



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## La senyalització purinèrgica en l'endometriosi. Paper en el teixit eutòpic i ectòpic

Carla Trapero Candela

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# LA SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA EN L'ENDOMETRIOSI

Paper en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic

TESI  
DOCTORAL

**Carla Trapero Candela**

Dirigida per la Dra. Mireia Martín Satué  
Programa de Biomedicina  
Juny de 2021





UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

*Programa de Doctorat en Biomedicina*

*Cursos 2017-2021*

Tesi doctoral:

# **La senyalització purinèrgica en l'endometriosis**

## **Paper en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic**

**Carla Trapero Candela**

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona

**Dra. Mireia Martín Satué**

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona







UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

*Programa de Doctorat en Biomedicina*

*Cursos 2017-2021*

# **La senyalització purinèrgica en l'endometriosis**

## **Paper en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic**

*Memòria presentada per Carla Trapero Candela per optar al títol de Doctora per la  
Universitat de Barcelona*

**La doctoranda:**

**La directora de la tesi:**

Carla Trapero Candela

Dra. Mireia Martín Satué

Barcelona, Juny de 2021





*Als meus pares, Lluïsa i Joan Carles*

*A la Carmeta*





# ÍNDEX

*"A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child  
confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales"*

Marie Curie





# ÍNDEX

<b>RESUM</b> .....	13
<b>LLISTAT D'ABREVIATURES</b> .....	17
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	23
1. L'ENDOMETRIOSI .....	23
1.1. Generalitats .....	23
1.2. Manifestacions clíniques de l'endometriosis .....	23
1.3. Diagnòstic de la malaltia .....	24
1.4. Tipus de lesions endometriòtiques .....	25
1.5. Classificació de l'endometriosis .....	27
1.6. Fisiologia de l'endometri humà .....	29
1.7. L'etiopatogènia de l'endometriosis .....	30
1.7.1. Teories principals de l'endometriosis .....	31
1.7.2. Factors implicats en el desenvolupament i progressió de la malaltia .....	34
1.8. Els tractaments de l'endometriosis .....	46
1.8.1. Tractaments farmacològics .....	46
1.8.2. Tractaments quirúrgics .....	48
2. LA SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA .....	50
2.1. Receptors de nucleòtids i nucleòsids: receptors P1 i P2 .....	51
2.2. Metabolisme extracel·lular dels nucleòtids i nucleòsids: les ectonucleotidases .....	52
3. LA SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA EN L'ENDOMETRIOSI .....	54
3.1. La senyalització purinèrgica en la resposta inflamatòria .....	54
3.2. La senyalització purinèrgica en el teixit endometrial .....	57
3.3. La senyalització purinèrgica en el dolor associat a l'endometriosis .....	59
3.4. La senyalització purinèrgica en la infertilitat associada a l'endometriosis .....	62
<b>OBJECTIUS</b> .....	67
<b>RESULTATS</b> .....	71
CAPÍTOL 1. Anàlisi de l'ADA, l'ALP, l'NPP1 i l'NPP3 en el fluid contingut en els endometriomes com a biomarcadors candidats per l'endometriosis .....	73
CAPÍTOL 2. Caracterització de les ectonucleotidases en trompes uterines humanes amb un enfocament millorat que identifica simultàniament l'expressió proteica i l'activitat enzimàtica <i>in situ</i> ....	83
CAPÍTOL 3. L'NTPDasa2 en l'endometri humà: nou marcador d'estroma basal i de cèl·lules mare mesenquimals .....	97
CAPÍTOL 4. L'expressió aberrant de les ectonucleotidases en teixit endometrial ectòpic i eutòpic està a favor de l'acumulació d'ATP en el microambient tissular en l'endometriosis .....	117

CAPÍTOL 5. Els cultius cel·lulars primaris d'estroma endometrial com a eina d'estudi del paper de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis .....	145
Introducció .....	147
Objectius .....	148
Materials i mètodes .....	148
Resultats .....	160
Discussió .....	175
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	183
<b>CONCLUSIONS</b> .....	195
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	199
<b>ANNEXOS</b> .....	219
Annex 1. <i>In Situ Identification of Ectoenzymes Involved in the Hydrolysis of Extracellular Nucleotides</i> .....	221
Annex 2. <i>Purinergic Signaling in Endometriosis-Associated Pain</i> .....	237
Annex 3. <i>Characterization of the Endometrial MSC Marker Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) in Low- and High-Grade Endometrial Carcinomas: Loss of Stromal Expression in the Invasive Phenotypes</i> .....	267
<b>AGRAÏMENTS</b> .....	293

# RESUM

*"The art and science of asking questions is the source of all knowledge"*

Thomas Berger



## **RESUM**

L'endometriosis és una malaltia ginecològica, associada a un component inflamatori crònic, caracteritzada per la presència de teixit endometrial fora de l'úter. L'etiologia de la malaltia encara és manté incerta i el seu diagnòstic sovint presenta alts retrassos, degut essencialment a la manca de tests de diagnòstic no invasius. L'adenosina trifosfat (ATP), una molècula proinflamatoria, promou i afavoreix el manteniment de l'estat inflamatori de l'endometriosis. A més, l'ATP influeix directament en les principals manifestacions clíniques de la malaltia: el dolor i la infertilitat. La senyalització purinèrgica, el grup de respostes biològiques a nucleòtids extracel·lulars com l'ATP o nucleòsids com l'adenosina, es troba alterada en moltes malalties amb un important component inflamatori, com és l'endometriosis. Previament, el nostre grup ha demostrat l'expressió de les ectonucleotidases, els enzims que regulen els nivells extracel·lulars d'ATP i adenosina, en l'endometri no patològic, amb canvis dependents d'hormones al llarg del cicle menstrual. Per una altra banda, vam determinar un increment de l'activitat nucleotidasa en el fluid contingut en endometriomes ovàrics, una presentació freqüent d'endometriosis.

La nostra hipòtesi és que la senyalització purinèrgica juga un paper en l'endometriosis i que l'expressió diferencial de les ectonucleotidases pot utilitzar-se com un nou biomarcador de la malaltia. L'objectiu principal d'aquesta tesi és conèixer el paper de la senyalització purinèrgica, en particular de les ectonucleotidases, en l'endometriosis, per tal d'augmentar el coneixement sobre la fisiopatologia d'aquesta malaltia i determinar-ne possibles biomarcadors d'ús diagnòstic i/o terapèutic.

En la present tesi, ens hem centrat en l'estudi de l'expressió de diferents ectoenzims en el fluid contingut en endometriomes mitjançant immunoassajos, i en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis mitjançant immunohistoquímica i assajos d'activitat ectonucleotidasa *in situ*. A més, metodològicament, s'ha optimitzat un protocol per a la detecció simultània de l'expressió proteica i l'activitat nucleotidasa. Altrament, s'ha establert un mètode d'obtenció de cultius primaris d'estroma endometrial de dones amb i sense la patologia i s'ha validat com una eina útil d'estudi de l'endometriosis.

Els resultats obtinguts en l'estudi del contingut dels endometriomes han determinat els ectoenzims nucleòtid pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1 (NPP1) i l'adenosina desaminasa (ADA) com a candidats a biomarcadors per l'endometriosis. D'altra banda, l'assoliment d'una millora metodològica en l'estudi de les ectonucleotidases ens ha permès caracteritzar l'expressió de la nucleòtid trifosfat difosfohidrolasa 2 (NTPDasa2) en el teixit endometrial humà. Hem determinat l'NTPDasa2 com a un nou marcador de cèl·lules mare mesenquimals endometrials (eMSCs) SUSD2<sup>+</sup> i com a marcador de l'estroma basal, troballes importants per la medicina regenerativa. En el teixit endometrial ectòpic de dones amb endometriosis profunda, el subtipus més greu, hem demostrat la pèrdua d'expressió de les ectonucleotidases CD39 i CD73, principal eix d'hidròlisi de l'ATP. Així mateix, s'ha identificat l'NPP3 com a un nou marcador histopatològic de la malaltia, ja que únicament s'expressa en l'estroma endometrial eutòpic i ectòpic de les pacients amb endometriosis.

Així doncs, l'expressió diferencial de les ectonucleotidases pot emprar-se com a biomarcador de la malaltia i presenta la senyalització purinèrgica com una via d'interès pel disseny de noves estratègies diagnòstiques i terapèutiques per l'endometriosis.



# LLISTAT D'ABREVIATURES

*"Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make,  
because they lead little by little to the truth."*

Jules Verne





**LLISTAT D'ABREVIATURES**

	17 $\beta$ -HSD2	17 $\beta$ -hidroxiesteroïde deshidrogenasa tipus 2
	5'-NT	5'-nucleotidasa
<b>A</b>	AC	Adenilat ciclase
	ACOs	Anticonceptius combinats orals
	ADA	Adenosina desaminasa
	ADK	Adenosina quinasa
	ADP	Adenosina difosfat
	AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i> , receptor d'hidrocarbur d'aril
	AINEs	Agents antiinflamatoris no esteroidals
	ALP o AP	<i>Alkaline phosphatase</i> , fosfatasa alcalina
	AMP	Adenosina monofosfat
	AMPK	Adenosina monofosfat quinasa
	ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , anàlisi de variances
	APC	<i>Antigen-presenting cell</i> , cèl·lula presentadora d'antígens
	ARNm	ARN missatger
	ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
	ATP	Adenosina trifosfat
		<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> , factor neurotròfic derivat del cervell
<b>B</b>	BDNF	
	BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina sèrica bovina
		<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> , adenosina monofosfat
<b>C</b>	cAMP	cíclica
	CCiTUB	Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona
	cGAMP	GMP-AMP cíclic
	cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i> , sintetasa de GMP-AMP cíclic
		<i>Calcitonin gene-related peptide</i> , pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina
	CGRP	
		<i>Concentrative nucleoside transporter</i> , transportador
	CNT	concentratiu de nucleòsids
	COX-1	Ciclooxigenasa-1
	COX-2	Ciclooxigenasa-2
	cPLA2	<i>Cytosolic phospholipase A2</i> , fosfolipasa A2 citosòlica
		<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4</i> , proteïna 4 associada als limfòcits T citotòxics
<b>D</b>	CTLA-4	
	DAG	Diacilglicerol
		<i>Damage-associated molecular pattern</i> , patró molecular
	DAMP	associat a dany

	DC	<i>Dendritic cell</i> , cèl·lula dendrítica
	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
	DMSO	Dimetilsulfòxid
	DRG	<i>Dorsal root ganglia</i> , gangli de l'arrel dorsal
<b>E</b>	E2	Estradiol
	EdU	5-etinil-2'-desoxiuridina
	eMSC	<i>Endometrial mesenchymal stem cells</i> , cèl·lules mare mesenquimals endometrials
	ENPP	Ectonucleòtid pirofosfatasa/fosfodiesterasa (família) <i>Equilibrative nucleoside transporter</i> , transportador equilibratiu de nucleòsids
	ENT	de nucleòsids
	ENTPDasa	Ectonucleòsid trifosfat difosfohidrolasa (família)
	ER	<i>Estrogen receptor</i> ; Receptor d'estrògens
	ER $\alpha$	<i>Estrogen receptor alpha</i> , receptor d'estrògens alfa
	ER $\beta$	<i>Estrogen receptor beta</i> , receptor d'estrògens beta
	ESC	<i>Endometrial stromal cells</i> , cèl·lules estromals endometrials <i>Endometrial stromal cells-atrophic state</i> , cèl·lules estromals endometrials- estat atròfic
	ESC-A	endometrials- estat atròfic
	ESC-P	<i>Endometrial stromal cells-proliferative phase</i> , cèl·lules estromals endometrials- fase proliferativa
	ESC-S	<i>Endometrial stromal cells-secretory phase</i> , cèl·lules estromals endometrials- fase secretora
	ESCsi	Endometrial stromal cells from women with endometriosis, cèl·lules estromals endometrials de dones amb endometriosis
<b>F</b>	FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , sèrum fetal boví
	FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i> , hormona estimuladora fol·licular
<b>G</b>	GMP	Guanina monofosfat
	GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i> , hormona alliberadora de la gonadotropina
	GTP	Guanosina trifosfat
	GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i> ; estudis d'associació de tot el genoma
<b>H</b>	HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
	HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
	HUB	Hospital Universitari de Bellvitge
	ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> , molècula d'adhesió intercel·lular 1
<b>I</b>	IL	Interleucina
	INF- $\gamma$	Interferó gamma
	IP3	Inositol-1,4,5-trifosfat

	ISH	<i>In situ</i> hidridation, hibridació in situ	
<b>K</b>	KIR	<i>Killer immunoglobulin-like receptor</i> , receptor tipus immunoglobulina letal	
		<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> , antigen associat a la funció dels limfòcits 1	
<b>L</b>	LFA1		
	LH	<i>Luteinizing hormone</i> , hormona luteïnitzant	
<b>M</b>	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> , proteïnes quinases activades per mitògens	
	MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> , proteïna quimioattractant de monòcits 1	
	MTS	4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoli	
<b>N</b>	ND	No determinat	
	NDPK	Nucleòsid difosfat quinasa	
	NGF	<i>Nerve growth factor</i> , factor de creixement nerviós	
	NGS	<i>Normal goat serum</i> , sèrum normal de cabra	
	NK	<i>Natural killer (cell)</i> , assassina natural (cèl·lula)	
	NK1R	<i>Neurokinin 1 receptor</i> , receptor de la neuroquinina 1	
	NPP	Nucleòtid pirofosfatasa/fosfodiesterasa	
	NTPDasa	Nucleòsid trifosfat difosfohidrolasa	
	<b>P</b>	P	Passe cel·lular
		Panx1	Pannexina-1
PBS		<i>Phosphate buffer saline</i> , tampó de fosfat salí	
PD-1		<i>Programmed death-1</i> , mort programada 1	
PFA		Paraformaldehid	
PGE2		Prostaglandina 2	
PKC		Proteïna quinasa C	
PLAP		<i>Placental alkaline phosphatase</i> , fosfatasa alcalina placentària	
PLC		<i>Phospholipase C</i> , fosfolipasa C	
PSP		<i>Endometriosis Priority Setting Partnership</i>	
PR		<i>Progesterone receptor</i> , receptor de progesterona	
PR-A		<i>Progesterone receptor A</i> , receptor de progesterona A	
PR-B		<i>Progesterone receptor B</i> , receptor de progesterona B	
p-valor		Valor de probabilitat	
RANTES		<i>Regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>	
ROS	Reactive oxygen species, espècies reactives de l'oxigen		
<b>S</b>	sICAM-1	<i>Soluble intercellular Adhesion Molecule 1</i> , molècula d'adhesió intercel·lular 1 soluble	
	SP	Substància P	
	STING	<i>Stimulator of interferon genes</i> , estimulador dels gens interferó	

	SUSD2	<i>Sushi Domain Containing 2</i>
<b>T</b>	TA	Temperatura ambient
	TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
	TCR	<i>T cell receptor</i> , receptor dels limfòcits T <i>Transforming growth factor beta</i> , factor de creixement
	TGF- $\beta$	transformant beta
	Th	<i>T helper (cell)</i> , T col·laborador (limfòcit)
	Th1	<i>T helper 1 (cell)</i> , T col·laborador 1 (limfòcit)
	Th17	<i>T helper 17 (cell)</i> , T col·laborador 17 (limfòcit)
	Th2	<i>T helper 2 (cell)</i> , T col·laborador 2 (limfòcit)
	TLR	<i>Toll-like receptor</i> , receptor de tipus Toll
	TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis alpha</i> , factor de necrosi tumoral alfa
	Treg	T reguladors (limfòcits) <i>Tropomyosin receptor kinase A</i> , receptor de la quinasa A de la
	TrkA	tropomiosina
	TRPV1	<i>Transient receptor potential vanilloid-1</i>
<b>U</b>	UDP	Uridina difosfat
	UTP	Uridina trifosfat
		<i>Vascular endothelial growth factor</i> , factor de creixement
<b>V</b>	VEGF	endotelial vascular

# INTRODUCCIÓ

*"The important thing is not to stop questioning.*

*Curiosity has its own reason for existence. [...]*

*Never lose a holy curiosity."*

Albert Einstein



# **INTRODUCCIÓ**

## **1. L'ENDOMETRIOSI**

### **1.1. Generalitats**

L'endometri és el teixit que revesteix internament l'úter, delimitant-ne la seva llum. De manera fisiològica, l'endometri presenta cicles de creixement i despreniment al llarg de la vida fèrtil de les dones, formant part del que es coneix com a cicle menstrual. La implantació i creixement benigne de teixit endometrial funcional, glàndules i estroma fora de la cavitat uterina, és la característica principal de l'endometriosi, una malaltia ginecològica crònica i complexa, dependent d'estrògens, i amb un important component inflamatori associat.

Les localitzacions ectòpiques freqüents on es detecta aquest teixit endometrial són els ovaris, les trompes uterines, el peritoneu pelvià, el tracte gastrointestinal, la bufeta urinària, el septa rectovaginal i el lligament uterosacre, entre d'altres. Cal mencionar que també s'han observat casos de lesions extrapelviques, tot i que de manera poc freqüent, com en el pericardi, el diafragma, els pulmons i, fins i tot, en el cervell i el cerebel [1-4].

S'estima que l'endometriosi afecta a l'entorn del 10 % de dones en edat reproductiva, però la prevalença exacta es desconeix [5]. Aquest desconeixement s'atribueix a la dificultat d'assolir el seu diagnòstic definitiu, amb retards d'entorn als 8 anys des de l'aparició dels primers símptomes [6]. La dificultat d'aquest diagnòstic està relacionada amb la necessitat de procediments invasius, la manca de biomarcadors d'ús clínic, la clínica inespecífica associada i l'existència de casos asimptomàtics.

### **1.2. Manifestacions clíniques de l'endometriosi**

El dolor i la infertilitat són les causes de consulta mèdica més habituals en les afectades d'endometriosi, que les condueix fins al diagnòstic de la malaltia. Tot i això, cal destacar que la intensitat i la freqüència de la simptomatologia són molt variables, fins el punt de presentar-se pacients asimptomàtics, en les quals sovint la malaltia es descobreix en realitzar cirurgies alienes a la patologia.

Un dels símptomes més comuns en aquesta malaltia és el dolor pelvià, habitualment, cíclic. La ciclicitat del dolor sol associar-se a la susceptibilitat del teixit endometrial ectòpic a les fluctuacions hormonals produïdes durant el cicle menstrual, desencadenant-se el seu despreniment i sagnat com succeeix de manera fisiològica i, en conseqüència, afavorint un estat inflamatori i l'activació de les fibres nervioses que innerven la lesió. Aquest dolor pelvià pot adoptar diferents patrons: dismenorrea (dolor durant el període menstrual), dispareunia (dolor en les relacions sexuals), disúria (dolor en la micció), disquèzia (dolor en la defecació), dolor periovulatori i/o dolor pelvià crònic [7]. D'altra banda, s'han descrit diferents tipus de dolor:

nociceptiu, inflamatori, neuropàtic i, fins i tot, una barreja de tots ells. La presència d'un tipus o un altre de dolor i la intensitat d'aquest no s'ha pogut correlacionar amb l'abast de les lesions endometriòtiques, fet que dificulta la gestió d'aquest símptoma [8].

La infertilitat està freqüentment associada a l'endometriosis. De fet, en dones menors de 35 anys amb endometriosis, la taxa d'infertilitat duplica a la de les dones sense la patologia [9]. Tot i que no s'han definit completament els mecanismes involucrats en aquesta alteració de la fertilitat, s'han descrit diferents modificacions. Per exemple, s'han detectat diferents afectacions anatòmiques que poden perjudicar els gàmetes i el seu transport al llarg de les trompes. També s'ha observat una reducció en la reserva ovàrica associada a l'endometriosis avançada i a les lesions ovàriques. Desregulacions en l'eix hipotàlem-hipòfisi-ovari també tenen implicacions en la infertilitat associada a la malaltia. I finalment, el microambient prooxidant i hostil a causa de la resposta inflamatòria peritoneal també pot afectar la qualitat dels oòcits, la fecundació dels òvuls i la implantació dels embrions [10].

Cal tenir en compte, que el dolor associat a l'endometriosis és el principal factor que interfereix en la qualitat de vida de les dones afectades per la malaltia, impactant negativament en aspectes socials, familiars, sexuals i laborals (revisat en [11]), i per això, combatre'l és l'objectiu principal de les estratègies terapèutiques desenvolupades. A més, la dificultat o impossibilitat de l'embaràs i el dolor crònic s'ha relacionat amb alts nivells d'estrès en les pacients amb endometriosis que les condueixen a estats d'ansietat i/o depressió [12].

### **1.3. Diagnòstic de la malaltia**

Com s'ha comentat, establir el diagnòstic de l'endometriosis en base només a la simptomatologia és difícil, principalment per la presentació variable de la clínica i pels símptomes inespecífics i extraginecològics que se superposen amb altres patologies.

