPase is also involved in GB tumour progression. This study analyzes by immunohistochemistry the Na, K-ATPase  $\alpha$  subunit isoforms ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) cellular and subcellular expression patterns in the cell types of GB.

Glioma astrocytes mainly expressed  $\alpha 1$  in the plasma membrane. Tumour stem cells, pericytes and macrophages, expressed different isoforms ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), both, in plasma membrane and cytosol. GB may present different isozymes of Na, K-ATPase, namely  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 3$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 3$ , that provide specific kinetic properties to any kind of cell and, furthermore, contribute to tumor development, growth and progression.

Na,K-ATPase is involved in the development and tumour progression not only by regulating  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  concentrations, but also through the interaction of Na, K-ATPase with protein kinases.

---

**Keywords:** glioblastoma, astrocytes; glioma stem cells; pericytes; isoform; Na,K-ATPase, cardiotonic steroids.

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

## Resumen

El glioblastoma (GB) es el glioma más frecuente y agresivo en humanos. Su alto grado de proliferación, agresividad, insensibilidad a la radio y quimioterapia y capacidad invasiva hacen que su pronóstico sea fatal. En el desarrollo tumoral del GB se considera a los canales iónicos y transportadores como participantes activos.

La Na,K-ATPasa también participa en la progresión tumoral del GB. Este estudio analiza mediante inmunohistoquímica la expresión celular y subcelular de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) de la Na, K-ATPasa en todos los tipos de células del GB.

Los astrocitos tumorales expresan principalmente  $\alpha 1$  en la membrana. Las células madre tumorales, pericitos y macrófagos, expresan diferentes isoformas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma. El GB puede presentar diferentes isoenzimas de Na,K-ATPasa,  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 3$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 3$ , que proporcionan propiedades cinéticas específicas a cualquier tipo de célula y, además, contribuyen al crecimiento y desarrollo del tumor.

La Na,K-ATPasa está involucrada en el origen, desarrollo y progresión tumoral, no solo regulando las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sino también a través de la interacción de Na,K-ATPasa con las proteínas quinasas.

---

**Palabras clave:** glioblastoma; astrocitos tumorales; células madre de glioma; pericitos; Na,K-ATPasa, esteroides cardiotónicos.

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>1</b>
1.1. GLIOBLASTOMA (GB).....	1
1.2. NA,K-ATPASA. ....	2
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS.</b> .....	<b>3</b>
2.1. MUESTRAS. ....	3
2.2. DESPARAFINADO Y REHIDRATACIÓN. ....	3
2.3. REVELADO DEL ANTÍGENO.....	4
2.4. INMUNOFLORESCENCIA CON DOBLE MARCAJE. ....	5
2.5. ANTICUERPOS. ....	5
2.6. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	5
<b>3. OBJETIVO.</b> .....	<b>6</b>
<b>4. RESULTADOS.</b> .....	<b>6</b>
4.1. EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA A1.....	7
4.2. EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA A2.....	11
4.3. EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA A3.....	13
<b>5. DISCUSIÓN.</b> .....	<b>18</b>
<b>6. CONCLUSIONES.</b> .....	<b>24</b>

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Glioblastoma (GB).**

El Glioblastoma es el tumor primario del sistema nervioso central más frecuente y, a pesar del tratamiento, con mayor mortalidad en adultos. Dentro de los gliomas, se encuentran los astrocitomas, cuyo nombre hace referencia a los astrocitos y que se clasifican en diferentes grados según su agresividad, siendo el de grado IV, el astrocitoma más agresivo y común en humanos [1]. El glioblastoma es el grado más alto de tumor de tipo glioma, siendo a su vez, la forma más maligna de astrocitoma.

Desde que lo describiera Rudolf Carl Virchow y hasta 2016, por su pleomorfismo celular, se lo denominó glioblastoma multiforme, en la actualidad glioblastoma [2]. El glioblastoma se clasifica en primario, que es aquel que surge en pacientes de mayor edad tras una historia clínica breve. Este, está caracterizado por una progresión rápida. Por otro lado, el glioblastoma secundario es más frecuente en pacientes jóvenes, los cuales evolucionan a partir de un astrocitoma difuso o anaplásico.

El pronóstico en pacientes con GB es muy poco favorable, solo uno de aproximadamente diez casos consigue superarlo pasado los dos años. Este hecho, se debe a su alto rango de proliferación, su agresividad, insensibilidad a la radio y quimioterapia y capacidad invasiva. La mayoría de los tratamientos no consiguen eliminar todas las células tumorales. La cirugía consiste en la resección de la masa tumoral, sin embargo, suele ser insuficiente debido a la naturaleza difusa de la enfermedad; la quimioterapia, presenta limitaciones por la presencia de la barrera hematoencefálica, ya que, la penetración en células cerebrales es limitada.

El glioblastoma, al igual que muchos otros tumores sólidos, se caracteriza por presentar heterogeneidad, la cual tiene un papel fundamental en el resultado de la malignidad ya que no solo da lugar a la confusión en el diagnóstico, sino también dificulta el tratamiento [1]. Dentro de la heterogeneidad, tenemos la intertumoral, que se debe a una diferencia entre los tumores localizado en un mismo órgano; y la intratumoral, en la que, hay diferencia en las células dentro de un mismo tumor. Además, es clave para la

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

tumorigénesis responsable de la progresión, resistencia, potencial metastásico y recaída del tumor [3].

Existe una organización jerárquica en la que un tumor se genera a partir de células con características de células madre, en nuestro estudio Glioblastoma Stem Cells (GSCs). Estas células mantendrán su población y generarán células hijas más diferenciadas, con propiedades de proliferación limitada, las cuales constituyen la mayor parte del tumor a diferencia de las GSC que solo son una subpoblación [3]. Además, la heterogeneidad también se ve influenciada por el microambiente del tumor y la plasticidad celular [4]. Esto genera un aumento en la tasa de proliferación, capacidad de invasión, angiogénesis, inmunosupresión y metástasis.

El GB también está formado por astrocitos tumorales o células del glioma, células vasculares, como las endoteliales y los pericitos; los telocitos y células inmunes como las células mieloides infiltrantes de glioma (GIM) o macrófagos asociados a tumores (TAM), además de las neuronas restantes [5,6]. Los TAMs, comprenden entre el 30 y el 50% del GB, siendo de gran importancia para el crecimiento de gliomas [5].

Varios estudios señalan la importancia de los canales iónicos, las bombas y los transportadores para mantener el singular crecimiento e invasión a medida que los gliomas invaden el parénquima cerebral, incluida la Na,K-ATPasa [6].

## **1.2. Na,K-ATPasa.**

La Na,K-ATPasa, también conocida como bomba de sodio, es una enzima alojada en la membrana plasmática de todas las células animales [7,8]. Es la encargada de intercambiar tres moléculas de sodio por dos moléculas de potasio contragradiante, con la hidrólisis de una molécula de ATP. Este sistema se encarga de regular la homeostasis celular y de mantener el gradiente electroquímico, mantiene funciones celulares esenciales, como el volumen celular, la producción de calor y la regulación del pH intracelular [7,8]; además, es receptor de glucósidos cardiotónicos, hecho importante, ya que estas moléculas se han propuesto también para el tratamiento de pacientes con GB que no responden a la quimioterapia y cuyos tumores sobreexpresan la isoforma  $\alpha 1$  [6].

---

## *Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

La bomba de sodio es también un transductor de señales y activador de la transcripción, hecho que influye en la proliferación e hipertrofia celular, la adhesión y motilidad celular y la apoptosis [6].

La Na,K-ATPasa, está formada por dos subunidades esenciales, la  $\alpha$ , que es una subunidad transmembrana catalítica de paso múltiple, y la  $\beta$ , que es reguladora, necesaria para biogénesis y actividad del complejo enzimático. Al dímero  $\alpha\beta$  se le puede unir una subunidad opcional  $\gamma$  [7–9]. En vertebrados, la subunidad  $\alpha$  tiene 4 isoformas,  $\alpha 1-4$ , y la  $\beta$  de tres  $\beta 1-3$ . Todas las isoformas se pueden asociar de forma promiscua para crear una bomba funcional [6–8].

De las cuatro isoformas conocidas,  $\alpha 1$  parece estar presente en todas las células y tejidos;  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  se expresan en tejidos eléctricamente excitables.  $\alpha 2$ , se ha encontrado principalmente en el cerebro, el corazón y el músculo esquelético y  $\alpha 3$  es el más restringido en su expresión, encontrándose principalmente en las neuronas y del cerebro, además de en el miocardio humano y primates.  $\alpha 4$  solo se expresa en los testículos [7].

La expresión de las isoformas  $\beta$  en GB ya ha sido estudiada con anterioridad por nuestro y otros laboratorios [6].

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **2.1. Muestras.**

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de La Laguna y por el Comité Ético del Hospital Universitario Nuestra Señora de La Candelaria (HUNSC).

Las muestras de glioma incluidas en parafina para este estudio fueron obtenidas de siete pacientes sometidos a una cirugía inicial, los cuales, no recibieron tratamiento quimioterápico ni radioterápico antes de la misma. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para el diagnóstico e investigación de muestras de tejido.

### **2.2. Desparafinado y rehidratación.**

Realizamos un desparafinado seguido de una rehidratación. Se comienza con tres lavados en xileno de 5 minutos cada uno para eliminar la parafina. Tras el desparafinado,

### *Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

se lleva a cabo la rehidratación mediante lavados de 5 minutos en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%). Finalmente, se realizan dos baños en agua miliQ, de 10 minutos cada uno.

### 2.3. Revelado del antígeno.

Anticuerpo	Diana	Tipo <sup>1</sup>	Clase <sup>2</sup>	Huésped	Dilución	Procedencia
<b><math>\alpha</math>3XVIF9-G10</b>	Na, K-ATPase $\alpha$ 3 subunit isoform	P	M	Mouse	1:5	K. Sweadner
<b>PDGFr<math>\beta</math></b>	Platelet-derived growth factor receptor beta	P	M	Goat	1:50	R&D Systems
<b><math>\alpha</math>2</b>	Na, K-ATPase $\alpha$ 2 subunit isoform	P	M	Rabbit	1:200	A. McDonough
<b><math>\alpha</math>3</b>	Na, K-ATPase $\alpha$ 3 subunit isoform	P	P	Rabbit	1:300	Coplan
<b><math>\alpha</math>1(620)</b>	Na, K-ATPase $\alpha$ 1 subunit isoform	P	P	Rabbit	1:1000	M. Kashgarian
<b>CD31</b>	Cluster of differentiation 31	P	M	Mouse	Ready-to-use	Dako
<b>CD34</b>	Hematopoietic progenitor cell antigen CD34	P	M	Mouse	Ready-to-use	Dako
<b>Iba1</b>	Ionized calcium binding adaptor molecule 1	P	P	Goat	1:500	Abcam
<b>GFAP</b>	Glial Fibrillar Acidic Protein	P	M	Mouse	1:100	Sigma
<b>SOX2</b>	Sex determining Region Y-box 2 -	P	P	Mouse	1:100	R&D Systems
<b>Nestin</b>	Nestin	P	M	Mouse	1:25	R&D Systems
<b>DyLight®650-conj. Anti-mouse</b>	Mouse-IgG	S	P	Goat	1:100	Abcam
<b>FITC-conj. Anti-rabbit</b>	Rabbit-IgG	S	P	Goat	1:200	Sigma-Aldrich
<b>CY3-conj. Anti-goat</b>	Goat-IgG	S	P	Donkey	1:400	Jackson Immunoresearch Laboratories
<b>Observaciones:</b>						
<sup>1</sup> Tipo: <b>P</b> = Primario; y <b>S</b> = Secundario.						
<sup>2</sup> Clase: <b>P</b> = Policlonal; y <b>M</b> = Monoclonal.						