Resulta essencial, doncs, una adequada anamnesi, així com conèixer la història clínica de la pacient per a identificar factors de sospita diagnòstica com possibles antecedents familiars d'endometriosis, una menarquia primerenca o cicles menstruals curts amb períodes menstruals llargs. D'altra banda, l'examen físic de la pacient amb la detecció de possibles signes com són una pelvis dolorosa, l'úter en retroversió, dolor en els lligaments uterosacrals o la palpació de nòduls infiltrants, també són útils a l'hora d'orientar el diagnòstic [13]. Tot i això, per a la confirmació clínica del diagnòstic d'endometriosis, la tècnica de referència emprada és la tècnica quirúrgica de la laparoscòpia, que permet l'observació directa del teixit endometrial en les localitzacions ectòpiques, així com la seva confirmació histològica. Altres tècniques, com són les tècniques d'imatge com l'ecografia, la tomografia computeritzada o la ressonància magnètica, són útils per a la detecció de les lesions, tot i que poden resultar menys específiques, sensibles i acurades que la laparoscòpia. És per això, que normalment aquests mètodes són utilitzats per l'avaluació preoperatòria de les pacients, en lloc d'emprar-les pel diagnòstic definitiu [13]. Cal



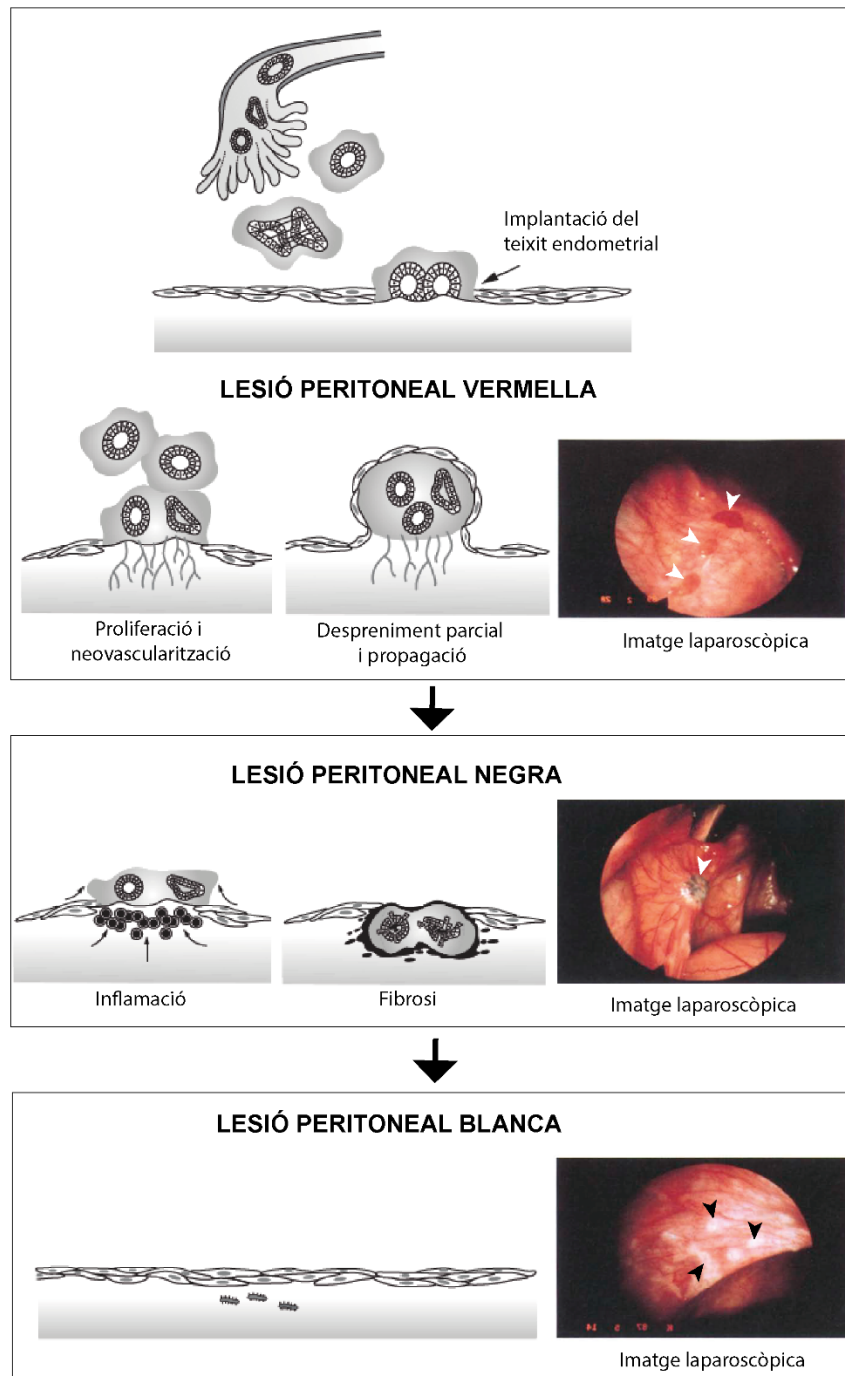
destacar però, que un recent estudi mostra l'evidència científica que l'ecografia transvaginal podria reemplaçar la laparoscòpia pel diagnòstic definitiu de l'endometriosis [14].

A finals del 2018, el Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya va difondre el *Model d'atenció a l'endometriosis a Catalunya* on es reuneix un protocol clínic-assistencial elaborat per un ampli grup multidisciplinari d'experts per aconseguir oferir una millor assistència de les pacients amb endometriosis o sospita d'endometriosis i per intentar reduir el retràs del seu diagnòstic [15]. En el protocol es presenta un algorisme d'actuació on es fa èmfasi a l'exploració física de les pacients amb sospita d'endometriosis, i on ja descriu l'ús de tècniques d'imatge com a prova diagnòstica, reduint la laparoscòpia diagnòstica només en aquells casos on hi ha una clínica indicativa d'endometriosis amb proves d'imatge negatives, amb resposta negativa o irregular a un tractament mèdic farmacològic o en els casos de dubte en el diagnòstic diferencial [15].

#### 1.4. Tipus de lesions endometriòtiques

Existeixen tres formes bàsiques de presentació de l'endometriosis, sovint tractades com a tres entitats diferents: l'endometriosis peritoneal o superficial, l'endometriosis ovàrica i l'endometriosis profunda.

1. L'**endometriosis peritoneal** està caracteritzada per lesions superficials en el peritoneu que reemplacen el mesoteli i que poden presentar un aspecte vermellós, negre o blanc. Les lesions peritoneals vermelles són morfològicament i histològicament molt similars a l'endometri eutòpic, amb una similar capacitat proliferativa i de resposta a les hormones sexuals cícliques, i estan molt ben irrigades. Les similituds amb l'endometri eutòpic suggereixen que són fragments de la menstruació retrògrada, és a dir, restes menstruals que han viatjat a través de les trompes fins la cavitat peritoneal, recentment implantades, i que, per tant, es consideren una forma primerenca d'endometriosis [16]. Les lesions peritoneals negres, en canvi, es consideren un estat més avançat de l'endometriosis. Les lesions vermelles es veuen sotmeses a cicles de despreniment parcial de les seves cèl·lules i de regeneració, similar a l'endometri eutòpic, i en les quals s'acaba produint una reacció fibromuscular (la metaplàsia de les cèl·lules estromals a unes cèl·lules similars al múscul llis), que acaba formant una crosta que envolta l'implant endometrial, amb una reducció en la seva vascularització, atorgant-li a aquestes lesions peritoneals un color negrós [16]. Aquestes lesions negres poden acabar progressant fins a lesions peritoneals blanques, que inclouen grans àrees de fibrosi i cicatrització, convertint-les en lesions inactives o latents [16]. En la **Figura 1** es poden observar els diferents tipus de lesions peritoneals descrits i les seves característiques principals.



**Figura 1.** Representació i característiques dels tres subtipus de lesions peritoneals: les lesions vermelles, negres i blanques, i una imatge representativa de cada tipus, obtinguda mitjançant laparoscòpia, on es pot observar l'aspecte macroscòpic d'aquestes lesions (*puntes de fletxa*). Figura adaptada del llibre *Endometriosis: Science and Practice* [17]. Imatges del Dr. Jacques G. Donnez, Daniel C. Martin i Robert S. Schenken, publicades per l'*American Society for Reproductive Medicine (ASRM)* [18].

2. L'**endometriosis ovàrica** està caracteritzada per la formació de quists en el còrtex ovàric constituïts per teixit endometrial ectòpic coneguts com endometriomes o quists de xocolata, a causa del color del fluid fosc derivat de la sang contingut en el seu interior. Aquestes lesions solen formar adherències amb altres estructures de la cavitat peritoneal [19].

3. I finalment, l'**endometriosi profunda**, la forma considerada més greu de la malaltia. En ella, les lesions formen focus d'endometriosi que infiltren més de 5 mm el peritoneu amb afectació de les estructures subjacents, localitzades habitualment en la zona dels lligaments uterosacrals, el fons del sac de Douglas i el septe rectovaginal, i amb menys freqüència en els urèters, l'intestí i en la bufeta urinària [20]. Aquest tipus de lesions solen presentar un grau de fibrosi superior a la resta i poden causar danys renals i/o obstruccions intestinals greus [21].


Els tres tipus de lesions tenen trets histològics similars, com són la presència de cèl·lules estromals i epitelials endometrials, el sagnat crònic i un important estat inflamatori associat. Els diferents tipus de lesions es poden trobar per separat o en combinació en una mateixa pacient. No s'observa una correlació entre la mida i/o el nombre de lesions amb la gravetat de la simptomatologia [22]. En canvi, la profunditat de la infiltració de les lesions profundes i la seva extensió sí que està relacionada amb el tipus i la gravetat de la malaltia, de forma que l'endometriosi profunda sol ser el tipus més agressiu i que produeix més dolor [23].

## 1.5. Classificació de l'endometriosi

Diferents sistemes de classificació per la gravetat de l'endometriosi s'han proposat en les últimes dècades. L'ús d'aquests sistemes de classificació, però, són molt controvertits ja que tenen una baixa correlació amb els símptomes de la malaltia, no són útils per predir el seu pronòstic, ni tampoc esclareixen l'estratègia terapèutica més adient per tractar el dolor pelvià i la infertilitat en cada cas [24]. Tot i això, el sistema d'estadificació més utilitzat classifica l'endometriosi en mínima (estadi I), lleu (estadi II), moderada (estadi III) o greu (estadi IV) d'acord amb el **model generat per la Societat Americana de Medicina Reproductiva (1997) (ASRM; de l'anglès *American Society for Reproductive Medicine*)**. Aquest recurs es basa en un sistema de puntuació que principalment té en compte el número, la mida i la localització de les lesions (en els ovaris, trompes i peritoneu) i/o d'adherències, sense tenir en compte les diferents localitzacions de l'endometriosi profunda (**Figura 2**) [18]. De manera resumida, l'**endometriosi mínima (estadi I)** són els casos amb implants endometriòtics aïllats i sense adherències; l'**endometriosi lleu (estadi II)** es caracteritza per implants superficials menors de 5 cm sobre la superfície del peritoneu o dels ovaris; l'**endometriosi moderada (estadi III)** presenta varis implants superficials o invasius amb adherències entorn a les trompes o als ovaris; i finalment, l'**endometriosi greu (estadi IV)** on es presenten implants superficials i invasius, a més de grans endometriomes amb la presència d'adherències.

Anys després, es va desenvolupar la **classificació ENZIAN**, que com succeïa amb la de l'ASRM, consistia en un sistema de puntuació basat en l'extensió de l'endometriosi observada durant la cirurgia. Aquesta classificació té com a objectiu complementar la de l'ASRM ja que es focalitza en la localització i extensió de les lesions d'endometriosi profunda, principalment en les estructures retroperitoneals [25]. Un avantatge respecte a la classificació de l'ASRM és que la

puntuació obtinguda sí que correlaciona més amb la presència i intensitat del dolor en les pacients [23]. Tot i això, cal tenir en compte que és un sistema poc estès en la clínica i el seu ús encara està sota estudi.



AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE  
REVISED CLASSIFICATION OF ENDOMETRIOSIS

Patient's Name \_\_\_\_\_ Date \_\_\_\_\_

Stage I (Minimal): 1-5      Laparoscopy \_\_\_\_\_ Laparotomy \_\_\_\_\_ Photography \_\_\_\_\_  
 Stage II (Mild): 6-15      Laparoscopic Treatment \_\_\_\_\_  
 Stage III (Moderate): 16-40      Prognosis \_\_\_\_\_  
 Stage IV (Severe): >40  
 Total: \_\_\_\_\_

ENDOMETRIOSIS		< 1 cm	1-3 cm	>3 cm
		PERITONEUM		
OVARY	Superficial	1	2	4
	Deep	2	4	6
	R Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
L	Superficial	1	2	4
	Deep	4	16	20
POSTERIOR CULDESAC OBLITERATION		Partial 4		Complete 40
ADHESIONS		< 1/3 Enclosure	1/3-2/3 Enclosure	> 2/3 Enclosure
OVARY	R Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4	8	16
TUBES	R Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16
	L Filmy	1	2	4
	Dense	4*	8*	16

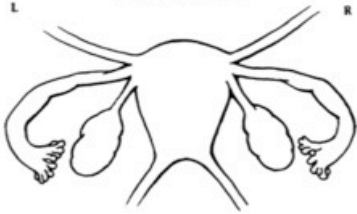
\*If the fimbriated end of the fallopian tube is completely enclosed, change the point assignment to 16.

Additional Endometriosis: \_\_\_\_\_ Associated Pathology: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

To Be Used with Normal  
Tubes and Ovaries



To Be Used with Abnormal  
Tubes and Ovaries




Figura 2. Classificació revisada de l'endometriosis en quatre estadis per l'ASRM. Imatge obtinguda de l'ASRM [18].

Davant el poc valor pronòstic de la classificació de l'ASRM en la fertilitat de les pacients, es va proposar un model complementari: **l'índex de fertilitat d'endometriosis**. En aquest índex es valoren les troballes quirúrgiques, però també altres factors involucrats en l'estat fèrtil de la pacient, com són l'edat, els anys d'infertilitat o els embarassos previs [26]. A diferència dels altres

models, aquest permet millorar l'assessorament de les pacients que presenten la necessitat de realitzar-se tècniques de reproducció assistida.

Tot i l'esforç per aconseguir un model de classificació òptim de l'endometriosis que permeti el millor maneig clínic de les pacients, actualment encara no s'ha aconseguit. És per això, que a la pràctica, el *Ministerio de Sanidad* d'Espanya recomana classificar els casos d'endometriosis en funció de si presenten o no lesions profundes, per poder establir un pronòstic del dolor, la progressió i de la gravetat de la malaltia, ja que el 90 % de les pacients sense implants invasius presenten una simptomatologia menys greu i no requereixen una atenció multidisciplinària [27]

### 1.6. Fisiologia de l'endometri humà

Per determinar els mecanismes i factors involucrats en l'endometriosis, així com per desenvolupar noves estratègies terapèutiques, és essencial conèixer la histofisiologia de l'endometri.

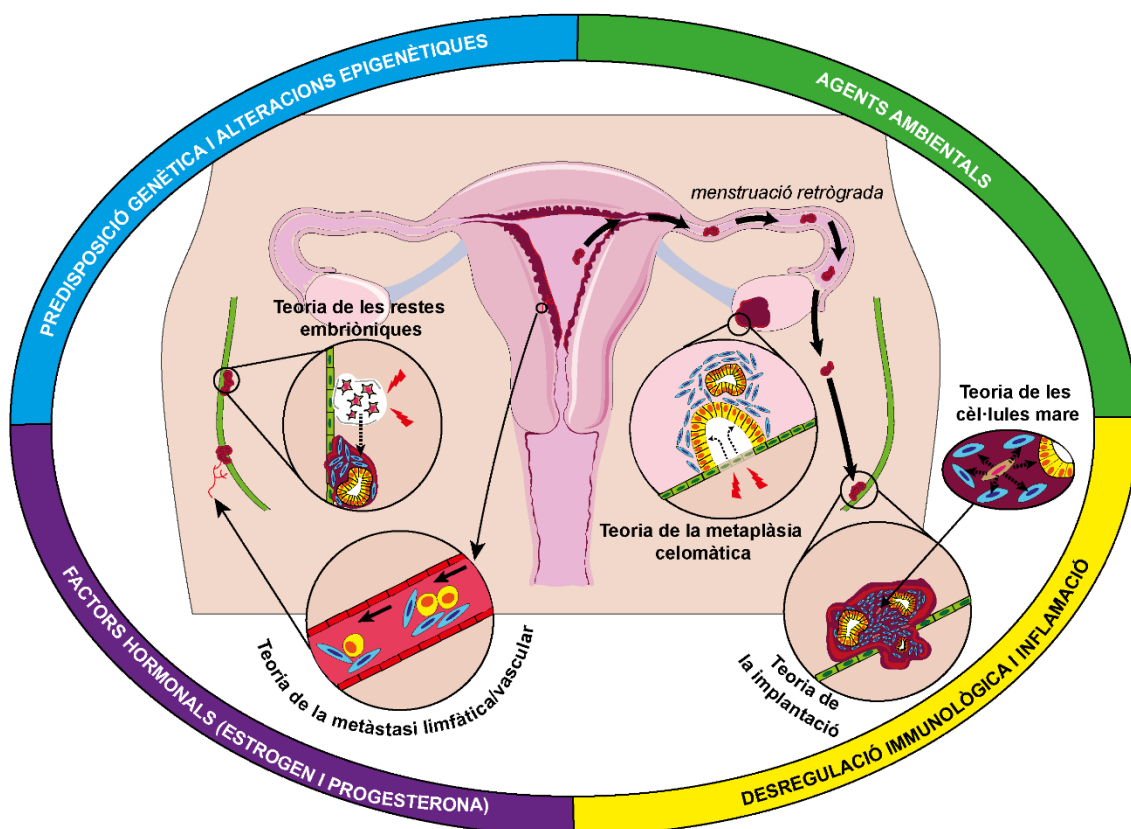
L'endometri humà està constituït per una mucosa endometrial, on hi trobem l'epiteli endometrial i una làmina pròpia coneguda com estroma endometrial. La cavitat uterina està delimitada per l'epiteli de superfície, de tipus cilíndric simple, format per cèl·lules secretores, majoritàriament amb microvellositats, i cèl·lules ciliades. En la làmina pròpia trobem les glàndules tubulars simples, formades per un epiteli similar al de superfície però amb un baix nombre de cèl·lules ciliades, i el teixit connectiu, ric en cèl·lules estromals de tipus fibroblasts [28]. L'endometri es divideix en dues capes: la capa basal i la funcional. La capa basal es troba adjacent al miometri i està formada pel teixit connectiu que constitueix l'estroma i per la porció inicial de les glàndules endometrials; està irrigat principalment per les arteries rectes. En la capa funcional, trobem la resta de l'estroma, la porció més apical de les glàndules, l'epiteli superficial i les arteries espirals.

El teixit endometrial es veu sotmès a l'acció dels estrògens i de la progesterona al llarg del cicle menstrual, en el qual es produeixen canvis en la morfologia de l'endometri, com en la proliferació i diferenciació de les seves cèl·lules. Durant els primers dies del cicle, el teixit endometrial comença a reparar-se i regenerar-se a partir de la capa basal de l'endometri, independentment dels nivells d'estradiol (E2). A continuació, ben entrada en la fase proliferativa del cicle, l'E2 indueix la mitosi de tots els constituents cel·lulars, incloent l'epiteli luminal i glandular, els fibroblasts estromals i els components vasculars. Durant aquesta fase s'aconsegueix l'engruiximent progressiu de l'endometri, un estroma molt cel·lular i les glàndules presenten un aspecte de tubs rectilinis de llum estreta. Després de l'ovulació, amb el predomini de l'acció de la progesterona, s'inicia la fase secretora del cicle menstrual. La progesterona indueix la transformació de les cèl·lules epitelials a un fenotip secretor, amb acumulació de glucogen, i comporta l'ampliació de la llum de les glàndules, que canvien a un aspecte tortuos i amb ramificacions. La progesterona també indueix la diferenciació de les cèl·lules estromals (decidualització), per preparar l'endometri per una possible implantació de l'embrió. En absència d'implantació, els nivells d'estrògen i progesterona disminueixen, es produeix la vasoconstricció

i la coagulació de les arteries espirals i es produeix la necrosi de part de l'endometri, amb el conseqüent desprendiment de la capa funcional en la menstruació. Seguidament, es reinicia novament el cicle menstrual amb la reparació i regeneració del teixit endometrial a partir de la capa basal, gràcies a la presència de cèl·lules mare/progenitores en aquesta localització [29].

### 1.7. L'etiopatogènia de l'endometriosis

L'etiopatogènia de l'endometriosis encara és incerta. Tot i els nombrosos esforços en les últimes dècades orientats en determinar l'etiologia, l'origen de la patologia encara és controvertit i diverses teories, sovint complementaries entre elles, s'han postulat per explicar la seva patogènesi. En aquest apartat es presentaran les principals teories postulades, així com els factors més destacats implicats en el desenvolupament de l'endometriosis que s'han descrit en la literatura, representats en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Representació esquemàtica de les principals teories de l'endometriosis i dels principals factors que afavoreixen la implantació i supervivència de les lesions. En la teoria de les restes embrioniques es postula que les lesions endometriòtiques provenen de romanents müllerians; la teoria de la metàstasi limfàtica o vascular suggereix la migració de cèl·lules endometrials a través de la circulació limfàtica o sanguínia fins a localitzacions distals; la teoria de la metaplàsia celomàtica basa l'origen de les lesions a la metaplàsia de les cèl·lules epitelials que recobreixen els ovaris i la cavitat peritoneal en teixit endometrial; la teoria de la implantació, la més acceptada, atribueix l'origen de les lesions a cèl·lules endometrials viables que viatgen en la menstruació retrògrada fins la cavitat peritoneal, on s'implanten. La teoria de les cèl·lules mare és una expansió de la teoria interior que puntualitza la necessitat de cèl·lules progenitores endometrials en la menstruació retrògrada per originar-se les lesions. Imatge d'elaboració pròpia.

### 1.7.1. Teories principals de l'endometriosis

#### i) Teoria de la implantació: la menstruació retrògrada

La teoria de la implantació o de la menstruació retrògrada del Dr. John A. Sampson és la més acceptada per la comunitat científica per explicar l'origen de les lesions endometriòtiques. Les primeres observacions que van conduir a la teoria de la implantació les va realitzar el Dr. Sampson el 1927 [30], però no va ser fins el 1940 que el mateix autor va desenvolupar aquesta teoria [19]. Cal destacar però, que en el mateix 1927, el Dr. Sampson ja havia presentat una altra teoria basant-se en els seus resultats obtinguts en estudis previs [31]. Aquesta primera teoria la comentarem en el següent punt (ii).

La teoria de la implantació es basa en l'assumpció de tres esdeveniments necessaris per l'inici i progressió de la malaltia: primerament, la presència de cèl·lules viables de la mucosa mülleriana, d'origen uterí o tubàric, que han de viatjar en la sang menstrual a través de les trompes cap a la cavitat peritoneal (fenomen conegut com menstruació retrògrada); en segon lloc, aquestes cèl·lules han d'implantar-se a la superfície peritoneal o de l'ovari, i en alguns casos, poden envair les estructures subjacents; i tercer, aquests implants ectòpics poden establir-se en estructures properes després del seu sagnat, amb el desprendiment de cèl·lules endometrials ectòpiques durant la fase menstrual, convertint-se en focus potencials de propagació de l'endometriosis [19].