**Tabla 1.** Anticuerpos utilizados

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

Para desenmascarar los sitios antigénicos, las muestras se colocan en una caja de vidrio y se cubren con una solución de tampón citrato pH 6. Además, se colocan en el autoclave durante 10 minutos y posteriormente se enfría durante otros 10 minutos en agua miliQ.

#### **2.4. Inmunofluorescencia con doble marcaje.**

Tras el revelado del antígeno, se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno en TBST (solución 1X Tris tamponada, 0,1% Triton® X-100 SIGMA). Después, se aplica una solución de bloqueo/permeabilización (TBS 1X, Albúmina al 5% del suero bovino SIGMA (BSA) y Triton al 0,3%) durante una hora a temperatura ambiente. Una vez pasada la hora, se vuelve a realizar un lavado en TBST para posteriormente añadir una mezcla de los dos anticuerpos primarios durante la noche a 4°C en agitación.

Al día siguiente, se vuelven a realizar cuatro lavados, durante 15 minutos cada uno. Después, se aplica la mezcla de dos anticuerpos secundarios conjugados a dos fluorocromos diferentes durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad, para lo cual, cubrimos las muestras con papel de aluminio.

Los anticuerpos para IF se diluyen en una solución TBST 1X, BSA al 1% y Triton al 0,1%. Tras añadir los anticuerpos secundarios, las muestras se lavaron cuatro veces, diez minutos cada una. Finalmente, las muestras se montaron con ProLong® Diamond Antifade Mountant con DAPI (Molecular Probes by Life Technologies) para visualizar los núcleos celulares.

#### **2.5. Anticuerpos.**

Los anticuerpos utilizados en este estudio (primarios y secundarios) están especificados en la Tabla 1.

#### **2.6. Microscopía confocal.**

Para la obtención de imágenes, el microscopio confocal empleado fue Leica TCS SP8 con objetivos HC PL APO CS2, de 10-40X.

## *Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

### 3. OBJETIVO.

El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión celular y subcelular de las distintas isoformas de la subunidad  $\alpha$  de la Na,K-ATPasa en GB utilizando técnicas de inmunohistoquímica con inmunofluorescencia en microscopía confocal.

Para distinguir los diversos tipos de células que forman el GB, hemos utilizado marcadores celulares específicos en las inmunolocalizaciones con doble marcaje con anticuerpos específicos contra las distintas subunidades de la Na,K-ATPasa, (Tabla 2).

Anticuerpo	Marcador
Anti-Iba1	Microglia/Macrophages
Anti-GFAP	Astrocytes/Astrocytoma cells
Anti-Nestin	Neural stem cells/Glioblastoma stem cells
Anti-CD31	Endothelial cells/Monocyte-derived macrophages/pericytes
Anti-CD34	Endothelial cells/Macrophages/telocytes
Anti-Sox2	Neural stem cells/Glioblastoma stem cells
Anti-PDGFr $\beta$	Neural stem cells/Glioblastoma stem cells/pericytes

**Tabla 2.** Marcadores utilizados.

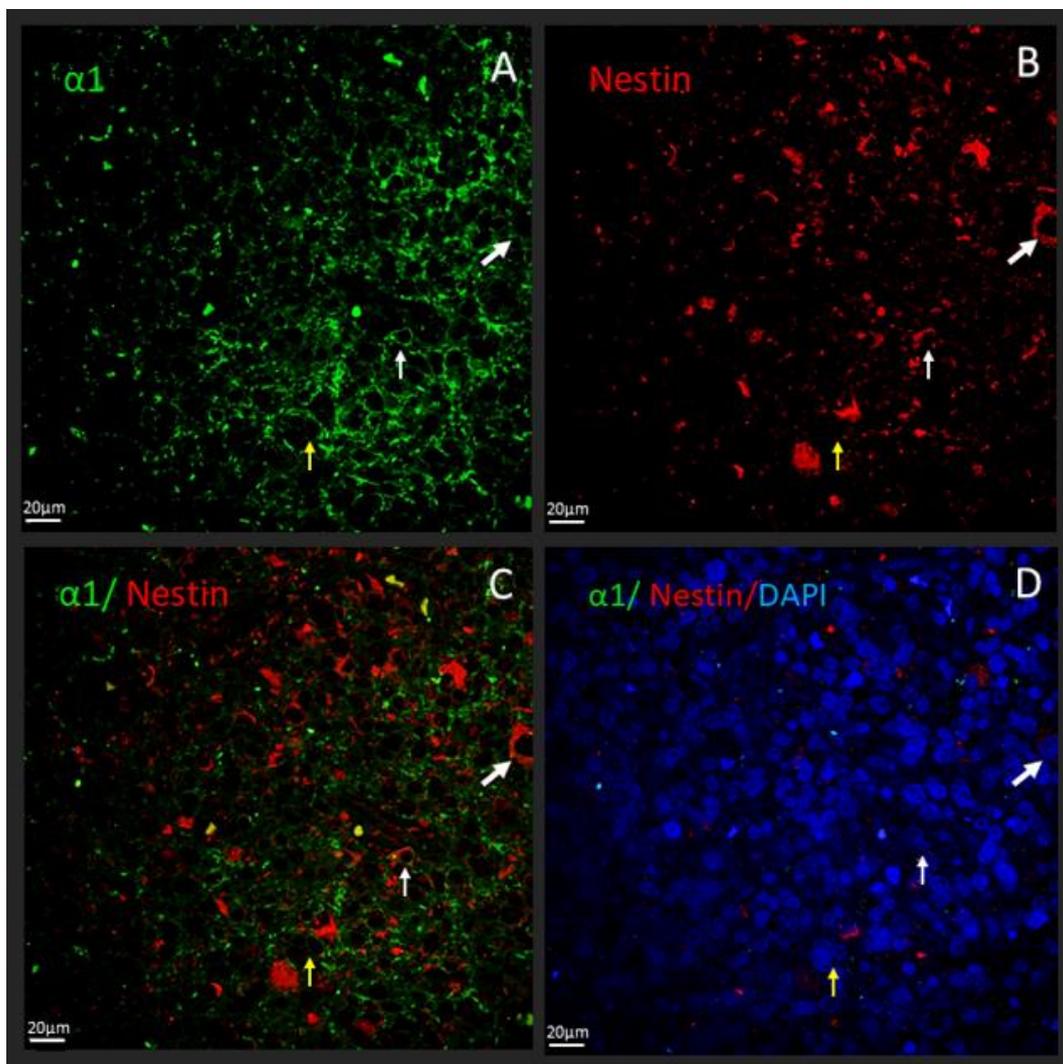
### 4. RESULTADOS.

Las diferentes isoformas de la subunidad  $\alpha$  de la Na,K-ATPasa se localizaron, por lo general, tanto en citoplasma como en membrana plasmática, presentando mayor incidencia en la membrana celular. En ningún caso observamos señal ni en el interior del núcleo ni en la envuelta nuclear. Además, pudimos identificar el tipo celular de las distintas células mediante la utilización de marcadores específicos.

## Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma

### 4.1. Expresión de la isoforma $\alpha 1$ .

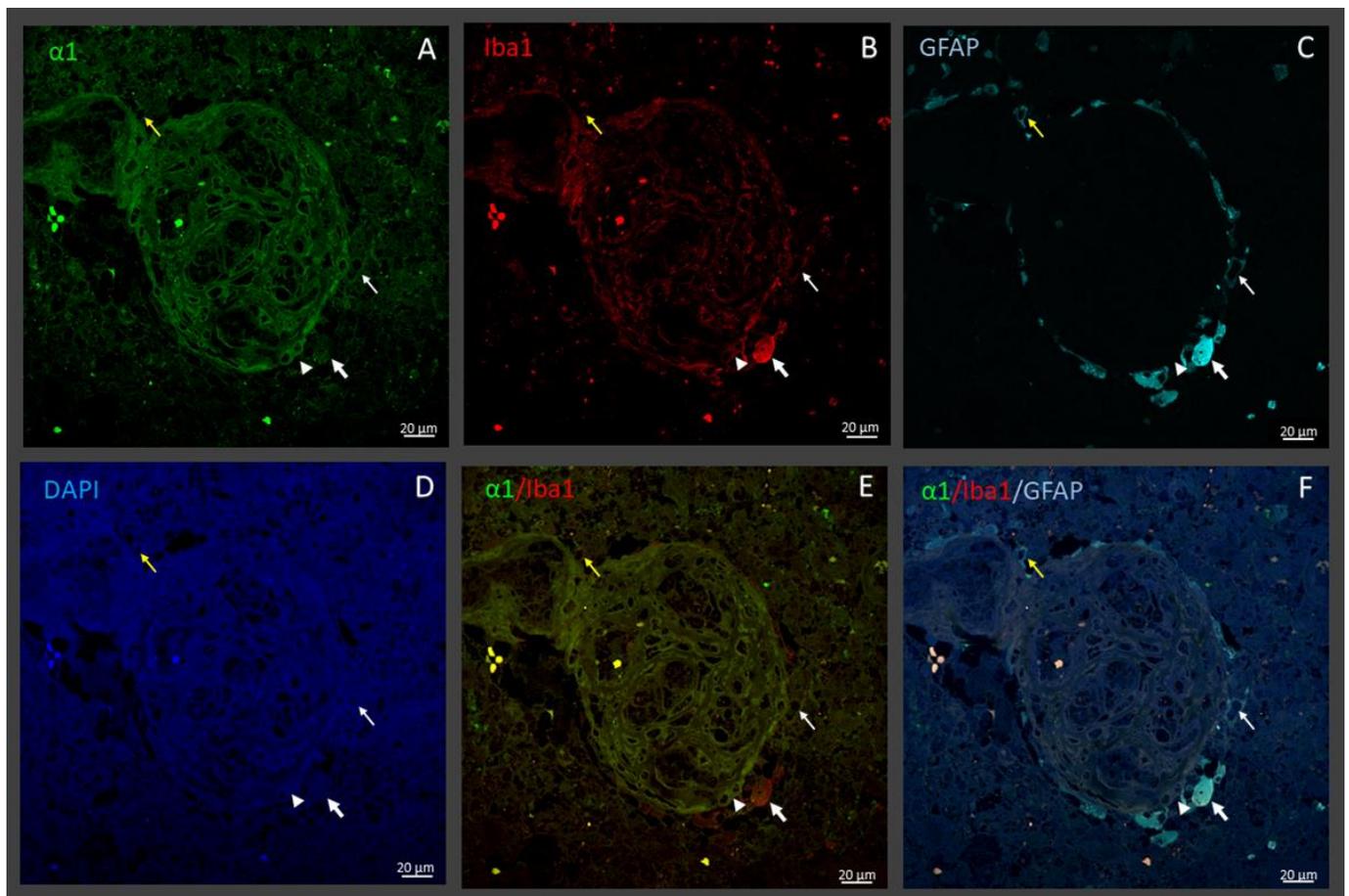
En las muestras de GB, la isoforma  $\alpha 1$  de la Na,K-ATPasa se observó localizada generalmente en la membrana de las células, aunque, ocasionalmente, se observó en el citoplasma y con un patrón punteado (Figuras 2-4). El doble marcaje con nestina (marcador de células madres) y  $\alpha 1$ , nos ha permitido observar células en las cuales se colocan las dos proteínas, indicándonos que esta subunidad de la Na,K-ATPasa se expresa en las células madre (Figura 1, flecha blanca fina).