Un dels arguments que han afavorit l'acceptació d'aquesta teoria va ser la confirmació de la presència de sang menstrual en el fluid peritoneal durant els períodes perimenstruals [32]. Aquesta menstruació retrògrada, però, es va detectar en el 90 % de les dones estudiades, independentment de presentar o no la malaltia, i per tant s'ha de considerar un fenomen pràcticament universal [32]. En consonància amb aquesta teoria, també es va detectar la presència de cèl·lules epitelials i estromals endometrials en el fluid peritoneal [33], a més es va comprovar que la sang menstrual és una font de cèl·lules endometrials viables i, fins i tot, de cèl·lules mare [34,35]. Així mateix, també es va comprovar la capacitat d'adhesió al peritoneu per part d'aquestes cèl·lules presents en la menstruació [36]. Un altre tret favorable a la teoria de la implantació és la localització habitual de les lesions. El fluid peritoneal circula en sentit horari i es considera el "final" de la seva circulació en la part posterior esquerra de la pelvis. La distribució anatòmica més freqüent de les lesions és en la part esquerra posterior de la pelvis, aportant un altre argument de suport a aquesta teoria [37].

Per una altra banda hi ha dos situacions clares, tot i que poc freqüents, en les que aquesta teoria no podria explicar l'origen i que han provocat el desenvolupament de teories alternatives o complementaries. La primera és la presència de lesions en localitzacions extraperitoneals. Tot i ser de manera excepcional, s'han descrit diferents casos en localitzacions distals que no podrien ser explicats per la teoria de



la implantació [1-3]. La segona situació que posa entre dit aquesta teoria, són les dones que presenten endometriosis sense menstruació, o fins i tot, els pocs casos descrits en homes [38,39].

**ii) Teoria de la metàstasi limfàtica o vascular**

En el 1927, el Dr. Sampson ja havia publicat la teoria de la metàstasi limfàtica o vascular [31]. En base a les seves observacions, suggeria que durant la menstruació, on es produeix la ruptura del teixit endometrial però també de vasos, trossos de teixit endometrial podien disseminar-se a través dels capil·lars venosos o per la circulació limfàtica, permetent la seva presència en localitzacions distals, amb similituds amb els processos metastàtics de les cèl·lules tumorals. Més enllà de les troballes de teixit endometrial en la vasculatura uterina de Sampson [31], diversos estudis han confirmat la presència de teixit endometrial en els vasos i ganglis limfàtics en algunes dones [40,41].

Aquest mecanisme podria explicar els casos distals d'endometriosis, els quals no s'explicaven per la teoria de la implantació. Tot i això, la baixa incidència de casos amb lesions extrapelviques fa pensar que aquest no és el mecanisme principal en la patogènesi de l'endometriosis.

**iii) Teoria de la metaplàsia celomàtica**

La teoria de la metaplàsia celomàtica atribueix l'origen de l'endometriosis a la transformació per metaplàsia de les cèl·lules que recobreixen el peritoneu fins a un teixit de tipus endometrial sota la influència d'un estímul indeterminat, com podrien ser les hormones sexuals, les molècules secretades durant processos inflamatoris o les restes de cèl·lules endometrials [42].

Embriològicament, el peritoneu toràcic, abdominal i pelvià i els conductes de Müller (que formen el tracte reproductor femení) es desenvolupen a partir d'un mateix llinatge: l'epiteli celomàtic. Un requisit per aquesta teoria és que el mesoteli que recobreix el peritoneu, incloent els ovaris, contingui cèl·lules del llinatge celomàtic amb la capacitat de diferenciar-se en cèl·lules endometrials.

Aquesta teoria podria explicar els casos on les lesions endometriòmiques són presents en localitzacions distals amb mesoteli [1], en noies en l'etapa prepuberal [43], en dones amb absència congènita d'estructures müllerianes [44], o fins i tot, en els pocs casos detectats en homes [38,39].

Aquesta teoria sovint s'ha relacionat amb l'origen de l'endometriosis ovàrica. De fet, les dones amb el síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser, caracteritzat per la falta d'estructures müllerianes, incloent l'úter, amb coexistència d'endometriosis, les lesions que solen presentar són endometriomes ovàrics [42]. El cocultiu de l'epiteli de superfície de l'ovari amb cèl·lules estromals endometrials, sota la presència d'estrogen, va provocar canvis en les cèl·lules superficials de l'ovari,



adoptant una estructura similar al lumen endometrial, amb la presència de cèl·lules glandulars i cèl·lules ciliades [45], posant de manifest la possible capacitat metaplàstica d'aquestes cèl·lules.

Tot i això, encara hi ha molta incertesa entorn aquesta teoria i hi ha molts punts de discussió en contra. Per exemple, si la metaplàsia fos l'origen de l'endometriosi, s'esperaria observar un clar increment dels casos d'endometriosi amb l'edat, com succeeix amb la metaplàsia comuna. A més, també s'esperaria una major freqüència de casos en la cavitat toràcica, així com en els homes. És per això que se segueix considerant la teoria de la implantació com el principal mecanisme de desenvolupament de la malaltia.

**iv) Teoria de les restes embrioniques (romanents müllerians)**

La teoria de les restes embrioniques proposa que la presència de restes dels conductes müllerians al llarg de la cavitat peritoneal, per diferenciació o migració aberrant durant l'organogènesi fetal, poden induir la formació de teixit endometrial sota un estímul apropiat en adults [46].

Aquesta teoria podria explicar la presència d'endometriosi en les localitzacions per on es produeix la migració del sistema müllerian embrionari, com són les lesions en el septe recto-vaginal. Tot i que la teoria de la metaplàsia celomàtica podria explicar els casos d'endometriosi reportats en homes, la teoria de restes müllerianes podria també explicar-ho. Els pocs casos descrits d'endometriosi en homes, són homes amb història de càncer de pròstata i sotmesos a tractaments prolongats amb teràpies amb alts nivells d'estrogen [38,47,48]. L'embrió masculí inicialment desenvolupa estructures embriològicament femenines, que posteriorment regressen. És per aquest motiu que seria possible la presència d'aquestes restes müllerianes en homes. Els alts nivells d'estrògens en la teràpia de llarga durada podrien estimular aquestes restes embriogèniques desencadenant la formació del teixit endometrial. Per a que això fos possible, cal la presència d'aquests romanents en adults, fet que encara no s'ha comprovat i que per tant manté la teoria purament especulativa.

D'altra banda, la generació de les lesions a partir de la migració aberrant dels conductes müllerians també podria explicar l'observació d'un nombre significatiu de fetus femenins (7.7 %) amb la presència de teixit endometrial ectòpic en el peritoneu [49].

**v) Teoria de les cèl·lules mare**

La teoria de les cèl·lules mare és una ampliació de la teoria de la implantació del Dr. Sampson. En aquesta teoria se suggereix que en la menstruació retrograda es pot trobar un nínxol de cèl·lules progenitores i/o cèl·lules mare mesenquimals que s'estableixen en el peritoneu i són les encarregades d'originar la formació de les lesions endometriòmiques [50]. En línia amb aquesta hipòtesi, s'ha presentat un estudi

on es mostrava que en les dones amb endometriosis es desprèn una major part de la capa basal de l'endometri durant la menstruació respecte a les dones sense la patologia [51]. De fet, aquestes cèl·lules mare o progenitores s'han identificat en la sang menstrual, i les cèl·lules endometrials de les lesions ectòpiques s'han definit com clonogèniques, donant suport a aquesta teoria [50].

A diferència de la teoria de la implantació del Dr. Sampson, aquesta teoria també intenta explicar els casos detectats d'endometriosis en noies abans de la menarquia [43]. S'ha detectat que entorn al 3-5 % de les nenes nascudes a terme i un 9 % de les nenes nascudes més tard del que pertocava, presenten un sagnat uterí durant la primera setmana de vida per la retirada de les hormones maternes circulants en el naixement [52]. Es creu que aquest sagnat també podria succeir de manera retrògrada, arribant cèl·lules endometrials progenitores a la cavitat pelviana de la nena que podrien envair el mesoteli i mantenir-se en estat latent fins produir-se un increment en els nivells d'estrògens, associats amb l'inici de la pubertat, desencadenant la proliferació i originant-se les lesions endometriòtiques [50].

### 1.7.2. Factors implicats en el desenvolupament i progressió de la malaltia

L'endometriosis és una malaltia multifactorial generada per la combinació de factors genètics i epigenètics, hormonals, ambientals i per alteracions en la resposta immunitària. Factors com l'edat, una menarquia precoç ( $\leq 11$  anys), cicles mensuals de curta durada ( $< 26-27$  dies), menorràgia (sagnats  $> 7$  dies o 80 ml), nul·liparitat, baix pes al néixer i l'obesitat s'han associat amb un major risc de patir endometriosis [53,54]. La majoria d'aquests factors de risc estan relacionats amb alts nivells d'estrògen i prolongades menstruacions, fet que no és d'estranyar ja que l'endometriosis es considera una malaltia depenent d'estrògens i tot apunta que la menstruació és un dels esdeveniments involucrats en el seu inici.

A continuació, es presenten els quatre factors o agents més distintius involucrats en la fisiopatologia de l'endometriosis:

#### a) Predisposició genètica i alteracions epigenètiques

La menstruació retrògrada es presenta com la hipòtesi més acceptada per explicar l'inici de la formació de les lesions endometriòtiques. Però com ja s'ha esmentat, aquest és un procés que es considera pràcticament universal, i per tant, han d'haver-hi trets diferencials causants de que només el 10 % de les dones desenvolupin la malaltia.

La genètica de l'endometriosis és complexa i encara poc definida; tot i així, es considera que la seva herència és poligènica i multifactorial [55]. En el 1980, ja es va publicar el primer estudi genètic que mostrava un increment en el risc de presentar endometriosis en les dones que tenien familiars de primer grau amb la malaltia. Concretament, es van estudiar 123 dones amb endometriosis, de les quals un 5,8 % de les germanes i un 8,1 % de les mares presentaven també la malaltia, determinant un risc de set vegades més de desenvolupar la malaltia en dones amb familiars afectades de primer grau [56]. Per

seguir amb l'estudi del pes que tenia la genètica i l'herència en l'endometriosis, també es van realitzar estudis en parelles de bessones monozigòtiques i dizigòtiques, on es va observar una proporció d'afectació 2:1 d'endometriosis entre les parelles monozigòtiques i dizigòtiques [57]. Aquests resultats, seguint la línia d'altres estudis, reforcen la idea d'un patró hereditari de la malaltia i mostren una influència genètica d'aproximadament un 50 % en el fenotip de la malaltia, un paper similar a l'atribuït als factors ambientals.

Per definir els gens relacionats amb la malaltia, s'han realitzat nombrosos estudis de lligament genètic, de mapeig genètic i estudis d'associació de tot el genoma (GWAS; de l'anglès *genome-wide association studies*) (revisat en [55,58,59]). Els estudis de lligaments han suggerit que hi ha locus de susceptibilitat d'alta penetrància en els cromosomes 7p13-15, 10q26 i 20p13 [60-62]. Diversos gens candidats associats amb la inflamació, la síntesi d'esteroides, destoxicació, receptors d'hormones, el metabolisme d'estrògens, proliferació, adhesió, apoptosi, i altres sistemes metabòlics i enzimàtics s'han avaluat per determinar la seva associació amb la malaltia. De fet, polimorfismes genètics en gens com *TP53*, que codifica la proteïna supressora de tumors p53, en els gens *IL-10*, *IL-1A* i *IL-12B*, que codifiquen per la interleucina antiinflamatòria IL-10 i per les interleucines pro-inflamatòries IL-1 $\alpha$  i IL12 $\beta$ , respectivament, en el gen de l'enzim de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) involucrat en la inflamació i el dolor, en el gen de la proteïna del factor de creixement endotelial vascular (VEGF; de l'anglès *vascular endothelial growth factor*), clau per l'angiogènesi, en el gen del receptor FAS, involucrat en la regulació fisiològica de la mort cel·lular programada, en el gen *WNT4*, que codifica per la proteïna WNT4, promovedora del desenvolupament sexual femení, i en el gen *ESR1*, que codifica pel receptor nuclear d'estrògens 1 (ER1; de l'anglès *estrogen receptor 1*), s'han relacionat amb el desenvolupament de l'endometriosis (revisat en [58]). Curiosament, tot i ser una patologia benigna, en els últims anys s'han detectat mutacions somàtiques en l'epiteli de les lesions endometriòtiques profundes en gens associats amb càncer, incloent *KRAS*, *PIK3CA*, *ARID1A*, i *PPP2R1A* [63].

Per una altra banda, nombroses evidències suggereixen la participació d'alteracions epigenètiques en l'aparició i progressió de la malaltia. Entre elles, s'ha detectat una expressió diferencial de les ADN metiltransferases i de diferents microARNs en les l'endometri eutòpic i les lesions endometriòtiques en dones amb endometriosis respecte a dones sense la patologia, repercutint en l'expressió i/o silenciament de diferents gens (revisat en [64]).

## b) Agents ambientals

Com hem esmentat en el punt anterior, els factors ambientals juguen un paper fonamental en l'endometriosis. De fet, hi ha nombroses evidències que suggereixen que alguns contaminants mediambientals participen en la patogènesi de la malaltia, principalment aquells que actuen com a disruptors endocrins, incloses les dioxines, els pesticides organoclorats, els ftalats i els bisfenols [65-67].

La primera demostració de la relació d'un factor mediambiental amb l'endometriosis es va demostrar amb l'exposició crònica a la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) en la dieta d'un grup de primats [68]. El TCDD, com la majoria de dioxines o tòxics relacionats, actuen sobre un receptor intracel·lular específic d'hidrocarburs aromàtics, el receptor d'hidrocarburs d'arils (AhR; de l'anglès *aryl hydrocarbon receptor*), que es troba àmpliament expressat en les cèl·lules de l'organisme, incloses les cèl·lules endometrials eutòpiques i ectòpiques. L'activació per part de les dioxines de l'AhR pot alterar l'expressió i funció de diversos gens, desencadenant l'activació de factors de creixement i alterant les respostes del sistema immunitari [67]. A més, en el sistema reproductiu femení s'ha observat una íntima relació de l'AhR amb el receptor d'estrògens (ER; de l'anglès *estrogen receptor*). De fet, els efectes de les dioxines varien en funció de la presència o absència d'estrògens. Quan l'ER no està activat per estrògens, aquest pot actuar amb el complex dioxina-AhR promovent la transcripció de gens dependents d'estrògen. En canvi, en presència d'estrògen, aquest reprimeix l'activació gènica mitjançada per l'AhR [65,67]. Per tant, gran part de la implicació d'aquests contaminants ambientals en l'endometriosis és mitjançant modificacions de l'expressió gènica en les cèl·lules i a través d'efectes estrogènics, essencials pel desenvolupament de les lesions, com veurem a continuació.

### c) Factors hormonals: l'estrògen i la progesterona

Els estrògens indueixen la proliferació de les cèl·lules epitelials endometrials durant la fase proliferativa per aconseguir regenerar la capa funcional despresada durant la menstruació. La progesterona inhibeix aquesta proliferació induïda pels estrògens i promou la deciduïtzació de les cèl·lules estromals durant la fase secretora del cicle menstrual. La pèrdua d'aquest balanç hormonal amb una dominància per part de l'estrògen i la resistència a la progesterona juga un paper clau en el desenvolupament i manteniment de l'endometriosis (revisat en [69]).

Els estrògens actuen via els ER alfa i beta (ER $\alpha$  i ER $\beta$ ), principalment a través del ER $\alpha$ , presents en les cèl·lules endometrials tant epitelials com estromals. En l'endometriosis, la via de senyalització ER està altament activada per l'augment local de la producció d'E2 gràcies a un increment en els nivells de l'enzim aromatasa, que converteix els andrògens en estrògens en les cèl·lules endometrials [70]. En les lesions endometriòtiques, la ràtio ER $\alpha$ /ER $\beta$  canvia a favor de l'ER $\beta$  [71]. Una alta activitat d'ER $\beta$  s'ha relacionat amb l'augment de la proliferació i l'adhesió cel·lular mitjançant la interleucina (IL)-1 $\beta$ , en la inhibició de l'apoptosi induïda per el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ; de l'anglès *tumor necrosis factor alpha*) i en l'augment de la transició epiteli-mesènquima que afavoreix l'activitat invasiva de les cèl·lules endometrials ectòpiques [72]. A més de l'acció directa dels alts nivells d'E2, la resistència a la progesterona també és clau per l'increment dels efectes estrogènics.

En condicions fisiològiques, durant la fase fol·licular, l'E2 promou la proliferació de les cèl·lules epitelials i indueix l'expressió dels receptors de la progesterona (PRs; de l'anglès *progesterone receptors*), especialment de la isoforma PR-B. La progesterona té una acció oposada a l'E2 i mitjançant l'activació dels seus receptors, principalment del PR-B, bloquegen l'expressió de l'ER $\alpha$ , afavorint el control de la proliferació cel·lular de les cèl·lules endometrials [73]. Tot i destacar-se l'acció del PR-B, els efectes induïts per la progesterona s'atribueixen a l'acció combinada de les dues isoformes dels PRs, el PR-A i el PR-B, que tenen diferents activitats transcripcionals i poden actuar directament sobre l'ADN o interaccionant amb la tirosina quinasa Src en el citoplasma, desencadenant l'activació de la via de les proteïnes quinases activades per mitògens (MAPKs; de l'anglès *mitogen-activated protein kinases*) fins produir canvis d'expressió gènica (revisat en [73]). El PR-A, sovint, pot produir la inhibició del PR-B, la isoforma amb major capacitat transcripcional [74]. A diferència de l'endometri eutòpic, en les lesions endometriòtiques, no es detecta PR-B [74]. Aquesta pèrdua podria contribuir en la resistència a la progesterona detectada en les dones amb endometriosis.

Entre les cèl·lules endometrials epitelials i estromals es produeix una intercomunicació que es veu alterada en l'endometriosis. La manca de la inducció de la transcripció de diferents gens per part de la progesterona en les cèl·lules epitelials, sobretot transcripcionalment regulats per la senyalització del PR-B, altera la secreció de factors paracrins que contribueixen en la decidualització de les cèl·lules estromals [69]. De la mateixa manera, tampoc se secreten per part de les cèl·lules estromals factors que actuen sobre les cèl·lules epitelials que indueixen l'expressió de la 17 $\beta$ -hidroxiesteroïde deshidrogenasa tipus 2 (17 $\beta$ -HSD2), encarregada de la conversió de l'E2 a la seva forma gairebé inactiva biològicament, l'estrone [75]. Per tant, la resistència a la progesterona afavoreix uns majors nivells locals d'E2 i, conseqüentment, a una major activació dels ER, amb implicacions en la supervivència i proliferació de les cèl·lules endometriòtiques. Tot i això, cal tenir en compte que aquesta desregulació hormonal no només té efectes directes en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic, també té efectes indirectes en l'endometriosis a través de la seva acció en les cèl·lules inflamatòries, essencials pel desenvolupament i progressió de la malaltia.

#### **d) Desregulació del sistema immunològic i la inflamació**

En condicions fisiològiques, el reflux de la sang menstrual en el peritoneu és eliminada pel sistema immunitari. La desregulació del sistema immunitari altera aquest mecanisme de neteja conduint a una predisposició a la formació de les lesions endometriòtiques. A més, com hem esmentat en l'apartat anterior, hi ha factors també secretats per les cèl·lules immunitàries que promouen la proliferació, l'adhesió i la supervivència de les cèl·lules endometrials ectòpiques, afavorint el desenvolupament i la progressió de la patologia de l'endometriosis. Nombroses publicacions han presentat els canvis i les diferents implicacions dels elements del sistema immunitari en la malaltia. En la **Figura**

4 hem esquematitzat les interaccions entre les diferents poblacions immunitàries en la localització ectòpica amb els possibles efectes sobre el teixit endometrial ectòpic. Definir les alteracions immunològiques i el paper de les diferents poblacions immunològiques en les dones amb endometriosis pot ser clau per traçar els mecanismes cel·lulars i moleculars implicats en la malaltia i definir noves estratègies terapèutiques, tant per millorar la simptomatologia del dolor, així com per combatre la infertilitat.

#### *Macròfags*

Els **macròfags** són cèl·lules presentadores d'antígens (APCs; de l'anglès *antigen-presenting cells*) que reconeixen i fagociten patògens, amb la conseqüent activació dels limfòcits T, a més de ser necessaris per la regeneració tissular. En condicions fisiològiques, el nombre de macròfags en l'endometri varia al llarg del cicle menstrual, suggerint una implicació de l'E2 i la progesterona en la seva regulació [76]. A finals de la fase secretora i principi de la fase menstrual és quan es detecta un major nombre de macròfags [76], fet que pot ser atribuït a la seva funció fagocitària i de neteja del detrit cel·lular i de les cèl·lules apoptòtiques despreses en la menstruació. En canvi, en les dones amb endometriosis, aquest increment no es produeix, suggerint alteracions en la eliminació de les cèl·lules endometrials despreses [76]. Aquest escenari, afavoreix un increment de cèl·lules endometrials viables en la menstruació retrògrada, i per tant una major probabilitat d'establir-se cèl·lules endometrials en la cavitat peritoneal. En aquesta línia, l'estudi de les cèl·lules endometrials eutòpiques de dones amb endometriosis han mostrat fenotips més invasius i adhesius, i menys vulnerables a l'apoptosi, per tant més propensos a formar els implants ectòpics [77-79]

Hi ha dos fenotips principals de macròfags: els M1 i els M2. Els macròfags M1 tenen una acció proinflamatòria, produeixen algunes interleucines com són la IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i IL-23, i l'òxid nítric, conduint a l'activació dels limfòcits T col·laboradors 1 (Th1; de l'anglès *T helper 1*) i desencadenant una cascada inflamatòria. Per una altra banda, els macròfags M2 estan involucrats en l'angiogènesi, la remodelació de la matriu extracel·lular i la reparació tissular, i secreten IL-10, generant efectes antiinflamatoris i activant els limfòcits T col·laboradors 2 (Th2; de l'anglès *T helper 2*). Mentre que en els endometris de dones sense la patologia hi predominen els macròfags M2, en els endometris eutòpics de dones amb endometriosis presenten quantitats baixes d'aquesta població durant tot el cicle menstrual, suggerint una **predominança del fenotip proinflamatori M1 en el teixit endometrial eutòpic** [80]. Aquest és un fet important, ja que l'activació d'aquests macròfags comporta la secreció de nombroses citocines proinflamatòries que generen un ambient desfavorable per la implantació de l'embrió en les dones amb la patologia [81].

Contràriament, en les **lesions endometriòtiques**, s'ha detectat una disminució progressiva dels nivells de macròfags M1 associada de l'estadi I al IV de la malaltia, i en canvi, el fenotip M2, que s'ha determinat com el predominant en les lesions d'aquestes pacients, presenta un augment progressiu dels seus nivells de l'estadi I al IV [82].

Aquestes troballes suggereixen la implicació dels **macròfags M1 en el microambient proinflamatori dels estadis inicials** de la malaltia i amb una progressió cap a un ambient amb predominança dels **M2 en els estadis més avançats**, que presenten una activitat fibròtica que podria ser clau per la generació de fibrosi i adherències en les pacients. A més, s'ha observat en models murins d'endometriosis que en la cavitat i el fluid peritoneal també hi ha una major presència dels macròfags M2, que desencadenen un ambient antiinflamatori essencials per la formació i el creixement de les lesions i per la seva vascularització [83]. Un esdeveniment clau per la formació de les lesions és que les cèl·lules endometrials viables no siguin eliminades per aquests macròfags. Aquest fet és possible ja que els macròfags peritoneals de les pacients amb endometriosis presenten una **capacitat fagocítica reduïda**, afavorint la supervivència de les cèl·lules ectòpiques [84,85].

Des del punt de vista de les principals manifestacions clíniques de l'endometriosis, els macròfags també hi poden estar implicats. L'anàlisi del fluid peritoneal de dones amb endometriosis ha mostrat alts nivells de citocines característiques de les dues classes de polarització dels macròfags, com són la IL-1 $\beta$  i la IL-10, que varien en funció de l'estadi de la malaltia i que s'han associat amb una fertilitat reduïda, ja que poden modificar la funció de les trompes uterines, la qualitat dels oòcits i el desenvolupament embrional [86]. En relació al dolor associat a l'endometriosis, s'ha observat que uns majors nivells de macròfags en les lesions s'associen amb més densitat de fibres nervioses i una major presentació de dolor pèlvic [87].

#### *Cèl·lules dendrítiques*

Les **cèl·lules dendrítiques** (DCs; de l'anglès *dendritic cells*) són les principals APCs per la seva capacitat de capturar, processar i presentar antígens als limfòcits T, generant respostes immunitàries específiques i involucrades en l'inici i modulació de les respostes immunitàries. Segons el seu origen i fenotip, es coneixen les DCs plasmocitoides, d'origen limfoide, i les DCs mieloides, d'origen hematopoètic. Les DCs mieloides participen en l'activació dels limfòcits T, tot i que també poden activar limfòcits B, les cèl·lules *natural killer* i macròfags [88]. Aquest segon tipus és el més implicat en l'endometri i l'endometriosis [89]. El reconeixement i processament d'un antígen i diversos factors inflamatoris permeten iniciar el procés de maduració de les DCs immadures. En l'endometri, sol haver baixos nivells de DCs, amb nivells constants de DCs madures però amb un increment en el nombre de DCs immadures durant la fase secretora avançada i la fase menstrual, concretament en la capa basal [90,91]. La secreció de citocines i quimiocines, com són la IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , RANTES (de l'anglès *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*), la proteïna quimioattractant de monòcits 1 (MCP-1; de l'anglès *monocyte chemoattractant protein-1*) i de metal·loproteases, poden facilitar la implantació de l'embrió o regular la presència i acció d'altres cèl·lules immunitàries [91]. De fet, aquest increment de les DCs immadures en aquestes fases



coincideix amb l'increment ja comentat de macròfags en l'endometri, i mostra la captació fisiològica de cèl·lules immunitàries en l'endometri just abans i durant la menstruació per aconseguir l'eliminació de restes, i la posterior regeneració i reparació del teixit endometrial. La variació al llarg del cicle de DCs immadures i els constants nivells de cèl·lules madures fan pensar que l'arribada de DCs a l'úter pot estar regulada hormonalment, però sense influències sobre la maduració de les DCs. S'atribueix als baixos nivells de DCs madures a la seva possible migració cap a òrgans limfoides secundaris [91].

En l'**endometri eutòpic de dones amb endometriosis**, l'**increment de cèl·lules DCs immadures** pròximes a la fase menstrual o durant la menstruació no es produeix, possiblement contribuint en l'aberrant neteja dels detrits endometrials i afavorint la formació de les lesions endometriòtiques [89]. Es detecta un increment en la densitat de DCs immadures en la capa basal de l'endometri durant la fase proliferativa del cicle menstrual [89]. Per una altra banda, hi ha una **reducció de la quantitat de DCs madures** [89], suggerint alteracions en la maduració d'aquestes cèl·lules en els endometris eutòpics de les dones amb la malaltia. En les **lesions**, s'han detectat la presència de **DCs immadures** amb un increment en el peritoneu adjacent comparat amb el peritoneu de dones sense la malaltia [89].

Des del punt de vista de les principals manifestacions clíniques de l'endometriosis, les alteracions en la fluctuació cíclica en el nombre de DCs immadures pot produir alteracions en la implantació de l'embrió. I per una altra banda, com succeix amb els macròfags, les DCs poden promoure la neuroangiogènesi en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de les dones amb endometriosis, amb implicacions en la generació i la percepció de dolor [89].

#### *Cèl·lules natural killer*

Les **cèl·lules assassines naturals o natural killer** (NK) formen part del sistema immunitari innat i actuen com a primera línia de defensa del nostre organisme. En l'endometri humà, les cèl·lules NK són la població de leucòcits predominant, significativament entre un 30-40 % dels leucòcits totals durant la fase proliferativa i més d'un 70 % en la fase secretora [92]. Aquesta variació cíclica en el nombre de cèl·lules NK suggereix la influència de les hormones sexuals en la migració de les cèl·lules NK circulants o en la proliferació de les cèl·lules residents. La caracterització de les cèl·lules NK de l'endometri ha mostrat baixos nivells de CD16, un receptor membre de la superfamília de les immunoglobulines associat amb una major activitat citotòxica de les cèl·lules NK, regulats positivament pels receptors d'activació, com són NKp30 i NKp44, i negativament per receptors d'inhibició, com el receptor tipus immunoglobulina letal (KIR, de l'anglès *killer immunoglobulin-like receptor*) [93,94]. Tot i l'elevada presència de marcadors d'activació i l'increment del nombre de les cèl·lules NK durant la fase secretora, hi ha una disminució de la seva activitat citotòxica, coincidint amb baixos nivells de CD16 i la manca d'activació dels receptors NKp30 i NKp44 [94]. L'estudi d'aquestes cèl·lules ha



permès comprovar que tot i la baixa citotoxicitat poden mantenir funcions antimicrobianes i es considera que la seva funció principal en l'endometri és la de permetre la implantació embrional, generant un microambient favorable pel desenvolupament correcte de la placenta, controlar la invasió del tropoblast amb la secreció de factors angiogènics i diferents citocines, però mantenint la defensa contra patògens [95].

En l'**endometri eutòpic de dones amb endometriosi**, s'ha observat que l'**activitat de les cèl·lules NK és més reduïda**, encara que això depèn de l'estat fèrtil de la dona [96]. Només en aquelles dones amb la malaltia que presenten infertilitat o pèrdues recurrents de l'embaràs, s'ha detectat l'expressió de CD16 i del receptor NKp46, marcadors de citotoxicitat [96]. És per això, que es creu que aquestes cèl·lules NK CD16<sup>+</sup> poden produir factors citotòxics en resposta a les cèl·lules del tropoblast que, juntament amb un major nombre de cèl·lules NK immadures, poden contribuir en la infertilitat, l'avortament o les alteracions en la placenta, comuns en les dones amb la malaltia [96].

Similar a l'endometri eutòpic, s'ha identificat un **elevat nombre de cèl·lules NK immadures** en la sang de dones amb endometriosi. Tot i això, després de l'excisió quirúrgica de les lesions, s'ha observat l'increment del nombre de cèl·lules madures perifèriques, mostrant una implicació de la malaltia en la maduració d'aquestes cèl·lules [97]. L'estudi de les NK presents en el fluid peritoneal de dones amb endometriosi ha mostrat també una **menor activitat citotòxica** en les cèl·lules en comparació amb les de dones sense la patologia [98]. Aquesta activitat citotòxica disminuïda també en la cavitat peritoneal pot conduir a una disminució en l'eliminació dels fragments endometrials potenciant la seva implantació en la cavitat peritoneal.

#### *Limfòcits T*

Els **limfòcits T** són les principals cèl·lules efectores de la immunitat adaptativa i requereixen de la immunitat innata per la seva activació, a la vegada que produeixen citocines que regulen les cèl·lules immunitàries innates. En l'endometri, el nombre de limfòcits T varia al llarg del cicle menstrual, significat un 40-60 % del total dels limfòcits en la fase proliferativa i menys d'un 10 % durant la fase secretora [99].

Hi ha diferents tipus de limfòcits T madurs en funció dels seus marcadors i la seva funcionalitat, on principalment hi destaquen els CD8<sup>+</sup>, coneguts també com limfòcits T citotòxics, i els CD4<sup>+</sup>, coneguts com limfòcits T coordinadors (Th), tot i que també inclou els limfòcits T reguladors (Treg). Els limfòcits T CD8<sup>+</sup> s'activen un cop reconeixen els antígens presentats per les APCs i destrueixen les cèl·lules que continguin aquest antigen. Els limfòcits T CD8<sup>+</sup> són més abundants que els CD4<sup>+</sup> en el teixit endometrial, contràriament a la sang, on hi predominen els CD4<sup>+</sup> [92,100]. El major nombre de limfòcits T CD8<sup>+</sup> s'observa durant l'inici de la fase proliferativa, amb una conseqüent major activitat citolítica i citotòxica en el teixit endometrial que es redueix dràsticament en la fase secretora. Aquesta inhibició de la citotoxicitat es produeix sota la influència de la progesterona, permetent un ambient més favorable per la possible implantació embrionària [99]. En el **teixit endometrial ectòpic** s'han observat **nivells superiors de**

**limfòcits T CD8<sup>+</sup>** respecte als del propi endometri eutòpic de les pacients, sense variacions al llarg del cicle menstrual [101]. Tampoc s'observen fluctuacions en el nombre de limfòcits T CD8<sup>+</sup> en la sang perifèrica de les dones amb la patologia, fet que sí es produeix en les dones sense la patologia [102]. Aquests resultats fan pensar que hi ha una alteració en la regulació de l'activitat d'aquests limfòcits T en les dones amb la malaltia amb possibles implicacions en la seva fertilitat.

Els **limfòcits T CD4<sup>+</sup>** es classifiquen en diferents subpoblacions on hi destaquen els limfòcits Th1, Th2, Th17 i els Treg. Els limfòcits Th1 són cèl·lules que secreten citocines proinflamàtories, com la IL-2 o l'interferó gamma (INF- $\gamma$ ), que incrementa la immunitat cel·lular, promovent l'acció de les cèl·lules NK i dels macròfags [103]. Algunes d'aquestes citocines, inhibeixen la proliferació de les cèl·lules Th2. Els limfòcits Th2 són cèl·lules que secreten citocines, com la IL-4, IL-5, IL-6 i la IL-10, amb accions antiinflamàtories i algunes d'elles condueixen a la inhibició de la proliferació de les Th1. També poden activar als limfòcits B, desencadenant la resposta immunitària humoral, i reclutar altres leucòcits (mastòcits, eosinòfils i basòfils) [103]. Per una altra banda, hi ha els limfòcits Th17, que són cèl·lules caracteritzades per la secreció de la IL-17, necessàries per regular les respostes dels limfòcits T CD8<sup>+</sup> i dels limfòcits B, i inductors del reclutament de cèl·lules del sistema immunitari innat, a través de la secreció d'altres citocines i quimiocines en els focus d'inflamació [104]. I per últim també hi ha els limfòcits Treg, unes cèl·lules supressores de les respostes inflamàtories molt potents que regulen la proliferació i la funcionalitat dels macròfags, mastòcits, DCs, neutròfils, eosinòfils, limfòcits B, limfòcits T i de les cèl·lules NK [105].

En l'endometri de dones sense la malaltia, el major nombre de limfòcits Th1 es detecta durant la fase proliferativa, mentre que els Th2 predominen en la fase secretora i durant l'inici de l'embaràs [106]. L'estudi d'aquestes cèl·lules en dones amb la malaltia mostra **inferiors valors de Th1 en les lesions** respecte a l'endometri eutòpic, i alts nivells de IL-4 i IL-10 en el fluid peritoneal i en la sang perifèrica de les lesions, en comparació amb dones sense la malaltia, mostrant una **predominança de l'acció dels limfòcits Th2 en la malaltia** [107,108]. Aquesta predominança té implicacions en la immunitat cel·lular que poden afavorir la implantació i supervivència de les cèl·lules endometrials ectòpiques [108]. Per una altra banda, la producció de IL-4, IL-5 i IL-13 per part dels limfòcits Th2 té una acció profibròtica, suggerint la seva implicació en el desenvolupament de la fibrosi en les lesions endometriòtiques i en la cavitat peritoneal [109]. A més a més, la IL-4 indueix la producció de quimioatracients que afavoreixen la captació dels **neutròfils** en els implants endometriòtics [108]. Aquests neutròfils produeixen factors angiogènics, com el VEGF, i citocines proinflamàtories com la IL-8, probablement involucrats en la formació de vasos en les lesions i en la progressió de la malaltia [110].

Un altre mecanisme de reclutament de neutròfils en l'endometriosis és mitjançant els limfòcits Th17. En les dones amb endometriosis, s'ha detectat una **elevada quantitat de limfòcits Th17 en les lesions**, el fluid peritoneal i en la sang perifèrica, amb valors

superiors associats a la gravetat de la malaltia [107,111]. L'augment de la presència d'aquestes cèl·lules en les lesions pot ser produït per l'expressió de la quimiocina CCL20 per part de les cèl·lules endometrials ectòpiques, el lligand del receptor CCR6 dels limfòcits Th17 [112]. Aquests limfòcits expressen IL-17A, que es troba en alts nivells en les lesions i la seva concentració en el fluid peritoneal correlaciona amb la gravetat de l'endometriosi i la infertilitat [113]. La IL-17A promou la producció d'IL-8 per part de les cèl·lules estromals endometrials ectòpiques, afavorint la proliferació d'aquestes mateixes cèl·lules i la migració dels **neutròfils** a la lesió [114]. Tot i que principalment als limfòcits Th17 se'ls hi atribueix una clara funció proinflamatòria, ens els últims anys s'ha observat l'alta plasticitat d'aquestes cèl·lules en funció de l'ambient, podent adquirir un fenotip proinflamatori similar als limfòcits Th1, o un fenotip antiinflamatori amb una elevada producció de la IL-10 [104]. Aquesta producció de la IL-10 per part dels limfòcits Th17 s'ha descrit en dones amb endometriosi avançada [115].

Tot i això, la principal font de producció de la IL-10 són els limfòcits Treg. En l'endometri, s'ha observat que els nivells d'estrògens estan associats amb el número de cèl·lules Treg, i per tant es pot observar un increment de la seva densitat durant la fase proliferativa, assolint el màxim de presència durant l'ovulació, i presentant una disminució al llarg de la fase secretora [116]. Es creu que aquest increment pròxim a l'ovulació és una preparació de la tolerància materna per la implantació de l'embrió, gràcies a la seva producció de citocines immunosupressives com la IL-10 i el factor de creixement transformant beta (TGF- $\beta$ ; de l'anglès *transforming growth factor beta*) [116]. Tot i que hi ha controvèrsies, la majoria d'estudis mostren **nivells superiors de limfòcits Treg en l'endometri eutòpic** de dones amb endometriosi en comparació de dones sense la patologia [117]. Per un altre banda, s'ha observat un **menor percentatge d'aquestes cèl·lules en estat actiu** [118]. En les lesions endometriòtiques, s'ha detectat una **elevada presència dels limfòcits Treg en les lesions profundes**, i s'ha observat alts nivells en el fluid peritoneal de les dones amb endometriosi [119,120]. Aquesta abundància de cèl·lules Treg poden conduir a un ambient immunosupressor que facilitaria la implantació i la supervivència de les cèl·lules ectòpiques, permetent la formació i el creixement de la lesió.

#### *Mastòcits, eosinòfils i limfòcits B*

Els mastòcits són cèl·lules implicades en els processos de fibrosi, angiogènesi, inflamació, cicatrització i remodelatge tissular [121]. En l'endometri, es troben en baixes quantitats al llarg del cicle i la seva activació es produeix abans de la menstruació, ja que estan implicats en els vasoespasmes isquèmics de les artèries espirals que provoquen la necrosi del teixit endometrial de la capa funcional i el seu despreniment, i indueix la degeneració de la matriu mitjançant els fibroblasts de l'estroma endometrial, participant posteriorment en la regeneració i la neovascularització del teixit endometrial [99]. En l'endometriosi, hi ha un **increment en el nombre de mastòcits activats en les lesions endometriòtiques** en comparació amb el propi endometri eutòpic de les dones amb

endometriosis [122]. Aquest increment pot participar en empitjorar la inflamació a causa de la seva producció de factors proinflamatoris i quimioatracients, en la formació de les adhesions fibroses i de nous vasos en les lesions. A més, els mastòcits activats condueixen a la infiltració i desgranulació d'**eosinòfils** [122]. Els eosinòfils secreten metal·loproteases i la seva desgranulació indueix la proliferació dels fibroblasts i la producció de col·lagen, suggerint una possible implicació en la implantació i fibrosi de les lesions [99].

En relació a la participació dels **limfòcits B** en l'endometriosis, hi ha molta controvèrsia en el seu paper. Hi ha diferents estudis que han mostrat **nivells aberrants d'autoanticossos** en les pacients amb endometriosis que semblen tenir implicacions en la receptivitat embrional de les dones amb la malaltia (revisat en [123]). Tot i això, encara no s'ha aconseguit consensuar el paper de la reactivitat autoimmune en l'endometriosis.

### *Citocines*

Com s'ha esmentat en aquest apartat, una gran desregulació del sistema immunitari s'associa a la patologia de l'endometriosis, desencadenant una crònica i elevada presència de citocines inflamatòries que afavoreixen la proliferació de les cèl·lules endometrials ectòpiques i amb implicacions negatives en la gestació, i la presència de citocines antiinflamatòries que afavoreixen l'evasió al sistema immune per part de les cèl·lules endometrials ectòpiques.

El **TNF- $\alpha$** , la **IL-1 $\beta$** , **IL-4**, **IL-6**, **IL-8** i la **IL-17**, entre d'altres citocines, es troben incrementades en el fluid peritoneal de les dones amb endometriosis [86,99,108,113].

Aquestes citocines inflamatòries són alliberades per les cèl·lules immunitàries peritoneals i per les cèl·lules infiltrants de la lesió, però també per les pròpies cèl·lules endometrials ectòpiques, desencadenant una cascada inflamatòria que afavoreix la progressió i la gravetat de les manifestacions clíniques de la malaltia [124]. Es considera que el **TNF- $\alpha$**  actua en la fase aguda com a un precursor per iniciar la resposta inflamatòria, conduint a l'alliberament d'altres citocines com són la **IL-1**, **IL-6** i el **VEGF**. A més, el **TNF- $\alpha$**  pot promoure l'adhesió de les cèl·lules endometrials ectòpiques a la superfície peritoneal i la invasió d'aquestes cèl·lules al teixit subjacent a través de la inducció de metal·loproteïnases en el teixit [124].

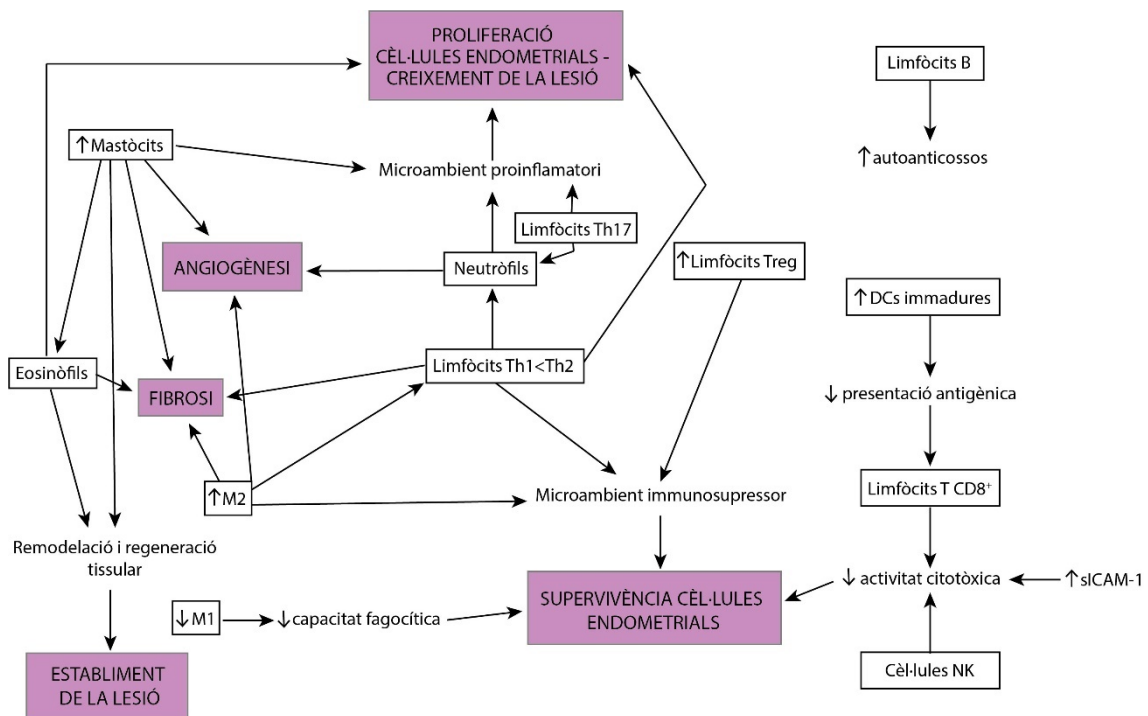
La **IL-1** és essencial per la regulació de la inflamació i de la secreció de la resta de citocines proinflamatòries i la **IL-1 $\beta$**  condueix a la secreció d'altres citocines per part de les cèl·lules estromals endometrials ectòpiques, com són el **VEGF** que afavoreix la neovascularització de les lesions i la **IL-6** que estimula la proliferació de les pròpies cèl·lules estromals, i per tant, afavoreixen el creixement de la lesió [125,126].