**Figura 1.** Inmunolocalización fluorescente de doble marcaje de la isoforma  $\alpha 1$  y nestina en GB. La isoforma  $\alpha 1$  de la Na,K-ATPasa se localiza principalmente en la membrana. Flecha blanca fina: célula positiva para  $\alpha 1$  y nestina. Flecha amarilla: agrupación de tres células positivas para  $\alpha 1$ , pero negativas para nestina. Flecha blanca ancha: positiva para nestina, pero negativa para  $\alpha 1$ .

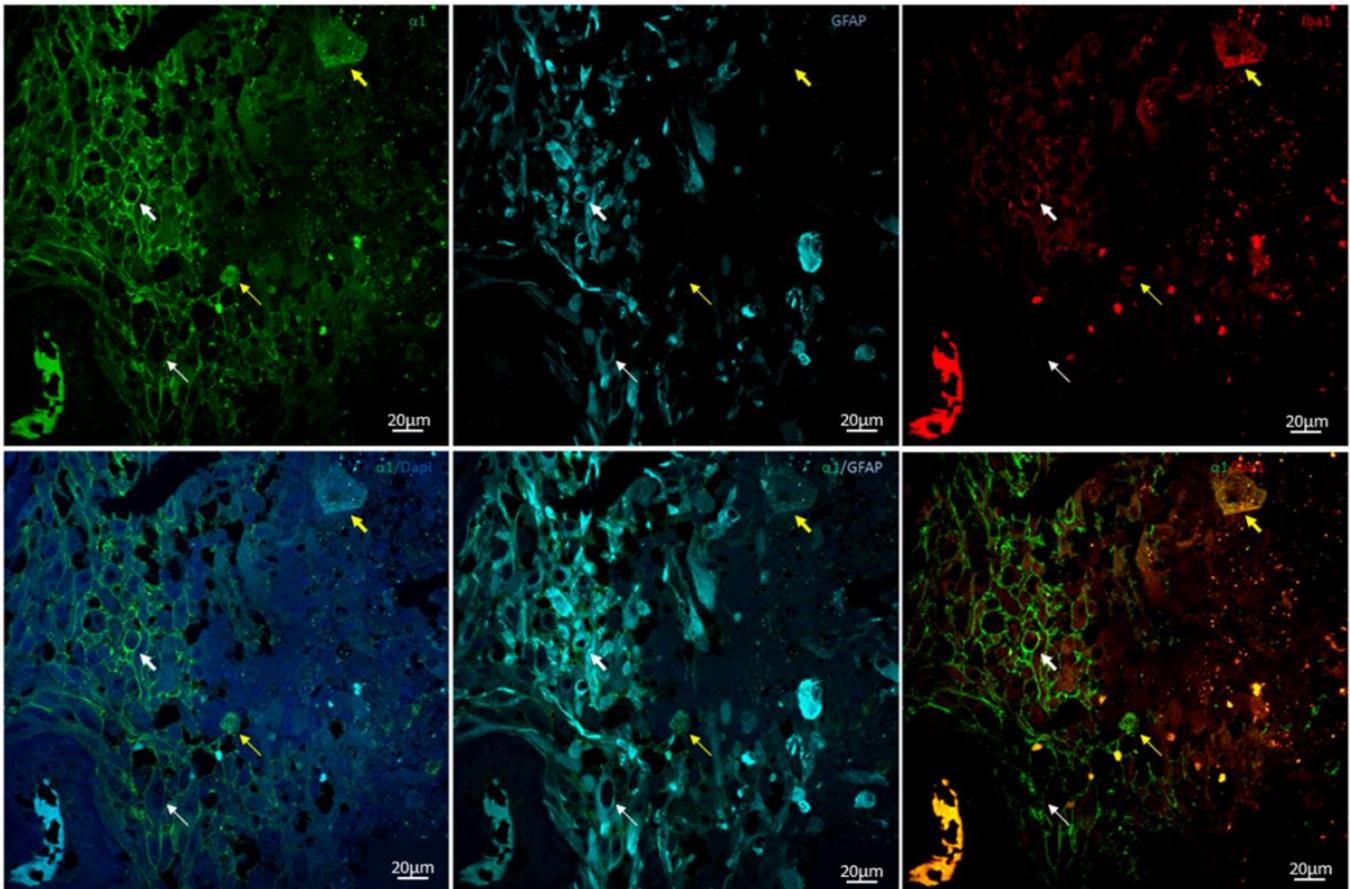
## *Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

En la figura 2 se aprecia un glomérulo, estructura característica de estos tipos de tumores. El triple marcaje con  $\alpha 1$ , Iba1 (marcador de microglia/macrófagos) y GFAP (marcador de células gliales), nos permitió observar células positivas para las tres proteínas con expresión variable (Figura. 2, flechas blancas y flecha amarilla; Figura. 3, flecha blanca ancha), así como células positivas solo para Iba1 y  $\alpha 1$  (Figura. 2, punta de flecha; Figura. 3, flecha amarilla; Figura 4, flecha blanca fina), o positivas solo para GFAP y  $\alpha 1$  (Figura. 3, flecha blanca fina).



**Figura 2.** Inmunolocalización fluorescente de triple marcaje de la isoforma  $\alpha 1$ , Iba1 y GFAP en GB. Flecha blanca fina: dos células GFAP+ Iba1+ que expresan  $\alpha 1$ . Flecha ancha: positiva para  $\alpha 1$ , Iba1 y GFAP. Flecha amarilla: intensa expresión de GFAP y una débil expresión de Iba 1 y  $\alpha 1$ . Punta de flecha: positivas para  $\alpha 1$ , y para Iba1, pero negativas para GFAP.

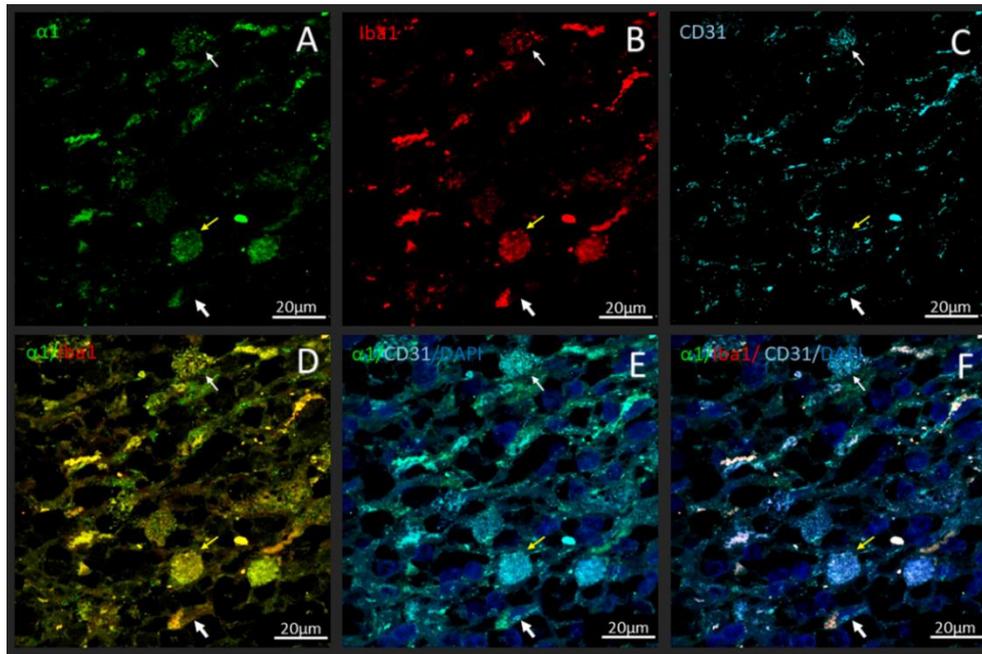
*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*



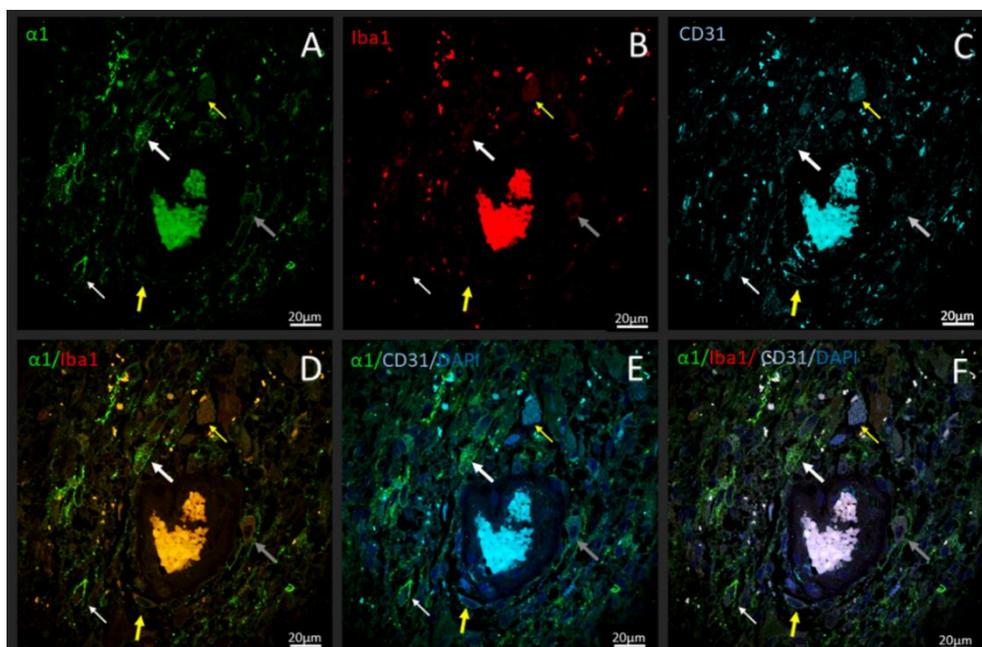
**Figura 3.** Inmunolocalización fluorescente de triple marcaje de la isoforma  $\alpha 1$ , Iba1 y GFAP en GB. Flecha blanca ancha: célula positiva para GFAP, Iba1 y  $\alpha 1$ ;  $\alpha 1$  se localiza en la membrana. Flecha blanca fina: célula positiva para GFAP y  $\alpha 1$ . Flecha amarilla fina: célula con una expresión citoplasmática de Iba1 y  $\alpha 1$ . Flecha amarilla ancha: positiva para Iba1 y  $\alpha 1$ .

El triple marcaje con  $\alpha 1$ , Iba1 y CD31, (marcador de células endoteliales/macrófagos derivados de microglia/pericitos), nos permitió observar células positivas para las tres proteínas, con una expresión variable (Figura 4). En la figura 5 se puede observar una célula positiva para  $\alpha 1$ , que, dada su localización y morfología, y siendo positiva para CD31, es muy probable que sea un pericito (Figura 5, flecha amarilla ancha).

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*



**Figura 4.** Inmunolocalización fluorescente de triple marcaje de la isoforma  $\alpha 1$ , Iba1 y CD31 en GB. La isoforma  $\alpha 1$  de la Na,K-ATPasa se localiza principalmente en el citoplasma, observándose así un punteado en el interior celular. Flecha blanca fina: expresión positiva para  $\alpha 1$ , Iba1 y CD31. Flecha amarilla: intensa expresión de  $\alpha 1$  e Iba1, débil expresión de CD31. Flecha blanca ancha: célula positiva para  $\alpha 1$  Iba1 y CD31.

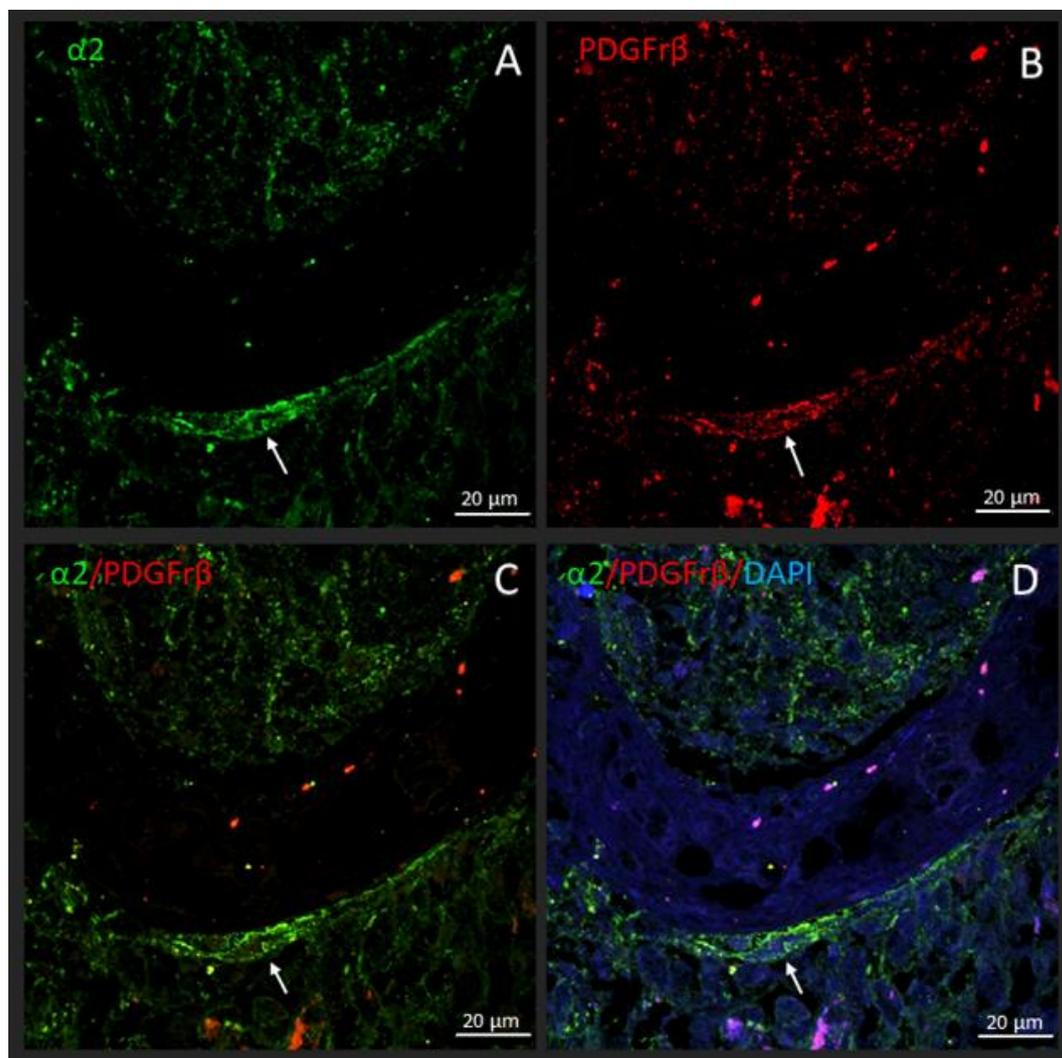


**Figura 5.** Inmunolocalización fluorescente de doble marcaje de la isoforma  $\alpha 1$ , Iba1 y CD31 en GB. Flecha amarilla: célula positiva para Iba1 y CD31, negativa para  $\alpha 1$ . Flecha blanca fina: célula negativa para CD31 e Iba1, con una alta expresión de  $\alpha 1$  en un solo lado de la célula. Flecha amarilla ancha: célula con aspecto alargado alrededor del vaso, positiva para CD31 y que expresa  $\alpha 1$ . Flecha gris: célula positiva para  $\alpha 1$  e Iba1.

## Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma

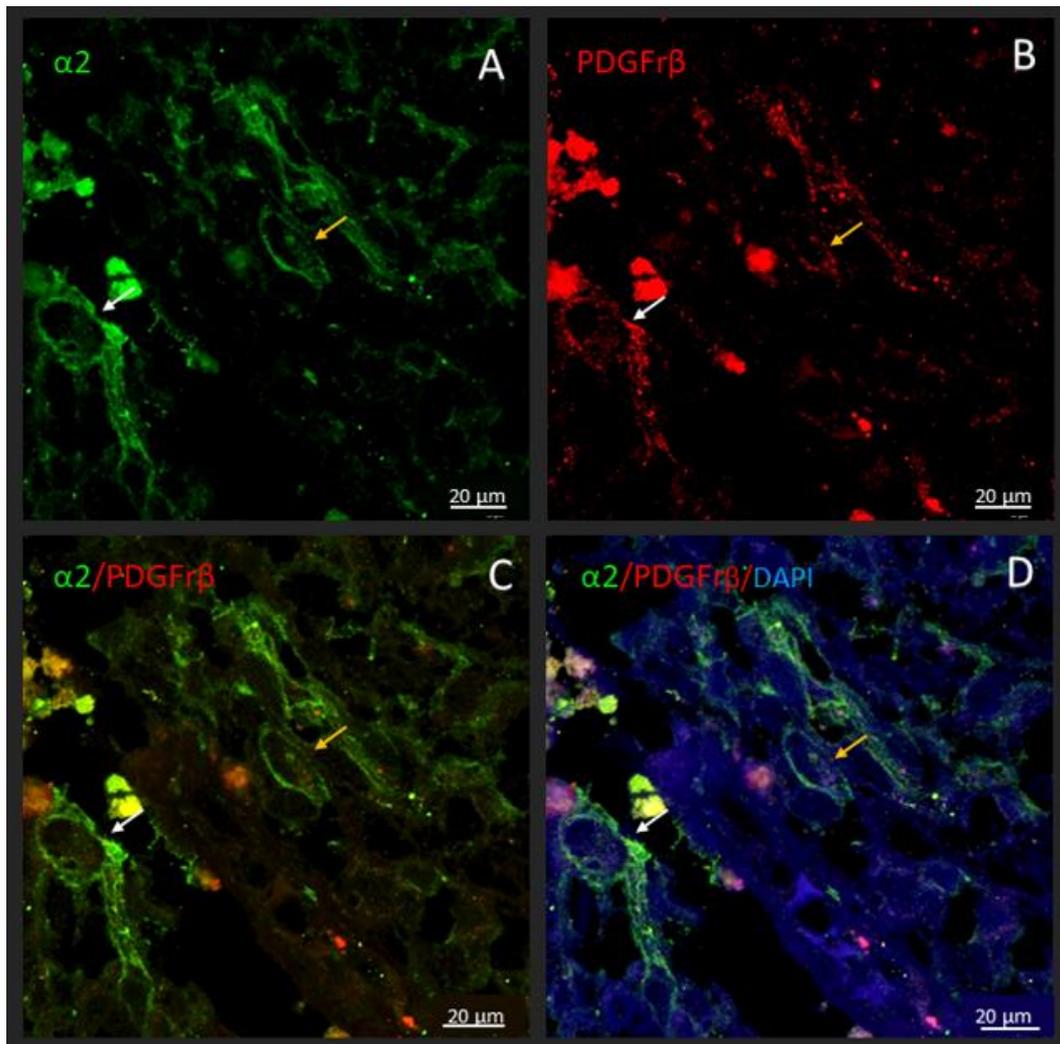
### 4.2. Expresión de la isoforma $\alpha 2$ .

En las muestras de GB, la isoforma  $\alpha 2$  de la Na,K-ATPasa se observó en la membrana celular. El doble marcaje con  $\alpha 2$  y PDGFr $\beta$ , utilizado como marcador de NCSs/GSCs/pericitos, nos ha permitido identificar tales células que expresan la subunidad  $\alpha 2$  y positivas para PDGFr $\beta$ . En la figura 6, la flecha blanca señala una célula positiva para las dos proteínas y que, debido a su localización y morfología, es un pericito. Con respecto a las células PDGFr $\beta^+$ / $\alpha 2^+$  indicadas por las flechas en la figura 7, no se puede decir que tipo de célula son (células madres o pericitos), porque la morfología no es tan clara.



**Figura 6.** Inmunolocalización fluorescente de doble marcaje de la isoforma  $\alpha 2$  y PDGFr $\beta$  en GB. La flecha blanca indica un pericito PDGFr $\beta^+$  en contacto con las células endoteliales de la pared de un vaso sanguíneo, y que expresa  $\alpha 2$ .