Les cèl·lules endometrials ectòpiques també secreten la molècula d'adhesió intercel·lular 1 (ICAM-1; de l'anglès *intercellular adhesion molecule 1*) en forma soluble (**sICAM-1**), que s'uneix a la integrina coneguda com antigen associat a la funció dels limfòcits 1 (LFA1; de l'anglès *lymphocyte function-associated antigen 1*) expressat principalment en limfòcits T, però també en d'altres cèl·lules del sistema immunitari. Aquesta unió

competeix amb la unió a la molècula ICAM-1 expressada en la superfície de molts tipus cel·lulars en situacions d'inflamació, com és el cas de les cèl·lules endometrials, i que permet la unió i l'acció citotòxica de les cèl·lules i dels limfòcits T sobre la cèl·lula diana amb ICAM-1 en la superfície [127,128]. L'increment de sICAM-1 permet l'evasió de les cèl·lules endometrials ectòpiques al sistema immunitari, afavorint la seva supervivència i la formació de les lesions.

Els alts nivells de la **IL-8**, secretada pels macròfags i per les cèl·lules endometrials eutòpiques i ectòpiques, junt amb l'alliberament de la **IL-17A**, majoritàriament per part de les cèl·lules Th17 però també per les cèl·lules endometrials ectòpiques, afavoreix la presència de citocines proinflamatòries, com són la **IL-6** i la **IL-1β**, i angiogèniques, com la **IL-8** i el **VEGF**, en la cavitat peritoneal que afavoreixen l'establiment, la proliferació i la migració de les cèl·lules endometriòtiques [124,126].

Per una altra banda, alts nivells de citocines antiinflamatòries, com la **IL-10**, s'han detectat elevades en les lesions i el fluid peritoneal de les dones amb endometriosi, amb implicacions en la supervivència, el creixement, la invasió, l'angiogènesi i l'evasió al sistema immunitari per part de les lesions endometriòtiques (revisat en [129]).



**Figura 4.** Representació de les principals diferències en la resposta immunitària descrites en el teixit endometrial ectòpic i en la cavitat peritoneal de dones amb endometriosi. Aquests canvis permeten l'establiment i creixement de les lesions, la seva neovascularització, l'evasió al sistema immunitari i la fibrosi característica de l'endometriosi. Imatge d'elaboració pròpia.

## 1.8. Els tractaments de l'endometriosis

Davant d'aquesta malaltia tan complexa, amb una etiologia encara desconeguda, les estratègies terapèutiques actuals són pal·liatives, i es basen principalment en l'actuació sobre alguns dels factors implicats en la malaltia que hem esmentat en l'apartat anterior, amb el propòsit d'alleugerir el dolor, restaurar la fertilitat i/o prevenir la progressió de la malaltia. A continuació s'exposen els principals tractaments farmacològics i quirúrgics actuals que s'utilitzen per la gestió clínica de l'endometriosis.

### 1.8.1. Tractaments farmacològics

La teràpia mèdica sol iniciar-se amb un tractament empíric. Com ja s'ha esmentat, el teixit endometriòtic presenta receptors d'estrogen i progesterona, i manté la capacitat de respondre a aquests estímuls hormonals, essent els estrògens essencials pel creixement i la supervivència dels implants. A més, cal tenir en compte el paper de la menstruació i la inflamació en la patogènesi de la malaltia. És per això, que la majoria de tractaments farmacològics que s'utilitzen per reduir el dolor associat a l'endometriosis són de tipus analgèsic/antiinflamatori, concretament agents antiinflamatoris no esteroidals (AINEs), junt amb supressors de la funció ovàrica o dels estrògens, per intentar eliminar o reduir les lesions ectòpiques, suprimir la menstruació i reduir l'estat inflamatori, i conseqüentment el dolor [130]. Entre els tractaments hormonals més habituals trobem l'ús d'anticonceptius combinats orals (ACOs), d'agonistes de l'hormona alliberadora de la gonadotropina (GnRH, de l'anglès *gonadotropin-releasing hormone*), de progestàgens i d'inhibidors de l'enzim aromataza. L'eficàcia dels diferents tractaments solen ser similars, sovint amb resultats modestos i amb taxes de recurrència pròximes al 80 % [27]. A més, solen presentar diferents efectes secundaris importants que dificulten prolongar els tractaments.

Els **ACOs**, amb la combinació d'estrogen i progestàgens, junt amb els AINEs, són els tractaments de primera línia de l'endometriosis per alleugerir el dolor. L'acció principal dels ACOs és la inhibició de la funció ovàrica, permetent la decidualització i l'atrofia del teixit endometrial i reduint l'expressió en les cèl·lules endometrials ectòpiques d'enzims implicats en la inflamació [13,131]. El control del cicle menstrual pels ACOs ha demostrat produir una disminució de la dismenorrea, sovint amb una reducció concomitant del dolor pèlvic no cíclic i de la dispareúnia en les pacients amb endometriosis, així com un menor risc de recurrència amb el seu ús postquirúrgic (revistat en [130]). No obstant això, l'efectivitat d'aquests tractaments per l'endometriosis és molt variable i fa que el seu ús en l'endometriosis encara sigui discutible, tot i ser el principal tractament d'elecció i permetre el seu ús de manera segura durant un llarg període de temps [132]. Una situació similar ocorre amb els AINEs, que tot i ser utilitzats com a tractament de primera línia per l'endometriosis, no hi ha gaires estudis concloents que demostrin la seva efectivitat analgèsica en el control del dolor associat a l'endometriosis [133].

La principal alternativa farmacològica dels ACOs pel tractament del dolor associat a l'endometriosi són els **progestàgens**, variants químics de la progesterona. Els progestàgens disminueixen la secreció de GnRH en l'hipotàlem, desencadenant una reducció de la secreció de l'hormona estimuladora fol·licular (FSH; de l'anglès *follicle-stimulating hormone*) i de l'hormona luteïnitzant (LH; de l'anglès *luteinizing hormone*) per part de la pituitària anterior. Com a conseqüència, l'administració de progestàgens suprimeix la generació d'estrògens per part de l'ovari, induint l'anovulació i un estat d'hipoestrogènic que causa la deciduïtzació i l'atrofia del teixit endometrial eutòpic i dels implants [134]. A més a més, s'han descrit efectes inhibitoris en l'angiogènesi, la supressió de l'acció de les metal·loproteases de la matriu, i es suggereixen efectes antiinflamatoris associats al tractament continu amb progestàgens, afavorint l'alleugeriment del dolor i dificultant el creixement i la implantació del teixit endometrial ectòpic [13,134]. Concretament, com succeïa amb els ACOs, els progestàgens han mostrat un alleujament de la dismenorrea, del dolor pèlvic i de la dispareúnia en les pacients amb endometriosi, amb l'avantatge de tenir un menor risc trombòtic [134]. L'inconvenient d'aquests tractaments és que sovint causen efectes similars al síndrome menstrual, com són fatiga, ansietat, canvis d'humor, irritabilitat, depressió o mal de cap, i alteracions en el sagnat menstrual [27]. Un altre punt important és que la resistència a la progesterona associada a l'endometriosi converteix aquests tipus de tractaments hormonal en inefectius per a un grup de dones amb la malaltia [135].

L'ús d'**agonistes de la GnRH** són considerats de segona o tercera línia pel tractament del dolor associat a l'endometriosi i solen associar-se a casos severos d'endometriosi. Aquests fàrmacs actuen generant una supressió central de la secreció de la GnRH amb la conseqüent inhibició de la producció ovàrica d'estrògens. La generació d'un estat hipoestrogènic permet l'atrofia dels implants i fins i tot la seva regressió [134]. La reducció del dolor associat a l'endometriosi s'estima en el 50-90 % dels casos tractats amb agonistes de la GnRH, amb resultats destacables en l'eliminació o reducció de les lesions profundes [13]. Aquest tractament, però, es recomana no estendre'l més de 6 mesos ja que l'estat hipoestrogènic que induïx s'associa amb una gran quantitat d'efectes secundaris de tipus menopàusics, com la pèrdua de densitat òssia, fogots, atrofia urogenital, alteracions en el perfil lipídic, mals de cap i canvis en l'estat d'ànim [13]. Diverses revisions sistemàtiques i metanàlisis han estudiat la millora del dolor associat a l'endometriosi amb l'ús d'agonistes de la GnRH en comparació amb els altres fàrmacs utilitzats en l'endometriosi. Resultats similars en la disminució de la intensitat del dolor pèlvic es van obtenir entre les pacients tractades amb agonistes de la GnRH i pacients tractades amb baixes dosis d'ACO, progestàgens i danazol [136-140].

Altres fàrmacs com el **danazol** o **agents inhibidors de l'aromatasa** s'han estudiat pel tractament de l'endometriosi. El danazol és un agent androgènic efectiu per l'alleugeriment del dolor en l'endometriosi, que afavoreix uns baixos nivells d'estrògen, dificultant la proliferació de les lesions endometriòtiques, i l'atrofia del teixit endometrial. El seu ús és molt limitat a causa de la seva simptomatologia hiperandrogènica, que provoquen efectes indesitjables com l'augment del pes,



acne, retenció de líquids o alteracions en la veu de les pacients [141]. Els inhibidors de l'aromatasa actuen bloquejant la conversió dels precursors esteroidals en estrògens, reduint també els nivells d'estrògens. Els principals problemes d'aquests fàrmacs que dificulten el seu ús són l'osteopènia i l'osteoporosi associada i el creixement de quists fol·liculars ovàrics [13].

Davant les limitacions dels tractaments actuals, **la necessitat de noves estratègies farmacològiques i la determinació de noves dianes terapèutiques** és evident. Diferents assajos s'han dut a terme en els últims anys per determinar nous fàrmacs pel tractament de l'endometriosis, com són els antagonistes de la GnRH, moduladors selectius del receptor de la progesterona i de l'estrogen, fàrmacs antiangiogènics, antioxidants o agents immunomoduladors (revisat en [134]).

### **1.8.2. Tractaments quirúrgics**

Encara que s'estima que entre un 80-90 % de les pacients amb teràpia farmacològica presenten una certa millora en la simptomatologia, la recurrència dels símptomes a curt termini és molt habitual. A més, aquests abordatges no restableixen la fertilitat, ni tampoc eliminen els endometriomes ovàrics o les adherències presents en les dones amb endometriosis [131]. És per això, que en els casos amb sospita de presència d'endometriomes, amb simptomatologia greu o amb infertilitat és més recomanable realitzar un tractament quirúrgic. A l'hora de determinar l'enfocament quirúrgic s'ha de tenir clar si el problema a tractar és el dolor o la infertilitat, ja que la cirurgia pot ser conservativa i orientada a futurs tractaments de reproducció assistida, amb l'extirpació de les lesions i/o de les adherències visibles, o definitiva, on també es realitza una histerectomia amb la possibilitat d'extirpar les trompes i els ovaris (histerectomia amb annexectomia bilateral), impossibilitant una futura gestació [13].

La principal tècnica quirúrgica emprada en l'endometriosis és la **laparoscòpia**. De fet, molts experts destaquen la seva importància per assolir el diagnòstic de la malaltia i com a tractament de primera línia. Un dels principals motius és perquè la laparoscòpia permet realitzar el diagnòstic definitiu al permetre l'observació directa de les lesions, aconseguint l'estadificació de la malaltia, a més de permetre l'obtenció d'una biòpsia per la seva confirmació histològica. Per una altra banda, la laparoscòpia és una cirurgia poc invasiva que ofereix l'oportunitat d'extirpar els diferents tipus de lesió presents, incloent els endometriomes, així com també les adherències [24].

En les **lesions peritoneals superficials**, la seva extirpació ha mostrat una millora dels símptomes en el 62-80 % dels casos amb un increment de l'èxit dels tractaments de reproducció assistida [142,143]. Tot i així, les principals societats internacionals en el camp de l'endometriosis recomanen la intervenció laparoscòpia d'aquest tipus de lesions només en aquelles pacients que no han respost als tractaments farmacològics, que els declinen o bé presenten contraindicacions [13,142]. Cal tenir en compte però, que la recurrència dels símptomes és detecta aproximadament en un 10 % dels casos als 12 mesos, i en un 40-50 % dels casos als 5-7 anys.

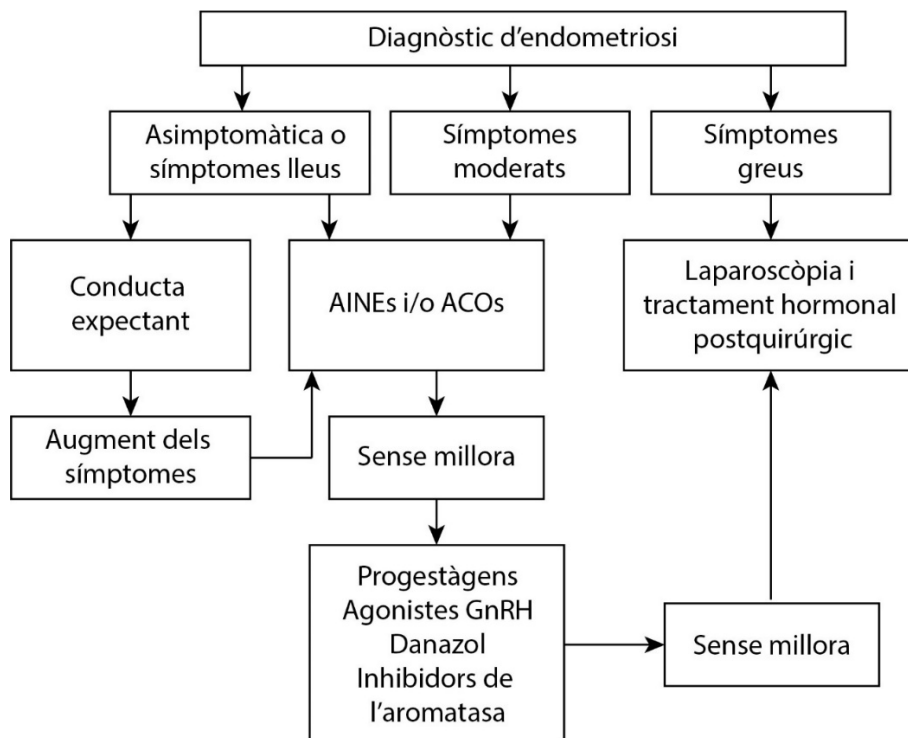


L'ús de les teràpies farmacològiques hormonals esmentades anteriorment de manera postquirúrgica redueix aquesta recurrència i la necessitat de repetir la cirurgia [13].

En el tractament quirúrgic dels **endometriomes** s'inclouen les tècniques d'aspiració, d'ablació, quistectomia (extracció del quist) o una combinació d'elles. S'ha observat que la quistectomia presenta millors resultats en la recurrència dels endometriomes i dels símptomes, convertint-se en la tècnica d'elecció, però cal tenir en compte el desig de gestació de cada pacient, ja que aquesta tècnica disminueix la reserva ovàrica de les pacients [144,145]. Una alternativa per preservar els fol·licles en el teixit ovàric és la realització de l'aspiració del contingut de l'endometrioma, seguit de l'esclerosi del teixit per reduir la recurrència de la lesió [146].

La cirurgia dels casos amb **lesions endometriòtiques profundes** és molt complexa ja que sovint hi estan implicats altres òrgans i sistemes i sol haver-hi un gran nombre d'adherències. La resecció parcial d'aquestes lesions pot no resultar útil per alleugerir la simptomatologia, i una resecció completa està associada amb complicacions en el sistema urinari, reproductiu i gastrointestinal [13]. És per això que en els casos d'endometriosi greu amb afectació de diversos òrgans, l'abordatge ha de ser multidisciplinari per assolir l'extirpació completa i acurada de tots els focus d'endometriosi en un sol acte quirúrgic. Malgrat a la complexitat d'aquest tipus de cirurgia, en la majoria de les pacients, es pot completar per via laparoscòpica [27].

En la **Figura 5** és representa l'algoritme del tractament del dolor en l'endometriosi.



**Figura 5.** Algoritme del tractament de l'endometriosi. Representació esquemàtica adaptada de Triano-Sánchez i Prado-Prieto [131].

Com s'ha exposat en aquest apartat, els tractaments actuals per l'endometriosis, tant farmacològics com quirúrgics, no són efectius per alleugerir el dolor en totes les pacients, i els casos en els quals s'assoleix una millora aquesta sol ser limitada en el temps.

Un gran nombre d'estudis han demostrat el paper de la senyalització purinèrgica en diferents patologies inflamatòries o amb un important component inflamatori associat, així com el desenvolupament de noves eines terapèutiques on el **purinoma**, el complex molecular implicat en l'activació, el manteniment i la finalització de la senyalització purinèrgica, és seleccionat com a diana terapèutica (revisat en [147]).

En els últims anys, hi ha hagut un interès creixent en elucidar el paper de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis, principalment el seu paper en el dolor crònic associat a la patologia [148,149]. A continuació, es presentarà la senyalització purinèrgica i s'exposarà en el context de l'endometriosis.

## 2. LA SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA

El paper més reconegut de l'**adenosina trifosfat (ATP)** és a nivell intracel·lular, on l'ATP es coneix com la font d'energia universal que impulsa les reaccions biològiques i permet el funcionament cel·lular [150]. En el 1954, però, es va proposar per primera vegada l'ATP i els seus derivats com a molècules de senyalització extracel·lular [151], un idea que es va rebre amb escepticisme. El 1972, el Dr. Geoffrey Burnstock va atribuir-li la funció de neurotransmissor i va descriure la senyalització purinèrgica [152]. Des d'aquell moment, l'interès i la recerca en el camp de la senyalització purinèrgica no ha parat de créixer i s'ha establert l'ATP com una molècula crítica pel nostre organisme, no només per ser el combustible universal, també per ser un llenguatge comú que permet comunicar les diferents cèl·lules i teixits del nostre organisme.

La **senyalització purinèrgica** és el conjunt d'efectes biològics mediatos extracel·lularment per nucleòtids, com l'ATP, o pels nucleòsids que en deriven, com l'adenosina, involucrats en el control de nombrosos mecanismes fisiològics i patològics [153].

En condicions fisiològiques, els nivells extracel·lulars d'ATP són molt baixos, amb concentracions submicromolars, en contraposició als alts nivells intracel·lulars, que poden assolir concentracions superiors a 1 mM [154]. L'alliberació endògena d'aquest ATP intracel·lular, o dels seus derivats, a l'espai extracel·lular, pot produir-se de manera activa per cèl·lules activades o estressades, com per exemple durant la inflamació, sota condicions d'hipòxia o apoptosi, a través de vesícules d'exocitosi, canals de connexines o pannexines, transportadors específics d'unió a ATP, els canals moduladors de l'homeòstasi del calci o a través del receptor i canal P2X7. L'alliberament d'ATP de manera passiva pot produir-se per alteracions en la integritat de la membrana plasmàtica que condueixin a l'exposició del contingut intracel·lular [155-157]. Aquestes situacions poden representar un increment molt marcat d'aquests nivells extracel·lulars, desencadenant l'inici de la cascada de la senyalització purinèrgica i induint una resposta inflamatòria [153,155].

## 2.1. Receptors de nucleòtids i nucleòsids: receptors P1 i P2

L'ATP i l'adenosina regulen un gran nombre de processos a curt termini, com la neurotransmissió, la neuromodulació, la secreció endocrina i exocrina, la quimioatracció, la contracció muscular i la inflamació aguda, i a llarg termini, com la proliferació cel·lular, la diferenciació, la migració, la mort cel·lular, l'envelliment, i malalties com el càncer (revisat en [158] i [159]). La seva acció és possible a l'actuar com a lligand extracel·lular dels receptors purinèrgics o purinoreceptors, àmpliament distribuïts en la superfície cel·lular de la majoria de cèl·lules. Concretament, un cop l'ATP (i nucleòtids) i/o l'adenosina es troben en el microambient extracel·lular, poden activar dues famílies diferents de receptors purinèrgics, els receptors P1 i els P2.

L'**adenosina** s'uneix als **receptors P1**, que són receptors acoblats a proteïnes G, classificats en quatre subtipus: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> i A<sub>3</sub> [160]. Aquests receptors principalment actuen a través de l'activitat de l'adenilat ciclasa (AC), regulant la producció del segon missatger adenosina monofosfat cíclica (cAMP). Concretament, l'activació dels receptors A<sub>2A</sub> i A<sub>2B</sub> indueixen l'activació de l'AC, incrementant els nivells de cAMP i, contràriament, l'activació dels receptors A<sub>1</sub> i A<sub>3</sub> inhibeixen l'acció de l'AC amb la consegüent disminució dels nivells de cAMP [160]. A més, els receptors A<sub>3</sub> i A<sub>2B</sub> condueixen a l'activació de la fosfolipasa C (PLC; de l'anglès *phospholipase C*) i a un increment dels nivells de calci intracel·lulars. Els receptors A<sub>1</sub>, en canvi, estan implicats en l'obertura dels canals de potassi [161,162]. A més, els receptors P1 estimulen la via de les MAPKs, controlant el creixement i la proliferació cel·lular, l'apoptosi, la necrosi i la inflamació, tots ells processos clau pel desenvolupament de les lesions en l'endometriosis [163].

Els **nucleòtids** actuen sobre els **receptors P2**, els quals presenten dos subtipus diferents: **els receptors P2X i els P2Y**. Els receptors ionotròpics P2X, estan compostats per set subtipus diferents (P2X1-P2X7), i tots ells són canals iònics dependents de lligand formats per com a mínim per tres subunitats formant heterotrímers, com el receptor P2X2/3, o homotrímers, com el receptor P2X7. Aquests receptors, amb la unió de l'ATP extracel·lular, faciliten la sortida de potassi de la cèl·lula i l'entrada de sodi i de calci, principalment desencadenant les respostes de curt termini de la senyalització purinèrgica [159,160]. Per una altra banda, trobem els receptors metabotròpics P2Y associats a proteïnes G. Els receptors P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> i P2Y<sub>6</sub> estan associats a proteïnes G del tipus Gq que condueixen a l'activació de la PLC, generant inositol-1,4,5-trifosfat (IP3), que incrementa l'alliberament intracel·lular de calci, i diacilglicerol (DAG), que activa la proteïna quinasa C (PKC), i els receptors P2Y<sub>12-14</sub> activen a proteïnes Gi que produeixen la inhibició de l'AC, reduint els nivells intracel·lulars de cAMP. L'estimulació del receptor P2Y<sub>11</sub> activa la proteïna Gq i Gs, desencadenant un augment del calci intracel·lular i l'activació de la via de cAMP. En funció de les afinitats dels receptors P2Y es poden dividir en tres grups diferents: (i) els receptors que prefereixen els nucleòtids d'adenina, que responen principalment a l'ATP (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> i P2Y<sub>11</sub>) i a l'adenosina difosfat (ADP) (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>); (ii) els receptors que prefereixen els nucleòtids d'uracil, activats per l'uradina trifosfat (UTP) (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>) i l'uradina difosfat (UDP) (P2Y<sub>6</sub> i P2Y<sub>14</sub>); i el receptor que prefereix els nucleòtids amb sucres,

concretament el receptor P2Y<sub>14</sub>, que respon a l'UDP associat a monosacàrids, com són l'UDP-glucosa o l'UDP-galactosa [157,160]. Els receptors acoblats a proteïnes G, com són els receptors de l'adenosina P1 i els receptors de nucleòtids P2Y són fonamentals per la regulació de la proliferació, la diferenciació, la motilitat, la migració i la mort cel·lular, processos essencials per l'establiment i progressió de les lesions endometriòtiques [159].

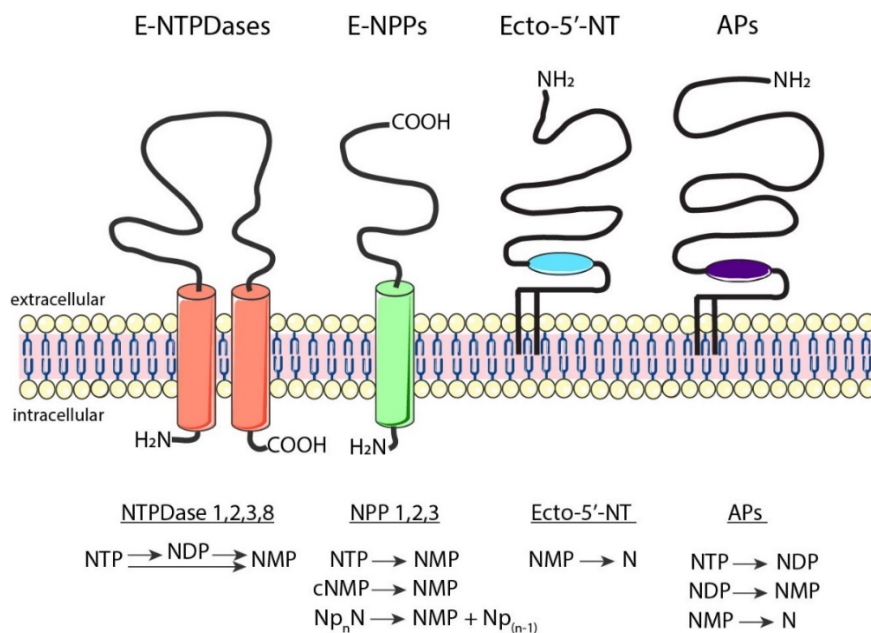
## 2.2. Metabolisme extracel·lular dels nucleòtids i nucleòsids: les ectonucleotidases

L'ATP s'associa amb efectes proinflamatoris, i l'adenosina sol jugar un paper totalment oposat. Per mantenir l'homeòstasi tissular és fonamental aconseguir una senyalització purinèrgica transitòria, amb unes concentracions extracel·lulars d'ATP i d'adenosina controlades. És per aquest motiu que és essencial la presència i acció dels ectoenzims o de les ectonucleotidases encarregades de la hidròlisi de l'ATP i els seus productes derivats [153].

Les **ectonucleotidases** solen realitzar la seva acció catalítica ancorades en la membrana plasmàtica de les cel·lules, tot i que també es poden trobar en forma soluble en el líquid intersticial o en diferents fluids corporals [153]. Actualment, s'han descrit quatre famílies d'ectonucleotidases unides a membrana, que s'expressen de manera diferencial entre els diferents tipus de cèl·lula i de teixit, de manera aïllada o en combinació, i que sovint requereixen l'acció seqüencial dels diferents subtipus per aconseguir una hidròlisi completa de l'ATP fins l'adenosina. Les quatre famílies descrites són (i) la família **ectonucleòsid trifosfat difosfohidrolasa (ENTPDasa)**, també coneguda com família CD39, amb els membres NTPDasa1 (CD39), -2, -3 i -8, els quals hidrolitzen l'ATP extracel·lular a ADP, i l'ADP a adenosina monofosfat (AMP); (ii) la família **ectonucleòtid pirofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP)**, amb els membres NPP1, -2 i -3, que converteixen l'ATP en AMP i pirofosfat inorgànic; (iii) la família **ecto-5'-nucleotidasa**, amb un únic membre, la 5'-nucleotidasa (5'-NT), coneguda com CD73, que hidrolitza l'AMP a adenosina; i (iv) la família de les **fosfatases alcalines** (ALP o AP, de l'anglès *alkaline phosphatase*), que metabolitzen els nucleòtids d'adenina i els pirofosfats, alliberant fosfat inorgànic [153,164]. En la **Figura 6** es troben representades les diferents famílies i d'ectonucleotidases amb les característiques hidrolítiques de cada família.

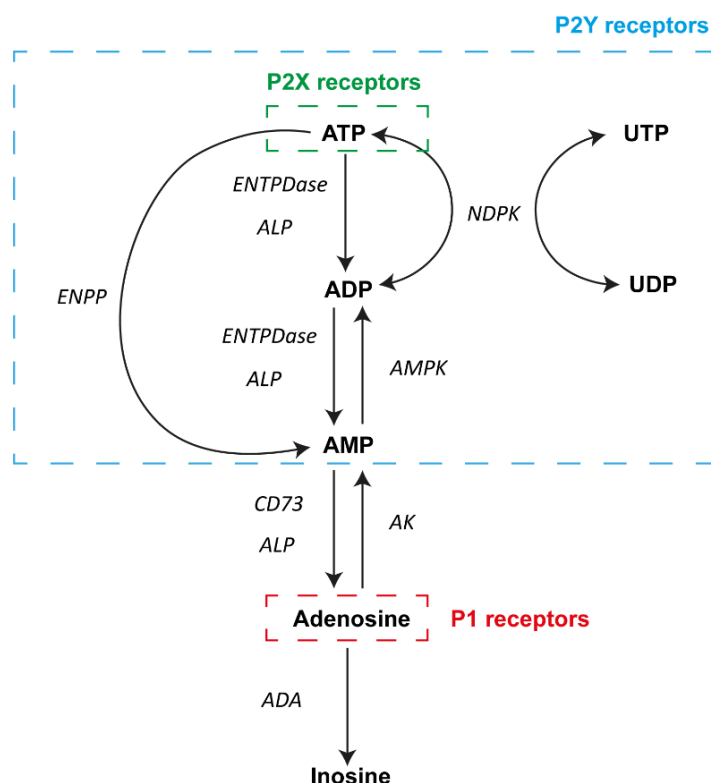
Tal i com hem explicat, l'adenosina també té funcions biològiques importants, i per tant, el control dels seus nivells també és fonamental. Per una banda, la concentració d'adenosina està directament regulada per l'ectonucleotidasa CD73 i l'ALP, però també hi ha altres dos enzims responsables d'aquest control: l'adenosina desaminasa (ADA) i l'adenosina quinasa (ADK, de l'anglès *adenosine kinase*). L'ADA és una enzima citoplasmàtica que regula els nivells d'adenosina del compartiment intracel·lular, però que gràcies a la seva forma soluble o a la formació de complexos de membrana per la seva unió amb l'enzim de membrana CD26/ dipeptidil peptidasa IV pot actuar com a ectoenzim, disminuint els nivells extracel·lulars d'adenosina. La funció de l'ADA es basa en la desaminació irreversible de l'adenosina, inactivant-la i generant inosina. Per

una altra banda, l'ADK és un enzim citosòlic que catalitza la fosforilació de l'adenosina intracel·lular formant AMP. Aquesta actuació implica la regulació dels nivells d'adenosina del compartiment extracel·lular, ja que la seva entrada a la cèl·lula (i la seva alliberació) pot ser per difusió facilitada, en funció del gradient, per part dels transportadors de nucleòsids equilibratius (ENT) [153,157]. La presència de transportadors de nucleòsids concentradors (CNT) participen també en l'absorció de l'adenosina extracel·lular, però a diferència dels ENTs, de manera unidireccional, ja que utilitzen el gradient de sodi per transportar l'adenosina a l'interior de la cèl·lular [157]. En la **Figura 7** es pot observar de manera simplificada les principals vies de conversió de l'ATP i l'adenosina.



**Figura 6.** Representació esquemàtica de les quatre famílies d'ectonucleotidases i les seves especificitats de substrat. La imatge s'ha obtingut del capítol "In Situ Identification of Ectoenzymes Involved in the Hydrolysis of Extracellular" del llibre "Immunohistochemistry" (2019) en el qual la doctoranda ha participat com a coautora durant la realització de la present tesi doctoral (veure **Annex 1**) [165]. Abreviatures: NTP: nucleòtid trifosfat; NDP: nucleòsid difosfat; NMP: nucleòsid monofosfat; cNMP: nucleòsid monofosfat cíclic; N: nucleòsid.

Canvis en el balanç entre l'ATP i l'adenosina, per tant, poden implicar modificacions en l'estat d'activació dels purinoreceptors, podent alterar el comportament d'un gran nombre de cèl·lules, així com desencadenar un estat patològic o promoure la progressió d'una malaltia, com podria succeir en l'endometriosis. És per això que una correcta expressió i funció dels diferents elements del purinoma, com són els lligands, els receptors, els transportadors/canals i els ectoenzims, són claus per tenir o recuperar l'estat fisiològic. El seu estudi pot ser essencial per elucidar nous biomarcadors i/o dianes terapèutiques per un gran nombre de patologies.



**Figura 7.** Representació dels diferents elements que participen en el metabolisme dels nucleòtids i nucleòsids. Canvis en els nivells extracel·lulars dels nucleòtids i nucleòsids tenen repercussió en l'activació dels receptors P2Y (quadre blau) i, concretament, canvis en l'ATP també influeixen sobre els efectes controlats pels receptors P2X (quadre verd). En canvi, la modificació dels nivells de l'adenosina té un impacte en l'acció dels receptors P1 (quadre vermell). Diagrama publicat en la revisió "Purinergic Signaling in Endometriosis-Associated Pain" (2020) realitzada per la doctoranda de la present tesi doctoral junt amb la Dra. Martín-Satué (vegeu **Annex 2**) [166]. Abreviatures: NDPK: nucleòsid difosfat quinasa; AMPK, adenosina monofosfat quinasa, AK: adenosina quinasa.

### 3. LA SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA EN L'ENDOMETRIOSI

La senyalització purinèrgica juga un paper clau en els processos inflamatoris, en la reproducció i en la correcta funció endometrial (revisat en [167-170]). Per tant, no és d'estranyar que qualsevol canvi en el purinoma pugui alterar la funció uterina, la resposta inflamatòria i la fertilitat en la dona, com succeeix en l'endometriosis. A més, la senyalització purinèrgica està implicada en la regulació d'un gran nombre d'esdeveniments cel·lulars com són la proliferació, la migració i la supervivència, i en fenòmens com l'angiogènesi i la fibrosi (revisat en [158,171,172]), convertint-se en una via candidata de tenir un paper en la patogènesi i progressió d'aquesta malaltia.

Tot i això, l'estudi de la senyalització purinèrgica en l'endometri i en l'endometriosis encara és molt limitat. A continuació presentarem el què es coneix de la senyalització purinèrgica en l'endometri, i el seu paper en el funcionament del sistema immunitari, factor clau en l'endometriosis. A més, s'exposarà el seu paper en els dos trets característics de l'endometriosis: el dolor i la infertilitat.

#### 3.1. La senyalització purinèrgica en la resposta inflamatòria

Com hem esmentat, la desregulació del sistema immunitari i l'estat inflamatori crònic associat a l'endometriosis és clau pel desenvolupament i la progressió de la malaltia. La senyalització purinèrgica és una via de senyalització essencial per la regulació i funcionament dels diferents elements del sistema immunitari.

L'ATP el trobem en altes concentracions intracel·lulars. Per tant, qualsevol ruptura de la membrana plasmàtica desencadenarà la sortida passiva d'ATP, que ràpidament es difondrà per l'espai extracel·lular i serà degradat per les ectonucleotidases. Per una altra banda, estímuls proinflamatoris com són les espècies reactives de l'oxigen (ROS, de l'anglès *reactive oxygen species*) o condicions d'hipòxia, ambdues presents en l'endometriosis, poden desencadenar l'alliberament de grans quantitats d'ATP [157].

L'ATP és considerat una **senyal de dany** (alarmina) o un **patró molecular associat a dany** (**DAMP**, de l'anglès *damage-associated molecular pattern*), reconegut per les cèl·lules del sistema immunitari innat, que sovint genera i/o amplifica la inflamació. L'acumulació de l'ATP extracel·lular fomenta la migració de les cèl·lules inflamatòries, redirigeix la diferenciació dels limfòcits Th, activa l'inflamasoma NLRP3, promou l'alliberament de citocines, quimiocines i de factors de creixement, indueix la formació de radicals lliures, estimula el creixement de les cèl·lules estromals i facilita les respostes citotòxiques per part de les cèl·lules immunitàries (revisat en [173]). Per tant, la cascada de senyalització desencadenada per l'ATP provoca respostes clarament proinflamatòries orientades al reclutament de les cèl·lules immunitàries efectores i a l'eliminació de les cèl·lules malmeses, accions claus per evitar la formació de les lesions endometriòtiques.

Concretament, en els monòcits/macròfags i en les DCs, el receptor purinèrgic amb un paper més destacat és el P2X7 ja que desencadena l'activació del inflamasoma NLRP3, el principal complex intracel·lular involucrat en la transducció de senyals en la iniciació de la inflamació. El receptor P2X7 és el receptor amb més baixa afinitat per l'ATP, amb un llindar d'activació en concentracions mil·limolars. És per això que la seva actuació és relaciona principalment amb la inflamació [174,175]. L'efecte més conegut de l'estimulació de P2X7 en aquestes cèl·lules és l'alliberació de la forma activa de la IL-1 $\beta$  i la IL-18 gràcies a l'activació de la caspasa 1 per l'assemblatge de l'inflamasoma. La secreció d'aquestes ILs, entre d'altres, és important per la diferenciació dels limfòcits T, amb accions essencials per la producció de l'IFN- $\gamma$  per part dels limfòcits T CD8<sup>+</sup> i de les cèl·lules NK, a més de tenir influència sobre la diferenciació dels limfòcits Th cap al subtipus Th17 (revisat en [175]). A més a més, en les DCs, s'ha descrit la implicació del receptor P2X7 en l'expressió de diferents receptors de quimiocines en la superfície involucrats en la migració d'aquestes cèl·lules, així com en l'increment d'expressió de molècules coestimuladores en la membrana durant la seva maduració [175,176]. En els macròfags, l'alliberament de prostaglandina E2 (PGE2) és dependent també de l'activació del receptor P2X7 [174]. L'exposició prolongada a alts nivells d'ATP extracel·lulars condueixen a la formació de grans macroporus en la membrana plasmàtica per part del receptor P2X7 que poden conduir a la mort cel·lular [174]. Tot i la importància d'aquest receptor, no hem d'oblidar que altres receptors P2 s'han descrit en aquestes cèl·lules amb altres accions proinflamatories, moltes implicades en el reclutament d'altres cèl·lules del sistema immunitari innat [177].

En la resposta immunitària adaptativa, l'ATP també té un paper directe. Per exemple, en els limfòcits T, l'estimulació del receptor dels limfòcits T (TCR; de l'anglès *T cell receptor*) provoca la



translocació dels receptors P2X1 i P2X4 i de la pannexina-1 en la sinapsi immunitària, i incrementa l'expressió en tota la membrana plasmàtica dels receptors P2X7. L'activació d'aquests receptors en els limfòcits T per part de l'ATP extracel·lular regula la senyalització del TCR, incrementa la producció de la IL-2, indueix la proliferació dels limfòcits T i és essencial per la seva migració [175,178-180].

Per ajustar la durada i la magnitud d'aquesta resposta inflamatòria, és necessària l'activitat enzimàtica de les ectonucleotidases. La **via d'hidròlisi CD39-CD73** és la principal encarregada de regular les cèl·lules inflamatòries i la inflamació, permetent la conversió seqüencial d'ATP/ADP a AMP, i d'AMP a adenosina. La seva acció impulsa un canvi d'un entorn proinflamatori impulsat per l'acció de l'ATP sobre els seus receptors P2, per un medi antiinflamatori induït per l'acció de l'adenosina a través dels receptors P1. A més, l'acció de les ectonucleotidases evita la dessensibilització dels receptors P2 (revisat en [169]).

El sistema CD39-CD73, junt amb les altres ectonucleotidases, regula la funció d'un gran nombre de cèl·lules immunitàries, com són els macròfags, les DCs, els mastòcits i els limfòcits. En els monòcits/macròfags, l'eix CD39-CD73 permet regular la seva diferenciació i activitat. En els macròfags, l'adenosina indueix l'expressió del receptor  $A_{2A}$ , i l'estimulació del receptor de tipus Toll (TLR; de l'anglès *Toll-like receptor*) l'expressió de l' $A_{2B}$ , convertint-los en un fenotip més sensible a l'adenosina [181,182]. L'activació d'aquests receptors,  $A_{2A}$  i  $A_{2B}$ , junt amb els  $A_3$  frena la producció de mediadors proinflamatoris per part dels macròfags, com són el TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 i l'òxid nítric [183]. A més, l'estimulació dels receptors  $A_{2A}$  i  $A_{2B}$  incrementa la generació d'IL-10 i afavoreix el canvi de fenotip M1 a M2, afavorint les accions de tipus antiinflamatòries [183,184]. En les DCs madures, l'activació dels receptors  $A_{2A}$  disminueixen l'alliberament de citocines inflamatòries [185]. En canvi, el receptor  $A_{2B}$  afavoreix un fenotip proangiogènic i proinflamatori [186]. En els mastòcits, l'adenosina també juga aquesta dualitat, afavorint la desgranulació a través de l'estimulació dels receptors  $A_{2B}$  i amb efectes antiinflamatoris amb l'activació dels receptors  $A_{2A}$  [187]. Els enzims CD39 i CD73 estan altament expressats en la superfície de les Treg i juguen un paper crític per la seva activitat immunosupressora ja que permeten convertir els alts nivells de nucleòtids extracel·lulars en adenosina que actuarà sobre el receptor  $A_{2A}$  dels limfòcits efectors suprimint la seva funció [188]. En els limfòcits T, l'adenosina indueix l'expressió de les molècules coestimuladores negatives la proteïna 4 associada als limfòcits T citotòxics (CTLA-4, de l'anglès *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*) i la molècula de mort programada 1 (PD-1; de l'anglès *programmed death-1*), i suprimeix l'expressió de la molècula coestimuladora positiva CD40L [189]. Aquests canvis faciliten que els limfòcits T entrin en un estat d'anergia irreversible. A més, l'activació dels receptors  $A_{2A}$  regula a la baixa l'activació del complex NF- $\kappa$ B, reduint la secreció d'un gran nombre de citocines i quimiocines proinflamatòries per part dels limfòcits T [190].

Així doncs, el balanç entre els diferents elements del purinoma, tant d'ATP i adenosina extracel·lular, com de receptors i ectonucleotidases, són claus per aconseguir una resposta immunitària fisiològica i transitòria. Modificacions en el purinoma amb nivells de senyalització



aberrants de la via de l'ATP, conduirien en un estat inflamatori exacerbats descrits en patologies inflamatòries com la síndrome de l'intestí irritable [191]. Per una altra banda, una senyalització alterada de l'adenosina implicaria una immunosupressió prolongada, situació descrita en molts càncers, com el càncer d'endometri [192].

L'estudi de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis pot ser útil per determinar diferents mecanismes implicats en la patologia i en la desregulació del sistema immunitari detectada en les dones amb la malaltia.