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

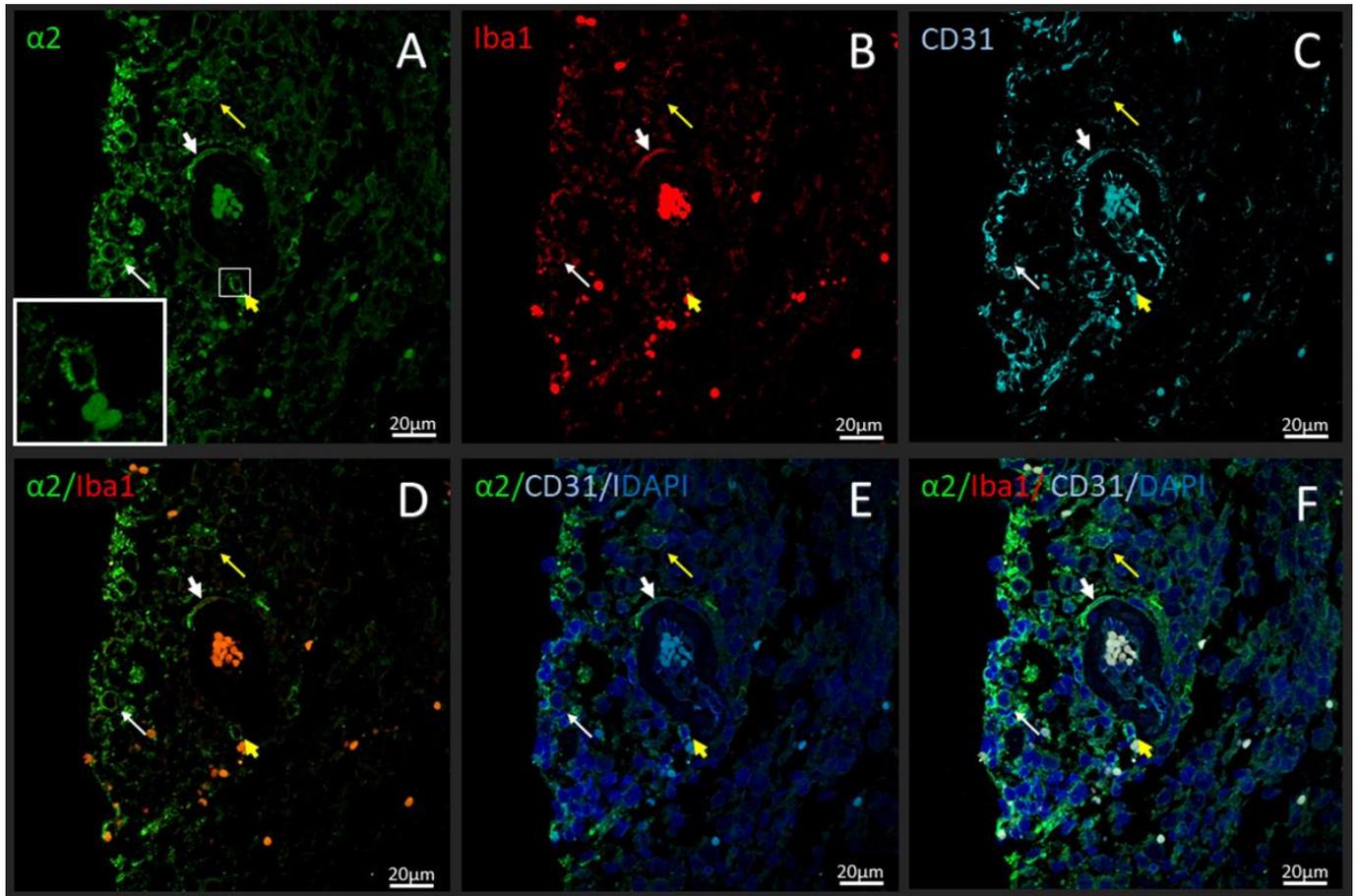


**Figura 7.** Inmunolocalización fluorescente de doble marcaje de la isoforma  $\alpha 2$  y PDGFr $\beta$  en GB.

Para confirmar la expresión de  $\alpha 2$  en pericitos, hemos utilizado CD31, otro marcador comúnmente usado para distinguir pericitos, en experimentos de triple marcaje con  $\alpha 2$  e Iba1. Estos experimentos han evidenciado que la isoforma  $\alpha 2$  se expresa en microglía/macrophagos Iba1<sup>+</sup> (Figura 8, flecha blanca fina), así como en pericitos CD31<sup>+</sup> (Figura 8, flecha blanca ancha). Además, hemos observado la presencia de células  $\alpha 2$ <sup>+</sup> que expresan ambos marcadores (Figura 8, flecha amarilla fina).

La isoforma  $\alpha 2$  se localiza también en los podosomas/invadosomas de las células (Figura 8, flecha amarilla ancha, recuadro).

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

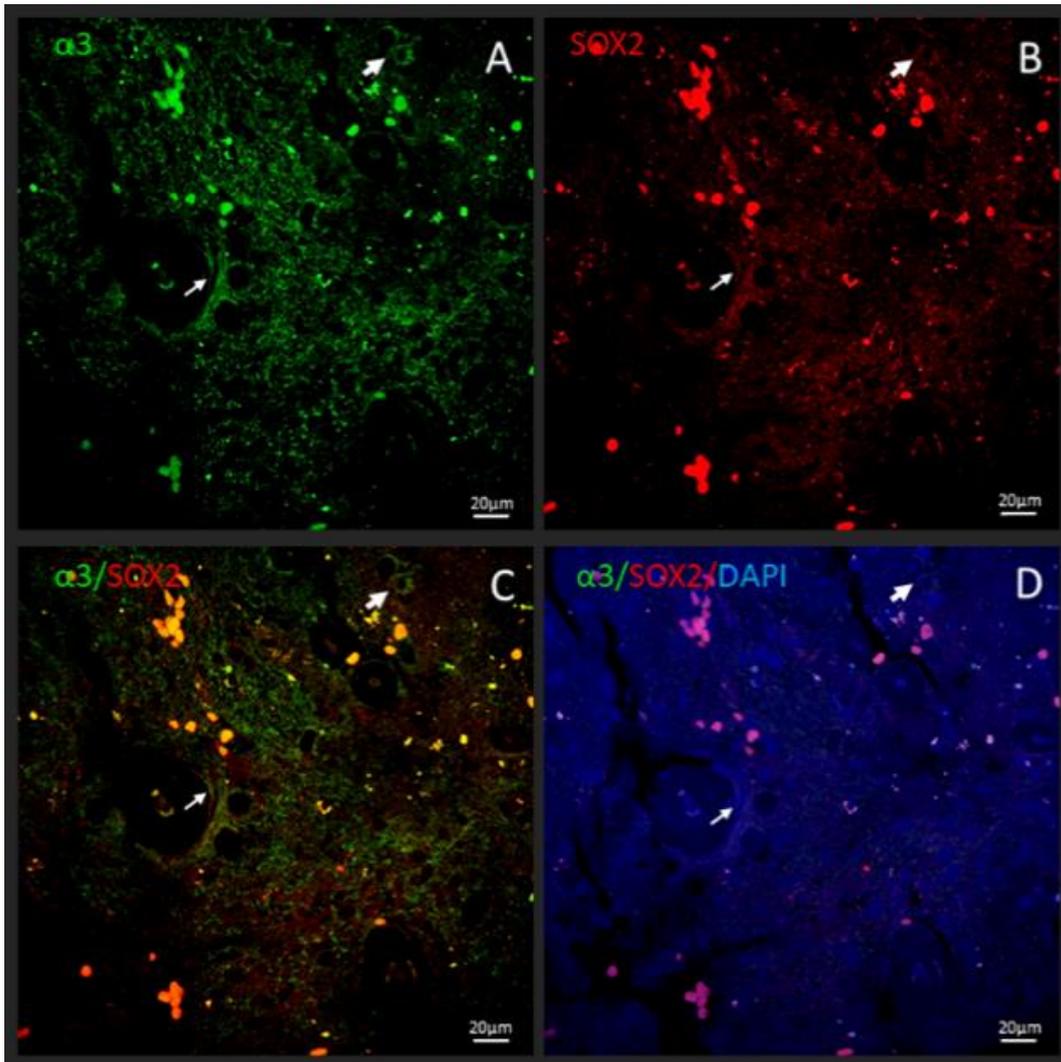


**Figura 8.** Immunolocalización de fluorescencia de triple marcaje de la isoforma  $\alpha 2$ , Iba1 y CD31 en GB. La isoforma  $\alpha 2$  se expresa en microglia/macrófagos Iba1<sup>+</sup> (flecha blanca fina) y en pericitos CD31<sup>+</sup> (flecha blanca ancha). La flecha amarilla fina señala una célula positiva para las 3 proteínas. La flecha amarilla ancha y el recuadro en el panel A, muestran una célula en la que  $\alpha 2$  se localiza en los podosomas/invasomas.

### 4.3. Expresión de la isoforma $\alpha 3$ .

En las muestras de GB, la isoforma  $\alpha 3$  de la Na,K-ATPasa se observó tanto en membrana como en citoplasma. El doble marcaje con SOX2, marcador para NCSs/GSCs, y  $\alpha 3$ , nos permitió observar células positivas para ambos marcadores indicándonos la posibilidad de que se trate de células madre (flechas en figura 9).

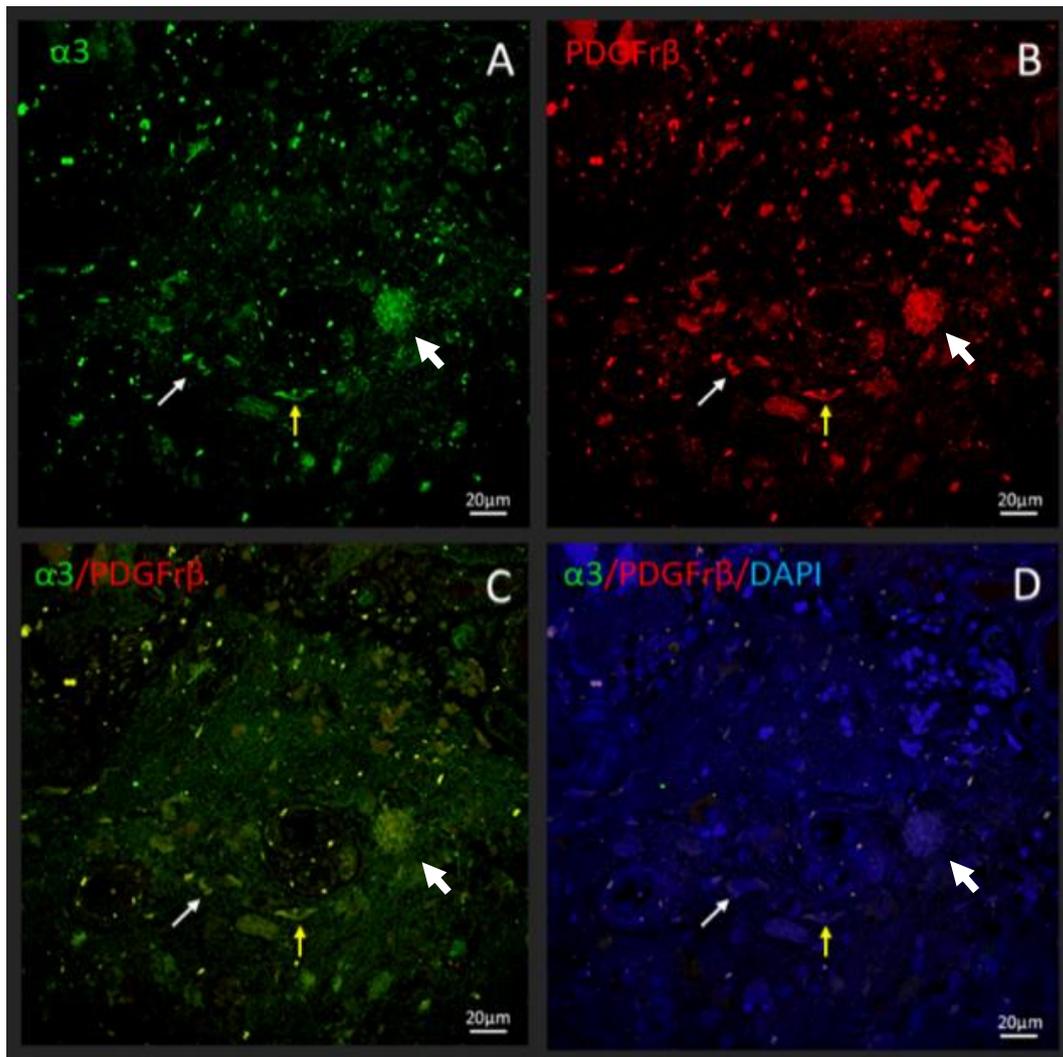
*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*



**Figura 9.** Inmunolocalización fluorescente de doble marcaje de la isoforma  $\alpha 3$  y SOX2 en GB. Se observa  $\alpha 3$  en la membrana de células SOX2<sup>+</sup> (Flechas blancas).