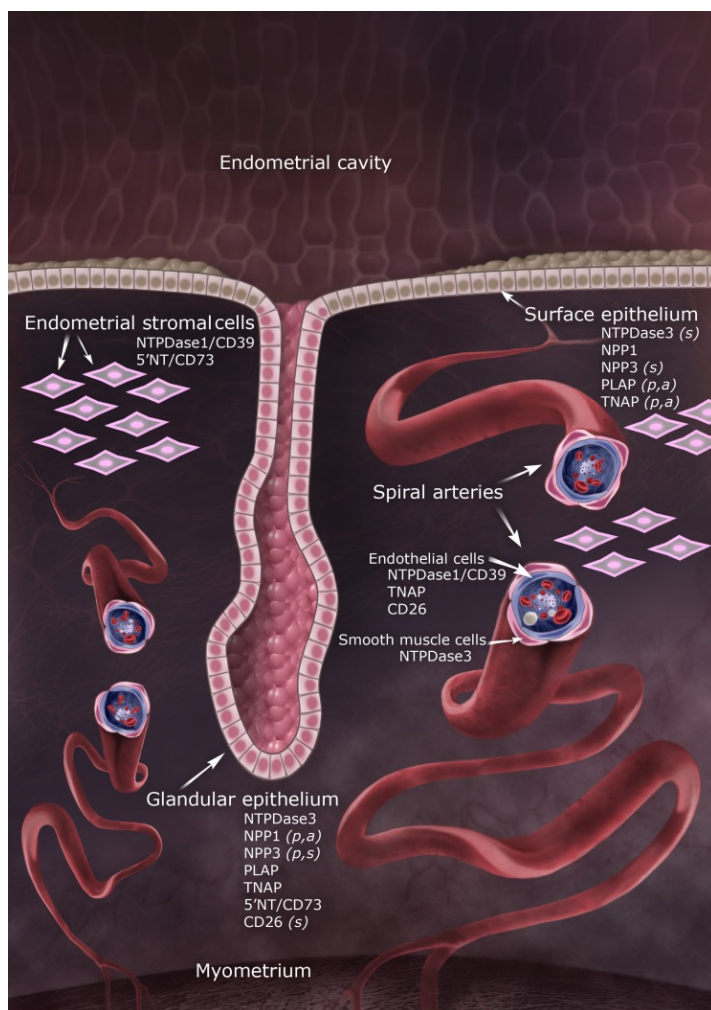
### 3.2. La senyalització purinèrgica en el teixit endometrial

A banda de les cèl·lules del sistema immunitari, la senyalització purinèrgica està àmpliament distribuïda en altres òrgans i sistemes, com són els òrgans reproductius femenins i masculins (revistat en [167]). En l'endometri, no s'han realitzat estudis que caracteritzin el purinoma completament. Una de les limitacions de l'estudi de la senyalització purinèrgica són les eines immunològiques disponibles en l'actualitat. En l'atles humà de proteïnes (*The Human Protein Atlas*) s'ha descrit la presència o absència de la majoria de receptors P2 en l'endometri, amb discrepàncies en els resultats en funció de l'anticòs utilitzat en el seu estudi per immunohistoquímica [193]. De manera orientativa, i sempre tenint en compte que pocs resultats coincideixen a l'utilitzar diferents anticossos, s'ha observat la presència dels receptors P2X3-7 en les cèl·lules endometrials epitelials, i els receptors P2X5 i P2X7 en algunes localitzacions específiques de l'estroma, concretament en la zona pròxima a l'epiteli luminal i en localitzacions perivasculars, respectivament [193]. Les cèl·lules mare mesenquimals endometrials (eMSCs; de l'anglès *endometrial mesenchymal stem cells*) s'han identificat amb una localització perivascular que podrien coincidir amb aquest marcatge [194]. De fet, en línies cel·lulars d'eMSCs, s'ha descrit la presència de P2X7 [195]. Els receptors P2Y<sub>1,2,11,12,14</sub> s'han observat en les cèl·lules epitelials endometrials, sense observar el seu marcatge en l'estroma [193]. No hi ha resultats sobre la presència dels receptors P1 en l'endometri [193].

Per intentar esclarir la presència del purinoma en l'endometri humà, el nostre grup va caracteritzar l'expressió d'un nombre representatiu d'ectonucleotidases en endometris cíclics i postmenopàusics [196]. En aquest estudi es va determinar que les ectonucleotidases eren enzims sensibles a les hormones sexuals, ja que la seva expressió fluctuava al llarg del cicle menstrual amb diferències després de la menopausa. Les ectonucleotidases NTPDase3, NPP1, NPP3, ALP, CD73 i l'enzim CD26 s'expressen en les cèl·lules epitelials endometrials, mentre que CD39 i CD73 s'expressen en les cèl·lules estromals endometrials [196]. En la **Figura 8** es representa aquesta distribució en els principals components de l'endometri durant el cicle menstrual i en els endometris atròfics.

Tot i les primeres evidències que relacionen la senyalització purinèrgica amb l'endometriosis, pocs estudis s'han realitzat per caracteritzar els diferents elements del purinoma en el teixit

endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis. S'ha descrit una expressió incrementada del receptor P2X3 en les cèl·lules epitelials endometrials eutòpiques i ectòpiques en comparació a l'expressió en l'epiteli endometrial de dones sense la malaltia, suggerint un increment en la cascada de senyalització originada per l'ATP [197]. Una reducció de més del 50 % en l'expressió dels hemicanals de connexina 43, implicats en l'alliberament de l'ATP, es va observar en l'estroma endometrial eutòpic de dones amb endometriosis en relació al teixit endometrial de dones sense la patologia [198]. En les lesions endometriòtiques, l'expressió d'aquests hemicanals es perd completament en l'estroma i s'expressen de manera aberrant en les cèl·lules endometrials epitelials [199]. Aquests resultats confirmen la implicació de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis i mostren la necessitat de caracteritzar l'expressió dels elements del purinoma en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic. Per aquest motiu, ens hem plantejat estudiar l'expressió i l'activitat de les ectonucleotidases en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis (veure **capítol 4**).



**Figura 8.** Representació de la distribució diferencial de les ectonucleotidases en l'epiteli luminal i glandular, en l'estroma i en les artèries espirals. Les lletres entre parèntesi fan referència al moment en el qual s'expressa l'ectoenzim, si no es fa cap referència, la seva expressió es manté en els diferents tipus d'endometri [proliferatiu (p), secretor (s) i atrofic (a)]. Imatge obtinguda d'Aliagas *et al.* (2013) [196].

### 3.3. La senyalització purinèrgica en el dolor associat a l'endometriosis

La senyalització purinèrgica participa en la generació i transmissió del dolor. Tot i les nombroses revisions sobre aquest tema, el paper de la senyalització purinèrgica en el dolor associat a l'endometriosis encara estava pendent de ser explorat. Durant la present tesi doctoral, la doctoranda ha realitzat una revisió bibliogràfica amb l'objectiu de destacar el paper del purinoma en la patogènesi i fisiopatologia del dolor en l'endometriosis, a més de valorar nous enfocaments farmacològics per al seu tractament. La revisió va ser publicada en la revista *International Journal of Molecular Sciences* (2020) (**Annex 2**) [166].

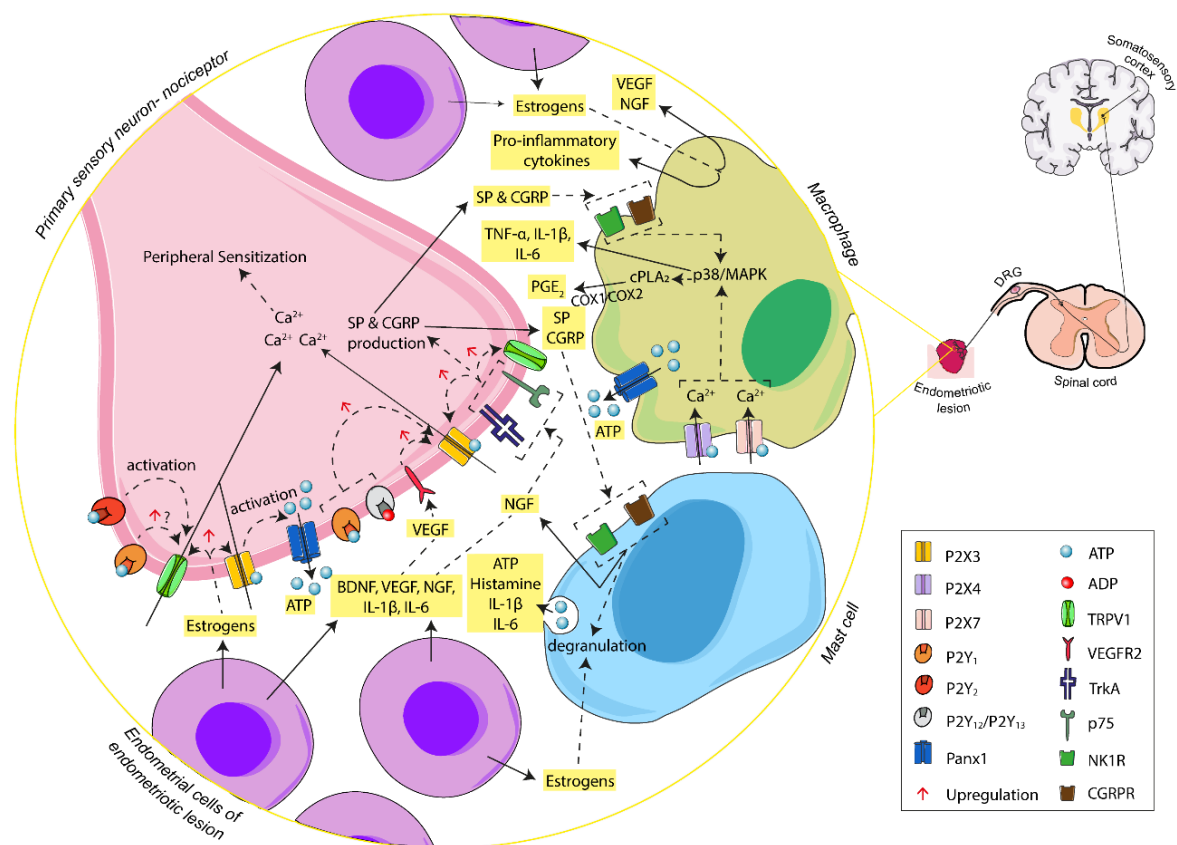
El dolor associat a l'endometriosis és complex i els mecanismes subjacents semblen estar relacionats amb l'activació del sistema nerviós perifèric, implicat en el dolor nociu (en resposta a un estímul nociu), inflamatori (a causa de danys als teixits i d'una resposta inflamatòria) i en el dolor neuropàtic (a causa d'una lesió del sistema nerviós somatosensorial), i del sistema nerviós central, relacionat amb la sensibilització i els processos d'hiperalgèsia [200,201]. La senyalització purinèrgica participa tant en els processos perifèrics com en els centrals dels diferents tipus de dolor associats a l'endometriosis, en els quals l'ATP sembla tenir un paper crític en la seva iniciació, amplificació i manteniment.

Les lesions endometriòtiques presenten fases cícliques de proliferació i destrucció similars a l'endometri. Durant el trencament de part de la lesió, alts nivells d'ATP seran alliberats en el microambient, que com hem vist, actuaran com a senyal de dany, amb la conseqüent activació del sistema immunitari, però també actuant sobre les terminacions nervioses sensorials de la lesió. A més a més, la reacció inflamatòria desencadenarà la secreció d'una gran quantitat de molècules que promouran un ambient neuroangiogènic aberrant, però també reduiran el llindar dels canals iònics de les fibres sensorials, incrementant l'excitabilitat de la seva membrana i l'expressió de receptors involucrats en l'algèsia, afavorint l'activació de la via de senyalització de dolor [202,203]. Per tant, l'ATP té el potencial de modificar la senyalització del dolor de manera directa activant els receptors P2 pre- i postsinàptics, però també amb el seu paper en la inflamació. Els receptors P2X estan involucrats en les respostes neurotransmissores a curt termini, i en canvi, els receptors P2Y en les respostes lentes i continuades de la via del dolor [159].

P2X3 és el principal receptor purinèrgic involucrat en el dolor associat a l'endometriosis. Es troba expressat en els terminals de les fibres nociuceptives i en les neurones sensorials del sistema nerviós central. Aquests receptors intervenen en el dolor neuropàtic i inflamatori, en processos aguts i crònics, i participen en els fenòmens d'hiperalgèsia i al·lodínia [204]. Les neurones sensorials que expressen els canals TRPV1 (de l'anglès *transient receptor potential vanilloid-1*) i/o els receptors P2X3, ambos regulats a l'alça per estrògens en l'endometriosis, són essencials per la iniciació i transducció de la senyalització del dolor [205]. De fet, s'ha demostrat una correlació positiva entre els nivells del receptor P2X3 en la lesió endometriòtica amb la intensitat del dolor en les pacients [197]. A més, s'ha descrit que l'activació del receptor P2X3 en les fibres

nervioses condueix a l'alliberament endogen d'ATP mitjançant els hemicanals de pannexina-1, desencadenant l'activació dels receptors P2 de les fibres nervioses sensorials [197]. Nivells persistents d'ATP extracel·lular amb la concomitant activació del receptor P2X3 s'han relacionat amb la inducció i manteniment de les primeres fases d'al·lodínia, una manifestació clínica del dolor crònic present en l'endometriosis [206,207]. A més, s'ha observat que en l'endometriosis es produeix una regulació a l'alça del receptor P2X3 per les molècules d'ATP i d'ADP, suggerint els receptors P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> i/o P2Y<sub>13</sub> com als possibles responsables [208]. Per una altra banda, els receptors P2Y<sub>1</sub> i P2Y<sub>2</sub> participen en l'activació dels canals TRPV1 dels nociceptors, amb implicacions en la hiperalgèsia i el dolor crònic inflamatori [208,209].

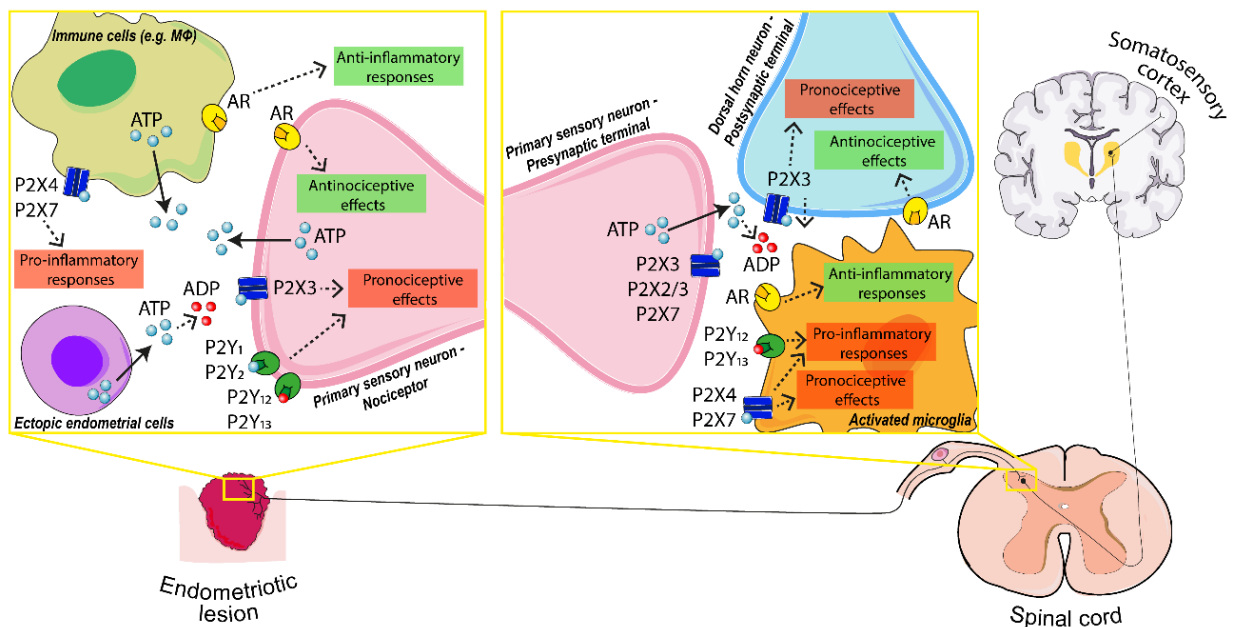
Com hem vist anteriorment, els receptors P2X4 i P2X7 són claus pel funcionament de les cèl·lules del sistema immunitari. Aquests receptors es converteixen en peces essencials per la interacció dels macròfags amb les fibres nervioses, promovent un estat persistent inflamatori i afavorint la cronificació del dolor [210]. Un recull de les diferents vies moleculars d'interacció entre les cèl·lules endometrials, les cèl·lules inflamatòries i les neurones sensorials perifèriques en els implants endometriòtics amb la participació de l'ATP s'han representat en la **Figura 9**.



estat inflamatori de les dones amb endometriosis. Abreviatures: Panx1: pannexina-1; BDNF: factor neurotròfic derivat del cervell (de l'anglès *brain-derived neurotrophic factor*); NGF: factor de creixement nerviós (de l'anglès *nerve growth factor*); TrkA: receptor de la quinasa A de la tropomiosina; p75: receptor de la neurotrofina p75; SP: substància P; NK1R: receptor de la neuroquinina 1; CGRP: pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina; cPLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A2 citosòlica; COX-1/COX-2: ciclooxigenasa-1 i -2; DRG: gangli de l'arrel dorsal/espinal (de l'anglès *dorsal root ganglia*). Imatge obtinguda de Trapero & Martín-Satué (2020) [166].

En la micròglia espinal activada, els receptors P2 de la superfície, on hi destaquen P2X4 i P2X7 però també hi participen els receptors P2Y<sub>12</sub> i P2Y<sub>13</sub>, estan implicats en el reclutament i activació d'aquestes cèl·lules amb un paper crític per desenvolupar i mantenir el dolor neuropàtic, principalment en la hiperalgèsia i al·lodínia, i la neuroinflamació [211-214].

El paper, sovint oposat, de l'adenosina i l'ATP també és un sistema compensatori en la via de senyalització del dolor (**Figura 10**). De fet, l'adenosina té efectes moduladors en les cèl·lules neuronals i gials amb implicacions en la transmissió del dolor. És per aquesta raó que s'ha proposat l'adenosina com a una potencial diana analgèsica pel dolor nociptiu, inflamatori i neuropàtic. Tot i això, determinar els efectes de l'adenosina en el dolor associat en l'endometriosis és complex, ja que experimentalment s'ha observat que l'adenosina pot produir efectes antinociptius i antiinflamatoris, però també efectes oposats, en funció del lloc d'acció, el receptor activat, l'abast de l'exposició i el context (revisat en [215]). De manera general però, es relaciona l'estimulació dels receptors A<sub>1</sub> i A<sub>3</sub> amb efectes analgèsics suficients per alleugerir el dolor nociptiu, neuropàtic i inflamatori, i els A<sub>2A</sub> com a diana per tractar el dolor crònic amb un origen neuroinflamatori [216].



**Figura 10.** Principals efectes de l'ATP i l'adenosina en el context de l'algèsia a nivell de la lesió endometriòtica i de la medulla espinal a través dels seus receptors en la superfície de cèl·lules neuronals i no neuronals. L'ATP està implicat en efectes nociptius i proinflamatoris, i l'adenosina, principalment, genera respostes oposades. Resum gràfic de Trapero & Martín-Satué (2020) (**Annex 2**) [166].

Sembla clar, doncs, que desenvolupar noves estratègies terapèutiques basades en la senyalització purinèrgica poden ser útils per tractar el dolor associat a l'endometriosis. És per això que es presenta la necessitat de caracteritzar el purinoma i la implicació de la senyalització purinèrgica en aquesta patologia.

### **3.4. La senyalització purinèrgica en la infertilitat associada a l'endometriosis**

La infertilitat és un dels principals signes característics de l'endometriosis. Un dels principals motius de la reducció de la fertilitat és per alteracions físiques o mecàniques generalment originades per la presència d'adhesions pelvianes. Aquestes modificacions poden perjudicar l'alliberament o recollida de l'oòcit, la motilitat dels espermatozoides, alterar les contraccions miometrials i afectar la fertilització i el transport embrional [217]. Per una altra banda, també s'ha determinat un ambient desfavorable per una funció reproductora òptima [218]. Estudis de fertilització *in vitro* en dones amb endometriosis en estat avançat han mostrat una pobra reserva ovàrica, una reduïda qualitat dels oòcits i els embrions, i una baixa implantació en les pacients [218]. Tot i la clara relació entre la malaltia i la infertilitat, definir els múltiples mecanismes causals implicats és complicat donat el fenotip heterogeni i variable que es presenta en l'endometriosis.

En aquest apartat, exposarem els diferents efectes de l'endometriosis en la infertilitat i intentarem relacionar-los amb el paper de la senyalització purinèrgica en la reproducció. Cal destacar però, que no hi ha cap estudi que hagi determinat una relació directa de la senyalització purinèrgica amb la infertilitat associada a l'endometriosis.

#### *Efectes en els gàmetes i l'embrió*

En l'endometriosis, s'ha observat una ovulació i producció d'oòcits alterada associada amb l'increment de les cèl·lules inflamatòries i dels mediadors proinflamatoris en el fluid peritoneal i en els endometriomes ovàrics [217]. Per tant, l'acció de l'ATP en la resposta immunitària pot influir en l'alteració de la funcionalitat ovàrica. Un exemple d'influència directa de l'ATP sobre els oòcits es va observar en l'estudi d'una forma familiar i esporàdica d'infertilitat femenina, que es va determinar com a canalopatia, on es produïa la mort de l'oòcit com a conseqüència de l'activació aberrant del canal de pannexina-1, conduint a un increment exacerbat dels nivells extracel·lulars d'ATP i la conseqüent mort de l'oòcit [219]. Així mateix, l'increment de cèl·lules inflamatòries i el medi "inflamatori/tòxic" en el fluid peritoneal de dones amb endometriosis moderada o greu ha mostrat inhibir la motilitat dels espermatozoides, compromentent la seva correcta funcionalitat [220]. En aquest sentit, l'ATP és una molècula crítica pel moviment dels espermatozoides [221]. A més, hi ha evidències que mostren la necessitat de l'ATP extracel·lular per produir-se la senyal inicial entre l'espermatozoide i l'oòcit en el procés de fecundació i per induir la reacció acrosòmica en els espermatozoides [222,223]. Per una altra banda, s'ha descrit



la participació de l'adenosina en la capacitació dels espermatozoides, mitjançant la regulació dels nivells intracel·lulars de cAMP (revisat en [224]).

L'ambient proinflamatori no només genera efectes tòxics en els gàmetes, sino que també afecta a la viabilitat de l'embrió. S'ha observat que el fluid peritoneal de dones amb endometriosis afavoreix la inhibició del desenvolupament embrional inicial de ratolins *in vitro*, generant canvis que, entre altres, incrementen els nivells d'ATP en els zigots en estadi de 2 i 4 cèl·lules [225]. En relació al desenvolupament de l'embrió, cal destacar que l'ATP i dels seus derivats tenen un paper important durant la embriogènesi i l'organogènesi (revisat en [168]).

Així doncs, una senyalització o hidròlisi aberrant de l'ATP extracel·lular pot estar implicada en la pèrdua de la qualitat dels gàmetes i les alteracions en el desenvolupament de l'embrió associades a l'endometriosis.