El doble marcaje con PDGFr $\beta$ , como marcador de NCSs/GSCs/pericitos y  $\alpha 3$ , nos ha permitido observar células que expresan las dos proteínas, indicándonos así, la posibilidad de que se trate de células madre (Figura 10 flecha blanca ancha) y/o pericitos (Figura 10, flecha amarilla).

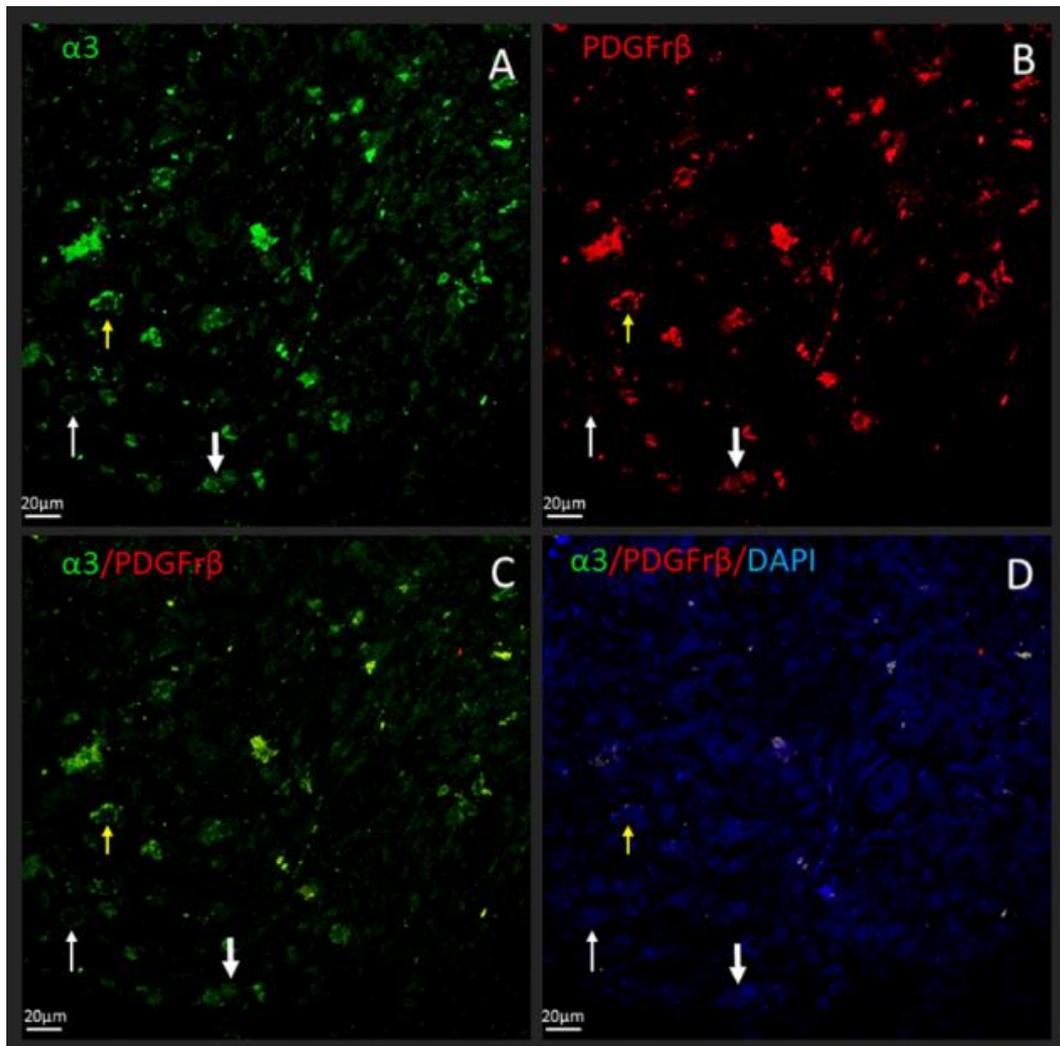
*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*



**Figura 10.** Inmunolocalización fluorescente de doble marcaje de la isoforma  $\alpha 3$  y PDGFR $\beta$  en GB. PDGFR $\beta$  y  $\alpha 3$  se expresan en los pericitos, células muy próximas a un vaso sanguíneo y con morfología alargada (flecha amarilla). A veces la expresión de  $\alpha 3$  y PDGFR $\beta$  no se da de manera uniforme a lo largo de toda la célula si no que se limita a algunas zonas (flecha blanca fina). Además, se observan células que expresan  $\alpha 3$  en el citoplasma (Flecha blanca ancha).

En las células PDGFR $\beta^+$ ,  $\alpha 3$  se puede observar tanto en la membrana de las células (Figura 11, flecha amarilla y blanca fina) como en el citoplasma (Figura 11, flecha blanca ancha).

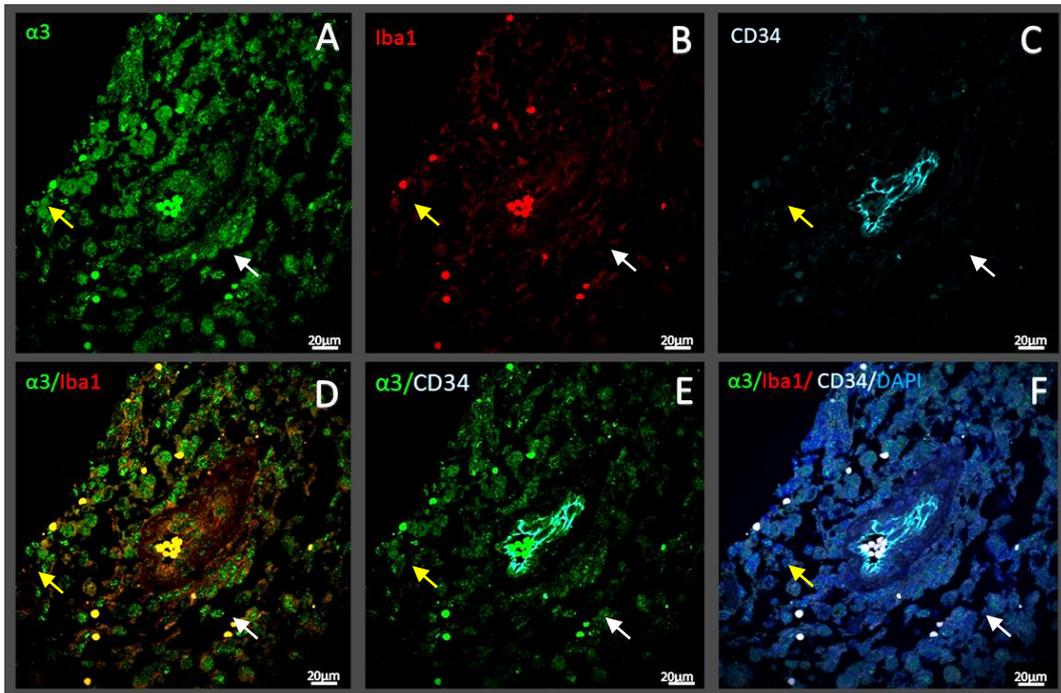
*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*



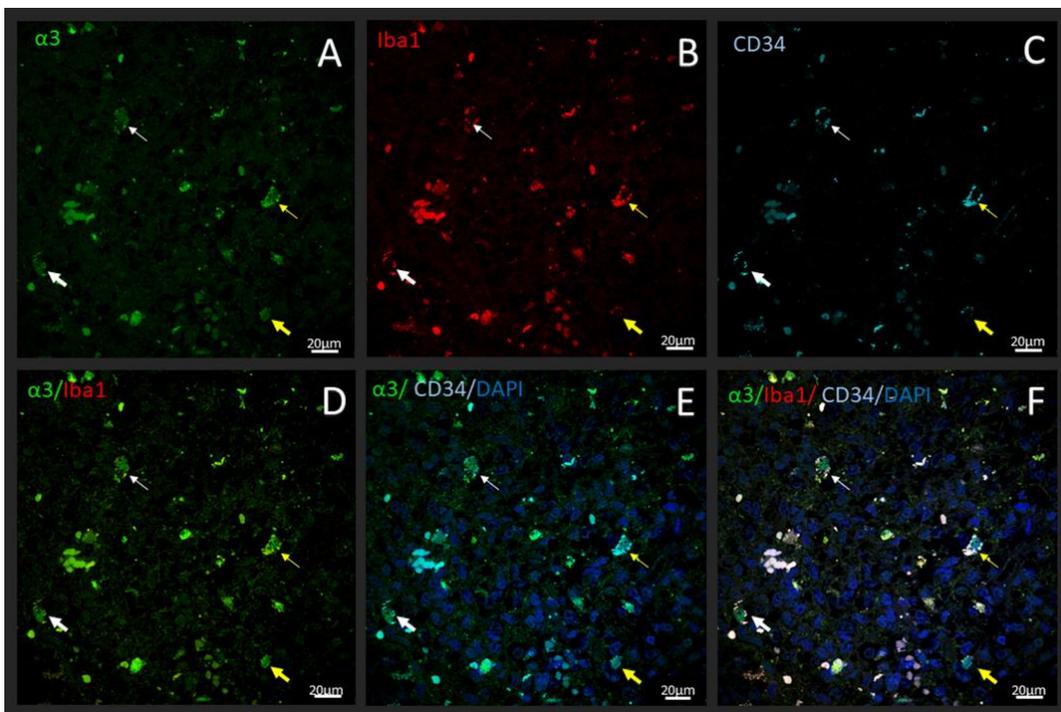
**Figura 11.** Inmunolocalización fluorescente de doble marcaje de la isoforma  $\alpha 3$  y PDGFR $\beta$  en GB. En células PDGFR $\beta^+$ ,  $\alpha 3$  se expresa en el citoplasma (flecha blanca ancha), o en la membrana (flecha amarilla).

En el estudio de  $\alpha 3$ , también se realizó un triple marcaje con  $\alpha 3$ , Iba 1 y CD34, con el fin de profundizar en el tipo celular y analizar la presencia de células endoteliales, macrófagos y telocitos. En la figura 12, se observa una zona en la cual la subunidad  $\alpha 3$  se localiza prevalentemente en el citoplasma, con un patrón punteado. La flecha blanca señala un grupo de macrófagos Iba1 $^+$  cerca de un vaso sanguíneo tumoral, que expresan  $\alpha 3$  en el citoplasma. Localización citoplasmática de la subunidad se observa también en células CD34 $^+$  (Figura 12, flecha amarilla). Las flechas en la figura 13 señalan macrófagos Iba1 $^+$ /CD34 $^+$  que expresan  $\alpha 3$  en la membrana y en el citoplasma.

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*



**Figura 12.** Inmunolocalización fluorescente de triple marcaje de la isoforma  $\alpha 3$ , Iba1 y CD34 en GB. Elevada expresión de  $\alpha 3$ , prevalentemente en el citoplasma y con un patrón punteado. La flecha blanca indica un grupo de células Iba1<sup>+</sup> alrededor de un vaso sanguíneo. La flecha amarilla señala células endoteliales CD34<sup>+</sup>.



**Figura 13.** Inmunolocalización fluorescente de triple marcaje de la isoforma  $\alpha 3$ , Iba1 y CD34 en GB. Las flechas indican células CD34<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup> con una expresión de  $\alpha 3$  en el citoplasma y en la membrana.

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

## 5. DISCUSIÓN.

Actualmente se cree que los canales iónicos y las bombas, como la Na,K-ATPasa, no solo regulan el potencial de membrana, la homeostasis y la señalización eléctrica, sino que también tienen un papel importante en proliferación, migración, apoptosis y diferenciación celular, hecho que los relaciona directamente con la progresión del cáncer. Además, con la participación de transportadores bombas y canales en el crecimiento e invasión, se han empezado a considerar canalopatía del cáncer [10].

La Na,K-ATPasa, es la responsable de mantener un balance eléctrico y osmótico en las células. Una acumulación de  $K^+$  en el espacio cerebral extracelular puede causar la despolarización de neuronas y células de la glía llegando incluso a alterar la señalización neuronal. Este exceso de  $K^+$  extracelular es eliminado por los astrocitos gracias a la bomba de sodio. Sin embargo, una alteración de esos astrocitos, y con ella, una alteración en el funcionamiento de la Na,K-ATPasa producirá un aumento en el tamaño celular acompañado de una mayor invasión [6].

En este estudio analizamos los patrones de expresión de la subunidad  $\alpha$  y sus isoformas en GB. Además, analizamos la expresión conjunta con otros marcadores como Iba1, CD31, PDGFr $\beta$  y SOX2 que permiten identificar el tipo celular.

Para este fin, utilizamos microscopía confocal, obteniendo imágenes de gran calidad omitiendo toda la información óptica fuera de foco, la cual degradaría la imagen, como ocurre en la microscopía convencional. Esta metodología nos ha permitido ver la co-localización de las diferentes proteínas y su patrón de expresión celular y subcelular.

Hemos encontrado que las tres isoformas de la subunidad  $\alpha$  de la Na,K-ATPasa ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) fueron observadas tanto en la membrana celular como en el citoplasma.  $\alpha 1$ , se expresa tanto en membrana como en citoplasma, aunque, se localiza mayoritariamente en la membrana.  $\alpha 3$  se visualizó principalmente en el citoplasma, pero también se encontró en la membrana plasmática, aunque con menor prevalencia. La isoforma  $\alpha 2$  se observó exclusivamente en la membrana plasmática.

### *Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

<b>GB</b>	<b><math>\alpha 1</math></b>	<b><math>\alpha 2</math></b>	<b><math>\alpha 3</math></b>
<b>Células del glioma</b>	+++	-	-
<b>Células endoteliales</b>	++	-	+
<b>Pericitos</b>	+	+++	++
<b>Telocitos</b>	-	-	+
<b>TAMs</b>	++	+++	+++
<b>Células madre</b>	++	++	++
<b>Observaciones:</b> La simbología utilizada es la siguiente: +++ expresión elevada; ++ expresión intermedia; + expresión baja.			

**Tabla 3.** Niveles de expresión de cada isoforma  $\alpha$  de la Na,K-ATPasa en cada tipo de célula del GB.

Estudios anteriores mostraron que  $\alpha 1$  se ha detectado en neuronas y astrocitos, mientras que  $\alpha 2$  se encuentra solo en astrocitos y  $\alpha 3$  en neuronas [9]. La distribución de  $\alpha 1$ , tiene un patrón uniforme en la membrana plasmática, mientras que  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  suelen presentar un patrón reticular paralelo al retículo endoplasmático.

El análisis histológico de GB revela células tumorales altamente anaplásicas y mitóticas incrustadas en un microambiente tumoral compuesto de microglía, monocitos/macrófagos infiltrantes, astrocitos reactivos, células endoteliales, pericitos, células madre neurales/progenitoras y otras células inmunitarias infiltradas [11].

En un individuo sano, la microglía y los macrófagos se encargan de mantener la homeostasis. En el glioblastoma, los macrófagos asociados a tumores (TAM) representan hasta la mitad de las células de la masa tumoral, incluyendo macrófagos y microglía cerebral residente. Estas células tienen como función la vigilancia y erradicación del tumor. Sin embargo, la microglía y los macrófagos, sus subconjuntos pro y antiinflamatorios pueden tener diferentes funciones en la biología del glioblastoma en fases específicas de la evolución del tumor [4,5]. En este estudio hemos observado ese patrón uniforme de  $\alpha 1$  en la membrana plasmática de células madre neurales y células madre del tumor. Del mismo modo que se han observado células madre que expresan  $\alpha 1$  en la membrana, también se apreció en células endoteliales, macrófagos y en pericitos.

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

Sin embargo, aunque  $\alpha 1$  se encontró principalmente en la membrana, algunos astrocitos presentaron un patrón punteado de  $\alpha 1$  en su citoplasma, como signo del turnover membrana plasmática-citosol rápido en este tipo de células, este hecho ha sido frecuentemente ya reportado en la literatura [9]. Ese patrón punteado también se encontró en macrófagos (células CD31<sup>+</sup> e Iba1<sup>+</sup>). Muchos de esos macrófagos presentaron una elevada expresión de  $\alpha 1$  en su citoplasma.

En las estructuras glomerulares, podemos observar un conjunto de astrocitos que expresan  $\alpha 1$  rodeando al mismo, además de macrófagos.

Alrededor de los vasos sanguíneos se observan células similares a los pericitos (CD31<sup>+</sup>), células de morfología alargada, que presentan una elevada expresión de  $\alpha 1$  en la membrana. Estos pericitos son frecuentes en este tipo de tumor, ya que, las GSC dan lugar a ellos para apoyar la función de los vasos y el crecimiento del tumor [12].

La expresión de  $\alpha 2$  se observó principalmente en la membrana plasmática. Se pudo observar gran cantidad de NCSs /GSCs que expresan  $\alpha 2$  en la membrana. También, se encontraron pericitos con una elevada expresión de  $\alpha 2$  en membrana (PDGFr $\beta$ <sup>+</sup> o CD31<sup>+</sup>). Además, al igual que con  $\alpha 1$ , los macrófagos y la microglía expresan  $\alpha 2$  en la membrana (Iba1<sup>+</sup>).

En el progreso tumoral, junto con el crecimiento celular, angiogénesis, invasión y metástasis se produce la formación de invadosomas [6]. Nuestro grupo ya observó estructuras similares a podosomas en la progresión de GB. demostrando que todas las células del GB menos las neuronas, presentan estructuras similares a dichos podosomas incluyendo NCSs /GSCs y TAMs [6]. En este trabajo, observamos expresión de  $\alpha 2$  en esas estructuras similares a los podosomas.

La isoforma  $\alpha 3$  presenta diferentes patrones de expresión, en membrana y en citosol. Pudimos observar NCSs y GSCs que expresan  $\alpha 3$  (SOX<sup>+</sup>). Aunque observamos una célula que dada su condición SOX2<sup>+</sup> debería tratarse de una célula madre, su localización alrededor de un vaso y su morfología alargada nos hace pensar en un pericito. Esto, se podría explicar con estudios que confirman que las GSCs pueden dar lugar a pericitos para apoyar la función de los vasos y el crecimiento del tumor [12]. Otros estudios confirman la transformación fenotípica de los pericitos in vivo, y pericitos derivados del

## *Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

cerebro humano expuestos a condiciones hipóxicas in vitro que cambian su morfología. Estos pericitos pasan a expresar marcadores microgliales demostrando así la capacidad de los mismos para adquirir un fenotipo microglial [12,13].

Por otro lado, observamos pericitos que expresaban  $\alpha 3$  en la membrana, ya que, estos, además de presentar una morfología alargada alrededor de un vaso son PDGFr $\beta^+$ . Otros tipos celulares (PDGFr $\beta^+$ ) que observamos son células madre con elevada expresión de  $\alpha 3$ , tanto en citoplasma como en membrana.

$\alpha 3$  también se expresa en macrófagos y células endoteliales, en vasos sanguíneos de morfología peculiar. Este hecho, es muy típico de estos tumores, ya que, en ocasiones, los tumores desarrollan vasos sanguíneos de diferente morfología, fundamentales para el desarrollo y expansión del tumor. En los alrededores del tumor podemos observar microglía y macrófagos que contribuyen también al desarrollo del GB [4]. Además, también se encontró telocitos, los cuales no son células características del tumor, ya que, también lo encontramos en condiciones normales. Estas células se encargan de diversas funciones como la organización y control de la matriz extracelular, soporte estructural, creación de microambientes, comunicación intercelular, neurotransmisión e inhibición de la apoptosis.

Tipo celular	$\alpha 1\beta 1$	$\alpha 1\beta 2$	$\alpha 1\beta 3$	$\alpha 2\beta 1$	$\alpha 2\beta 2$	$\alpha 2\beta 3$	$\alpha 3\beta 1$	$\alpha 3\beta 2$	$\alpha 3\beta 3$
<b>Astroцитos tumorales</b>	-/+	++	++	-	-	-	-	-	-
<b>Células endoteliales</b>	-/+	++	++	-	-	-	-/+	+	+
<b>Pericitos</b>	+	+	+	++	++	++	++	++	++
<b>Telocitos</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<b>TAMs</b>	++	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Células tumorales</b>	-/+	+	++	+	+	++	-/+	+	++
<b>Observaciones:</b> La simbología utilizada es la siguiente: ++, expresión moderada; + expresión baja, +/- expresión variable de baja a ausente.									

**Tabla 4.** Posibles isoenzimas de la Na,K-ATPasa específicas de cada tipo de célula presentes en GB.

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

La Tabla 3 resume los niveles de expresión de cada isoforma  $\alpha$  de la Na,K-ATPasa en cada tipo de célula del GB. Con datos previos de nuestro laboratorio [6], y los obtenidos en este trabajo, hemos elaborado la tabla 4 con las posibles isoenzimas de la Na,K-ATPasa específicas de cada tipo de célula presentes en GB.

La asociación de los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  para da lugar a múltiples isoenzimas se realiza de forma promiscua dando lugar a las siguientes formas de l Na,K-ATPasa:  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 1$ , y  $\alpha 3\beta 2$ . Estas asociaciones confieren propiedades cinéticas y biológicas significativamente diferentes. Basándonos en un estudio anterior realizado por nuestro laboratorio, en el cual se analizaban las isoformas  $\beta$ , y en este estudio, en GB observamos mayor expresión de  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 3$  y  $\alpha 3\beta 3$ , aunque también encontramos el resto de las isoenzimas ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 1$  y  $\alpha 3\beta 2$ ), mientras que en el cerebro solo se asocia con isoenzimas  $\alpha 1\beta 1$  [11,14]. Este hecho, es debido a la gran inestabilidad genómica y desregulación de la expresión de estos genes en GB.

Las afinidades aparentes para cationes y ouabaína se han determinado expresando enzimas recombinantes en sistemas heterólogos. Las afinidades de las isoenzimas humanas expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* son  $\alpha 1\beta 1 > \alpha 2\beta 1 > \alpha 3\beta 1$  para  $\text{Na}^+$  y  $\alpha 3\beta 1 = \alpha 1\beta 1 > \alpha 1\beta 3 > \alpha 1\beta 2 > \alpha 2\beta 1 > \alpha 3\beta 3 > \alpha 3\beta 2 > \alpha 2\beta 3 > \alpha 2\beta 2$  para  $\text{K}^+$ .

Las células tumorales presentan isoenzimas con una mayor y menor afinidad por  $\text{Na}^+$ . Además, las células en el microambiente circundantes poseen isoenzimas con una afinidad intermedia. Con respecto a la afinidad por el  $\text{K}^+$ , las células tumorales tienen isoenzimas Na,K-ATPasa de elevada afinidad por  $\text{K}^+$  y baja afinidad en células del microambiente [11,14].

A parte del manejo de los cationes, la Na,K-ATPasa tiene la capacidad de unirse a una clase de sustancias químicas llamadas esteroides cardiotónicos (CTS). Muchos estudios bioquímicos han llegado a la conclusión de que la unión de CTS como la ouabaína a la Na,K-ATPasa (ya sea fosforilada o no fosforilada) mantendrá la enzima en una conformación cercana tipo E2. Se sabe que esta acción de ouabaína inhibe la función de bombeo de iones de Na,K-ATPasa [15]. Los CTS juegan un papel importante en la regulación del crecimiento celular además de activar múltiples rutas de crecimiento y

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

estimular la diferenciación/apoptosis o el crecimiento hipertrófico/ proliferativo. Estas funciones de los CTS se relacionan directamente con la progresión tumoral [15].

La interacción de Na,K-ATPasa con las proteínas kinasas, la fosfatasa, los transportadores de membrana y otras proteínas celulares hacen de la Na,K-ATPasa un importante transductor de señales. Por ejemplo, la interacción entre la Na,K-ATPasa y la Src forma un receptor que puede aportar efectos similares a los ligandos de ouabaína sobre la fosforilación de la proteína tirosina y, posteriormente, sobre el crecimiento celular [15]. En principio, los aumentos en la fosforilación de las proteínas sustrato pueden ocurrir mediante la estimulación de tirosina kinasas, y también a través de la inhibición de las tirosinas fosfatasas o ambas [15].

La Na,K-ATPasa no tiene actividad tirosina kinasa intrínseca, pero puede servir como un receptor tirosina kinasa para transducir la unión de ouabaína en incrementos de la fosforilación de la tirosina de proteína a fosforilar [15].

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

## 6. CONCLUSIONES.

- a) Los distintos tipos de células integrantes del glioblastoma presentan un patrón de expresión diferencial de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  de la Na,K-ATPasa.

Así, los astrocitos tumorales expresan predominantemente la isoforma  $\alpha 1$ . Con un menor nivel de expresión, las células endoteliales expresan las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 3$ . Los pericitos expresan las tres isoformas, aunque la más abundante es la  $\alpha 2$ . Los telocitos presentan una ligera expresión solo de la isoforma  $\alpha 3$ . Los macrófagos asociados al tumor (TAM), las células más abundantes en el microambiente del tumor, expresan abundantemente las tres isoformas. Las células madre del glioblastoma (GSC) expresan las tres isoformas a un nivel mediano.

- b) Basándonos en los resultados de este estudio y en resultados anteriores de nuestro grupo, podemos afirmar que: los astrocitos tumorales presentan una expresión moderada de las isoenzimas  $\alpha 1\beta 2$  y  $\alpha 1\beta 3$ , y una expresión variable de  $\alpha 1\beta 1$ .

Las células endoteliales presentan una expresión moderada de las isoenzimas  $\alpha 1\beta 2$  y  $\alpha 1\beta 3$ ; una expresión baja de  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 3$ ; y una expresión variable de  $\alpha 1\beta 1$  y  $\alpha 3\beta 1$ ; las isoenzimas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$  y  $\alpha 2\beta 3$  parecen estar ausentes. Los pericitos presentarían las isoenzimas  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 3$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 3$  con una expresión moderada, y las isoenzimas  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$  y  $\alpha 1\beta 3$  con una baja expresión. En los Telocitos las únicas isoenzimas específicas son  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 3$  con una expresión baja. Todas las isoenzimas de la Na,K-ATPasa están presentes en los TAMs ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 3$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  y  $\alpha 3\beta 3$ ).

- c) Las diferentes isoenzimas formadas presentan diferentes características cinéticas, proporcionando matices para el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por estas células y definiendo sus funciones dentro de la biología del tumor.

Estas isoformas están también implicadas en la transducción de señales. Es necesario realizar estudios más profundos sobre estos temas.

---

*Expresión de isoformas de la Na, K-ATPasa en glioblastoma*

---

**CONCLUSIONS.**

- a) The different types of glioblastoma cells present an expression pattern of the Na, K-ATPase  $\alpha$  subunit isoforms as follows, tumour astrocytes predominantly express the  $\alpha 1$  isoform; with a lower expression level, the endothelial cells express  $\alpha 1$  and  $\alpha 3$  isoforms. Pericytes express the three isoforms, although the most abundant is  $\alpha 2$ . Telocytes present a low expression level of  $\alpha 3$  isoform, only. Tumor-associated macrophages (TAM), the most abundant cells of the tumour microenvironment, express abundantly all three isoforms. The glioblastoma stem cells express all three isoforms at a medium level.
- b) Based on the results of this study and previous results of our group, we conclude that: astrocytes present a moderate expression of the  $\alpha 1\beta 2$  and  $\alpha 1\beta 3$  isoenzymes, and a variable expression of  $\alpha 1\beta 1$ . Endothelial cells show moderate expression of the  $\alpha 1\beta 2$  and  $\alpha 1\beta 3$  isoenzymes; a mild expression of  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 3$ ; and a variable expression of  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$  while the isozymes  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$  and  $\alpha 2\beta 3$  are absent. The pericytes would cast the isozymes  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 3$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 3$  at a moderate expression level, and the isoenzymes  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$  and  $\alpha 1\beta 3$  at a lower level. In telocytes the only specific isoenzymes are  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 3$  with a low expression level. All isoenzymes of Na, K-ATPase are present in the TAMs ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 1\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 2\beta 3$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 2$  and  $\alpha 3\beta 3$ ).
- c) The different isoenzymes formed possess different kinetic characteristics and, consequently, provide different nuances for the transport of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  by any type of cells defining their functions within tumour biology. Likewise, these isoforms are also involved in the transduction of signals. Deeper studies on this topic need to be performed.

## Referencias

- [1] Alves TR, Lima FR, Kahn SA, Lobo D, Dubois LG, Soletti R, Borges H, Neto VM. Glioblastoma cells: a heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. *Life Sci.* **2011**, *89*, 532-539.
- [2] Brown TM, Fee E. Rudolf Carl Virchow: medical scientist, social reformer, role model. *Am. J. Public Health* **2006**, *96*, 2104-2105. [AJPH.2005.078436 \[pii\];10.2105/AJPH.2005.078436 \[doi\]](https://doi.org/10.2105/AJPH.2005.078436).
- [3] Inda MM, Bonavia R, Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers. (Basel)*. **2014**, *6*, 226-239.
- [4] Audia A, Conroy S, Glass R, Bhat KPL. The Impact of the Tumor Microenvironment on the Properties of Glioma Stem-Like Cells. *Front Oncol.* **2017**, *7*, 143. [10.3389/fonc.2017.00143 \[doi\]](https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00143).
- [5] Chen Z, Feng X, Herting CJ, Garcia VA, Nie K, Pong WW, Rasmussen R, Dwivedi B, Seby S, Wolf SA, Gutmann DH, Hambardzumyan D. Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2266-2278. [0008-5472.CAN-16-2310 \[pii\];10.1158/0008-5472.CAN-16-2310 \[doi\]](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2310).
- [6] Rotoli D, Cejas MM, Maeso MD, Perez-Rodriguez ND, Morales M, Avila J, Mobasher A, Martin-Vasallo P. The Na, K-ATPase beta-Subunit Isoforms Expression in Glioblastoma Multiforme: Moonlighting Roles. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*. [ijms18112369 \[pii\];10.3390/ijms18112369 \[doi\]](https://doi.org/10.3390/ijms18112369).
- [7] Acosta E, Avila J, Mobasher A, Martin-Vasallo P. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase genes are down-regulated during adipose stem cell differentiation. *Front Biosci. (Elite. Ed)*. **2011**, *3*:1229-40., 1229-1240.
- [8] Mobasher A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJ, Lamb JF, Martin-Vasallo P. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.* **2000**, *20*, 51-91.
- [9] Larsen BR, Stoica A, MacAulay N. Managing Brain Extracellular K(+) during Neuronal Activity: The Physiological Role of the Na(+)/K(+)-ATPase Subunit Isoforms. *Front Physiol* **2016**, *7*, 141. [10.3389/fphys.2016.00141 \[doi\]](https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00141).
- [10] Litan A, Langhans SA. Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression. *Front Cell Neurosci.* **2015**, *9*, 86. [10.3389/fncel.2015.00086 \[doi\]](https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00086).
- [11] Baker BM, Rotoli D, Morales M, Maeso MC, Garcia MP, Avila J, Mobasher A, Martin-Vasallo P. Na,K-ATPase Isozymes in Colorectal Cancer and Liver Metastases. *Front Physiol*, **2016**, *7*, 9. [10.3389/fphys.2016.00009 \[doi\]](https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00009).
- [12] Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, Fang X, Sloan AE, Mao Y, Lathia JD, Min W, McLendon RE, Rich JN, Bao S. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*, **2013**, *153*, 139-152. [S0092-8674\(13\)00210-9 \[pii\];10.1016/j.cell.2013.02.021 \[doi\]](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.021).
- [13] Ozen I, Deierborg T, Miharada K, Padel T, Englund E, Genove G, Paul G. Brain pericytes acquire a microglial phenotype after stroke. *Acta Neuropathol.* **2014**, *128*, 381-396. [10.1007/s00401-014-1295-x \[doi\]](https://doi.org/10.1007/s00401-014-1295-x).
- [14] Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol*, **1998**, *275*, F633-F650. [10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633 \[doi\]](https://doi.org/10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633).
- [15] Li Z, Xie Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiogenic steroid-activated protein kinase cascades. *Pflugers Arch.* **2009**, *457*, 635-644. [10.1007/s00424-008-0470-0 \[doi\]](https://doi.org/10.1007/s00424-008-0470-0).