### *Efectes en el transport dels gàmetes i l'embrió al llarg de les trompes uterines*

El transport dels gàmetes i de l'embrió en l'endometriosis també es troba alterat per l'ambient inflamatori i els alts nivells de citocines i d'altres mediadors inflamatoris detectats en les dones amb endometriosis. La inflamació perjudica la funció de les trompes uterines i pot disminuir la seva motilitat [226].

L'ATP extracel·lular té una acció directa en el control del transport dels gàmetes i de l'embrió, ja que regula la freqüència de batuda cil·liar i la contracció del múscul llis de les trompes uterines [227]. A més, l'ATP controla la secreció d'ions per part de les cèl·lules epitelials de les trompes, determinant la composició del fluid luminal i creant unes condicions ambientals òptimes per la fecundació i la supervivència del zigot [228]. Per tant, modificacions en la senyalització purinèrgica poden repercutir en la funcionalitat de les trompes uterines i podrien participar en l'afectació de la fertilitat de les dones amb endometriosis.

### *Efectes en l'endometri i el miometri*

A més de les alteracions en la presència i funcionalitat de les cèl·lules del sistema immunitari en l'endometri eutòpic, canvis en l'expressió gènica i proteica de les cèl·lules endometrials eutòpiques també s'han relacionat amb una capacitat receptiva anòmala en les dones amb endometriosis (revisat en [229]). L'estudi de l'activitat peristàltica uterina ha mostrat canvis contràctils en les dones amb endometriosis [51,230]. Durant la fase proliferativa i a mitjans de la fase secretora es produeix una hiperactivitat peristàltica que afavoreix el transport de les restes menstruals a través de les trompes fins la cavitat pelviana, és a dir, afavoreix la menstruació retrògrada i el desenvolupament de l'endometriosis. En canvi, a finals de la fase proliferativa i inicis de la fase secretora es produeix una gran davallada de l'activitat peristàltica, amb contraccions arrítmiques i convulsives, que compromet el ràpid transport dels espermatozoides, i que per tant afecta a la fertilitat de les dones amb la patologia [230].

L'ATP extracel·lular té un important paper en les contraccions uterines; també permet la interacció entre el blastòcit i l'endometri, necessària per iniciar la decidualització i permetre la implantació, i participa en la composició del fluid uterí [231-233]. És per aquest motiu que modificacions en els nivells de l'ATP extracel·lular en l'endometri de dones amb endometriosis podrien desencadenar clares afectacions en la fertilitat i podrien ser les causants, com a mínim, de part de les alteracions detectades en les pacients amb endometriosis.

El paper de l'ATP extracel·lular en la resposta inflamatòria i la seva possible implicació en el desenvolupament de l'endometriosis, així com la seva participació en el dolor associat a l'endometriosis i en el funcionament correcte de l'aparell reproductor femení, situa a la senyalització purinèrgica, i especialment als receptors de l'ATP i de l'adenosina, com a possibles dianes terapèutiques pel tractament de l'endometriosis. Estudiar el paper de l'ATP extracel·lular i els seus derivats en les cèl·lules endometrials eutòpiques és essencial per elucidar la seva implicació en el desenvolupament i en la progressió la malaltia. En aquesta tesi doctoral s'ha establert i validat un protocol d'obtenció de cultius primaris d'estroma endometrial per poder realitzar futurs estudis que permetin l'estudi de la senyalització purinèrgica en un model cel·lular representatiu (veure **capítol 5**).



# OBJECTIUS

*"Don't be overwhelmed if your goal seems too big.*

*Focus on taking one small step at a time"*

Confunci



## **OBJECTIUS**

Com hem esmentat en la introducció, l'ATP i l'adenosina extracel·lulars són molècules de senyalització involucrades en nombrosos processos fisiològics i fisiopatològics. Cada vegada hi ha més evidències que relacionen la participació de la senyalització purinèrgica en els processos involucrats en el desenvolupament de l'endometriosis, i fins i tot, la seva intervenció en la manifestació de la malaltia. És per això que l'estudi dels elements del purinoma és essencial per elucidar la contribució de la senyalització purinèrgica en aquesta patologia. En la present tesi ens hem focalitzat en l'estudi particular de les ectonucleotidases, els elements reguladors de les concentracions extracel·lulars dels nucleòtids i l'adenosina.

La nostra **hipòtesi és que la senyalització purinèrgica juga un paper en l'endometriosis i que l'expressió diferencial de les ectonucleotidases pot utilitzar-se com un nou biomarcador** de la malaltia amb una utilitat en el disseny de noves estratègies diagnòstiques i terapèutiques, imprescindibles per una millor gestió de la malaltia i per millorar la qualitat de vida de les dones que la pateixen.

L'**objectiu principal** d'aquesta tesi és conèixer el paper de la senyalització purinèrgica, en particular de les ectonucleotidases, en l'endometriosis, per tal d'augmentar el coneixement sobre la fisiopatologia d'aquesta malaltia i determinar-ne possibles biomarcadors d'us diagnòstic i/o terapèutic.

Estudis previs del nostre grup havien identificat un increment de l'activitat nucleotidasa en el fluid contingut en endometriomes ovàrics respecte a quists ovàrics simples, donant suport a aquesta hipòtesi [234]. Com a objectiu d'aquesta tesi ens vam plantejar identificar les proteïnes responsables d'aquesta activitat en els endometriomes.

D'altra banda, era fonamental conèixer l'expressió tissular de les ectonucleotidases en el endometri de dones sense cap patologia endometrial. Previ a la tesi, el nostre grup havia fet una caracterització extensa de les ectonucleotidases en l'endometri, però no completa per la manca, en aquell moment, d'eines moleculars. Entre les diferents ectonucleotidases sense caracteritzar a l'endometri no patològic, hi destacava un ectoenzim molt rellevant per la seva activitat ATPasa, l'NTPDasa2. Per tant, aquesta caracterització va ser un objectiu d'aquesta tesi.

A més, per dur a terme l'objectiu principal era necessari millorar les eines d'estudi de les ectonucleotidases, tant a nivell de teixit com de cultius cel·lulars, objectiu metodològic també inclòs en aquesta tesi.

Els objectius específics d'aquesta tesi doctoral són:

- 1) **Identificar possibles candidats a biomarcadors** de l'endometriosis en el **fluid contingut en endometriomes** (capítol 1).
- 2) Optimitzar la **tècnica de detecció de les ectonucleotidases a teixit** (capítol 2).

- 3) **Estudiar l'expressió de l'NTPDasa2** en endometris no patològics (capítol 3).
- 4) **Caracteritzar l'expressió de les ectonucleotidases** en el **teixit endometrial eutòpic i ectòpic** de dones amb endometriosis (capítol 4).
- 5) **Establir el mètode d'obtenció i manteniment dels cultius primaris d'estroma endometrial i validar-ne el seu ús per a l'estudi de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis** (capítol 5).

# RESULTATS

*"Somewhere, something incredible is waiting to be known."*

Carl Sagan



## **RESULTATS**

Els resultats d'aquesta tesi s'organitzen en cinc capítols. El **capítol 1** recull l'article publicat de l'estudi realitzat en el fluid contingut en els endometriomes. El **capítol 2** correspon a l'article publicat amb una nova metodologia per a la detecció simultània en teixit humà de la proteïna i la seva activitat enzimàtica. En el **capítol 3** es presenta la publicació amb la caracterització de l'NTPDasa2 en l'endometri cíclic i postmenstrual de dones sense patologia endometrial. El **capítol 4** conté l'article on s'examina l'expressió i l'activitat d'un nombre representatiu d'ectonucleotidases en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis. Finalment, en el **capítol 5**, no publicat, recull l'obtenció de cultius primaris d'estroma endometrial com a model d'estudi de l'endometriosis.

### **CAPÍTOL 1: Anàlisi de l'ADA, l'ALP, l'ENPP1 i l'ENPP3 en el fluid contingut en els endometriomes com a biomarcadors candidats per l'endometriosis**

**Analysis of the ectoenzymes ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3, in the contents of ovarian endometriomas as candidate biomarkers of endometriosis.** Trapero C, Jover L, Fernandez-Montoli ME, Garcia-Tejedor A, Vidal A, Gomez de Aranda I, Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. *Am J Reprod Immunol.* **2018**;79(2). doi: 10.1111/aji.12794

El factor d'impacte i quartil de la revista de publicació és: 3.091 i Q1 (JCR2018).

### **CAPÍTOL 2: Caracterització de les ectonucleotidases en trompes uterines humanes amb un enfocament millorat que identifica simultàniament l'expressió proteica i l'activitat enzimàtica *in situ***

**Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and *in situ* enzyme activity.** Villamonte ML, Torrejon-Escribano B, Rodriguez-Martinez A, Trapero C, Vidal A, Gomez de Aranda I, Sevigny J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. *Histochem Cell Biol.* **2018**;149(3):269–276. doi: 10.1007/s00418-017-1627-8 (Epub **2017**)

El factor d'impacte i quartil de la revista de publicació és: 2.164 i Q1 (JCR2017).

### **CAPÍTOL 3: L'NTPDasa2 en l'endometri humà: nou marcador d'estroma basal i de cèl·lules mare mesenquimals**

**The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: A novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells.** Trapero C, Vidal A, Rodriguez-Martinez A, Sevigny J, Ponce J, Coroleu B, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. *Purinergic Signal.* **2019**;15(2):225–236. doi: 10.1007/s11302-019-09656-3

El factor d'impacte i quartil de la revista de publicació és: 3.065 i Q2 (JCR2019).

**CAPÍTOL 4: L'expressió aberrant de les ectonucleotidases en teixit endometrial ectòpic i eutòpic està a favor de l'acumulació d'ATP en el microambient tissular en l'endometriosis**

**Impaired Expression of Ectonucleotidases in Ectopic and Eutopic Endometrial Tissue Is in Favor of ATP Accumulation in the Tissue Microenvironment in Endometriosis.** Trapero C, Vidal A, Fernandez-Montoli ME, Coroleu B, Tresserra F, Barri P, Gomez de Aranda I, Sevigny J, Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. *Int J Mol Sci.* **2019**;20(22):5532. doi: 10.3390/ijms20225532

El factor d'impacte i quartil de la revista de publicació és: 4.556 i Q1 (JCR2019).

**CAPÍTOL 5: Els cultius cel·lulars primaris d'estroma endometrial com a eina d'estudi de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis**

Publicacions que ha realitzat la doctoranda durant la present tesi doctoral però de la qual no en formen part implícitament:

**ANNEX 1. Capítol de llibre: In Situ Identification of Ectoenzymes Involved in the Hydrolysis of Extracellular Nucleotides.** Martín-Satué M, Rodríguez-Martínez A, Trapero C. En: Charles F. Streckfus, editor. *Immunohistochemistry- The Ageless Biotechnology*. London: IntechOpen; 2019. doi: 10.5772/intechopen.84495

**ANNEX 2. Revisió: Purinergic Signaling in Endometriosis-Associated Pain.** Trapero C, Martín-Satué M. *Int J Mol Sci.* **2020**; 21(22):8512. doi: 10.3390/ijms21228512

El factor d'impacte i quartil de la revista de publicació és: 4.556 i Q1 (JCR2019).

**ANNEX 3. Article d'investigació: Characterization of the Endometrial MSC Marker Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) in Low- and High-Grade Endometrial Carcinomas: Loss of Stromal Expression in the Invasive Phenotypes.** Rodríguez-Martínez A \*, Trapero C\*, Vidal A, Piulats JM, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Fernández-Montolí ME, Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. *J Pers Med.* **2021**; 11(5):331. doi: 10.3390/jpm11050331

(\* Coautoria)

El factor d'impacte i quartil de la revista de publicació és: 4.433 i Q1 (JCR2019).



## **CAPÍTOL 1**

### **Anàlisi de l'ADA, l'ALP, l'NPP1 i l'NPP3 en el fluid contingut en els endometriomes com a biomarcadors candidats per l'endometriosi**

**Analysis of the ectoenzymes ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3, in the contents of ovarian  
endometriomas as candidate biomarkers of endometriosis**

Trapero C, Jover L, Fernandez-Montoli ME, Garcia-Tejedor A, Vidal A, Gomez de Aranda I,  
Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M

**American Journal of Reproductive Immunology. 2018;79(2).**



El diagnòstic de l'endometriosi és un dels principals obstacles de la malaltia, ja que sol trigar entre 7 i 11 anys des dels primers símptomes fins aconseguir el diagnòstic definitiu. Aquest retràs s'associa, entre altres, a la manca de tests diagnòstics no invasius i es presenta la necessitat de trobar biomarcadors que permetin la detecció de la malaltia.

Una de les formes més freqüents d'endometriosi són els endometriomes ovàrics. Els endometriomes són quists ovàrics formats per teixit endometrial, continguts per un fluid derivat de la sang amb presència de debris menstrual. Una tècnica d'intervenció quirúrgica poc invasiva, en comparació a la habitual excisió per laparoscòpia, és l'aspiració guiada per ecografia seguida de l'esclerosi del teixit.

Actualment, el fluid contingut en els endometriomes i obtingut mitjançant aspiració és de rebuig. Tot i això, hi ha antecedents que posen en evidència que l'estudi d'aquest fluid pot ser molt informatiu. El nostre grup, havia realitzat un estudi comparatiu de l'activitat nucleotidasa en el fluid contingut en els endometriomes i els quists simples ovàrics determinant un increment en l'activitat en els endometriomes [234]. L'objectiu de l'estudi inclòs en aquest capítol ha estat determinar els nivells de les ectonucleotidases ALP, NPP1 i NPP3, i de l'ectoenzim ADA en el contingut aspirat d'endometriomes i quists ovàrics simples i avaluar-ne el seu potencial com a candidats a biomarcadors per l'endometriosi.

Les principals troballes d'aquest estudi són:

- 1) **La composició del fluid contingut en els endometriomes és d'utilitat per la selecció de candidats a biomarcadors per l'endometriosi.**
- 2) **L'ADA i l'NPP1 són molècules candidates a biomarcadors per la detecció de l'endometriosi.** S'han trobat nivells de l'ADA i de l'NPP1 significativament incrementats en el fluid contingut en els endometriomes respecte al contingut dels quists ovàrics simples (veure **capítol 1, Taula 2**). Aquesta diferència és notablement destacada en els valors de l'ADA, on els nivells són més de 100 vegades superiors en el contingut dels endometriomes que detectats en els quist ovàrics simples.

Amb aquestes troballes es posa en manifest la necessitat de l'estudi dels nivells de l'ADA i l'NPP1 en sang perifèrica de dones amb endometriosi per determinar la seva utilitat com a biomarcador no invasiu de la malaltia i el valor informatiu de la composició del fluid dels endometriomes, actualment considerat de rebuig. A més, aquests resultats emfatitzen la necessitat de l'estudi del paper de la senyalització purinèrgica, concretament de les ectonucleotidases, en l'endometriosi.

Aquest estudi s'ha publicat a la revista [American Journal of Reproductive Immunology 2018;79\(2\). doi: 10.1111/aji.12794](#), i no ha estat utilitzat per a la realització de cap altre tesi doctoral. La doctoranda ha participat en la realització dels experiments, la discussió dels resultats i l'escriptura de l'article.



# Analysis of the ectoenzymes ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3, in the contents of ovarian endometriomas as candidate biomarkers of endometriosis

Carla Trapero<sup>1,2</sup> | Lluís Jover<sup>3</sup> | Maria Eulàlia Fernández-Montolí<sup>2,4</sup> |  
 Amparo García-Tejedor<sup>2,4</sup> | August Vidal<sup>1,2,5</sup> | Inmaculada Gómez de Aranda<sup>1</sup> |  
 Jordi Ponce<sup>2,4</sup> | Xavier Matias-Guiu<sup>2,5</sup> | Mireia Martín-Satué<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Department de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Oncobell Program, CIBERONC, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Department de Fonaments Clínics, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Servei de Ginecologia, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

## Correspondence

Mireia Martín-Satué, Department de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.  
 Email: martinsatue@ub.edu

## Funding information

Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: FIS PI15/00036; FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-"a Way to Build Europe"; Fundación Merck Salud (Ayuda Merck de Investigación 2016-Fertilidad)

**Problem:** The diagnosis of endometriosis, a prevalent chronic disease with a strong inflammatory component, is usually delayed due to the lack of noninvasive diagnostic tests. Purinergic signaling, a key cell pathway, is altered in many inflammatory disorders. The aim of the present work was to evaluate the levels of adenosine deaminase (ADA), alkaline phosphatase (ALP), ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1), and ENPP3, elements of purinergic signaling, as biomarker candidates for endometriosis.

**Method of study:** A case-control comparative study was conducted to determine ADA, ALP, ENPP1 and ENPP3 levels in echo-guided aspirated fluids of endometriomas (case group) and simple ovarian cysts (control group) using the ELISA technique.

**Results:** Adenosine deaminase, ALP, ENPP1, and ENPP3 were present and quantifiable in the contents of endometriomas and simple cysts. There were significant differences in ADA and ENPP1 levels in endometriomas in comparison with simple cysts (2787 U/L and 103.9 ng/mL more in endometriomas, for ADA and ENPP1, respectively). Comparisons of ALP and ENPP3 levels between the two groups did not reveal significant differences.

**Conclusion:** The ectoenzymes ADA and ENPP1 are biomarker candidates for endometriosis.

## KEYWORDS

adenosine, adenosine triphosphate, endometrioma, endometriosis, purinergic signaling

## 1 | INTRODUCTION

Endometriosis is a chronic disease characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity and secondary inflammatory reaction. It can appear as peritoneal lesions, ovarian cysts called ovarian endometriomas, and deeply infiltrative lesions. It is a debilitating disorder affecting around 10% of women of reproductive age and its prevalence is rising.<sup>1</sup> Signs and symptoms vary widely, but the most

common are infertility and pelvic pain. In fact, it is one of the main causes of infertility in women.<sup>2</sup>

The diagnosis of this disorder is typically delayed from the onset of symptoms by 7-11 years on average.<sup>2</sup> Late diagnosis is one of the principal problems of this disease. It is promoted by the lack of a noninvasive diagnostic test. At present, several studies are attempting to find biomarkers for use in clinical practice to overcome this obstacle.

**TABLE 1** Descriptive statistics of patients and samples of the two groups

	Age (y)	Size (mm)
Simple cyst (n = 47)		
Mean (SD)	50.0 (17.3)	74.3 (22.7)
Range	18-83	28-150
Endometrioma (n = 19)		
Mean (SD)	35.6 (4.8)	64.6 (14.2)
Range	28-45	35-90

SD, standard deviation. The size represents the largest cystic diameter measured on ultrasound.

Ovarian endometriomas are ovarian cysts consisting of endometrial tissue; they contain fluid blood derived with accumulation of menstrual debris. They are present in 17%-44% of women affected by endometriosis.<sup>3</sup> Although the level of risk of malignant transformation is controversial, there is evidence of a direct relationship between ovarian endometriosis and ovarian cancer.<sup>4</sup> Laparoscopic cystectomy is the most widely used technique to excise ovarian endometriomas, although there are associated surgical risks. Nowadays, there is a new minimally invasive interventional technique to treat ovarian cysts, ultrasound-guided aspiration followed by sclerosis, which seems to yield a low recurrence risk and better preservation of ovarian reserves.<sup>5-7</sup>

Currently, the content of ovarian endometriomas is seen as a waste fluid. The analysis of this fluid can help to identify new biomarkers for endometriosis and to elucidate the underlying molecular mechanism of endometriosis. For example, endometriotic cysts contain significantly more iron than other ovarian cysts; this has been suggested as a possible cause of carcinogenesis in endometriomas through iron-induced persistent oxidative stress.<sup>8</sup>

As revealed by previous studies, inflammation plays a crucial role in endometriosis pathophysiology and in the endometriotic cell establishment.<sup>9-14</sup> Purinergic signaling, the group of biological effects mediated by extracellular nucleotides as adenosine triphosphate (ATP) and nucleosides such as adenosine through specific receptors, plays an important role in a wide range of inflammatory conditions and inflammatory diseases.<sup>15</sup> ATP is mostly a pro-inflammatory molecule released during tissue stress conditions, such as necrosis, hypoxia, and inflammation. ATP is rapidly hydrolyzed by ecto-nucleotidases, alone or acting sequentially, into adenosine, which has mainly anti-inflammatory effects, protecting cells and tissues from excessive inflammation and immune-mediated damage.<sup>16</sup> Ecto-nucleotidases are specialized membrane enzymes, present in many different cellular types, which are divided into 4 families: (i) ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (ENTPDase or CD39) that hydrolyzes extracellular ATP or adenosine diphosphate (ADP) to adenosine monophosphate (AMP), (ii) ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family (ENPP) that converts ATP to AMP and inorganic pyrophosphate (PPI), (iii) ecto-5'-nucleotidase family that has only one member, ecto-5'-nucleotidase, known as CD73, that hydrolyzes AMP to adenosine, and (iv) alkaline phosphatase family (ALP) that has broad substrate

specificity, being able to hydrolyze adenosine nucleotides and pyrophosphate, releasing inorganic phosphate (Pi).<sup>17,18</sup> Extracellular adenosine levels are regulated by the ectoenzyme adenosine deaminase (ADA), which can be expressed as a soluble form or as membrane-associated enzyme-forming complexes with CD26/dipeptidyl peptidase IV. ADA catalyzes the adenosine deamination, yielding inosine.<sup>18</sup> Changes in any of these elements alter the balance between ATP and adenosine extracellular levels. Therefore, it can modify the immune response and the inflammatory state. In a previous study, we demonstrated that the contents of endometriomas have greater ecto-nucleotidase activity and CD39 and CD73 protein expression compared with simple cysts; this would contribute to the maintenance of the suppression of local immune responses, basic to the establishment and progression of endometriotic lesions.<sup>10</sup>

In this study, we aimed to determine whether ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3 were present and quantifiable in the ultrasound-guided aspirated contents of ovarian cysts and whether the levels of these ectoenzymes were altered in endometriotic cysts compared with simple ovarian cysts, thereby affecting the inflammatory condition of endometriosis. Our goal was to evaluate the potential role of ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3 as biomarker candidates for endometriosis and to add up the knowledge of pathogenesis and pathophysiology of endometriosis.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Samples

The ethical principles of this study adhere to the Helsinki Declaration, and all the procedures were approved by the ethics committee for clinical investigation of Bellvitge Hospital. Patients with adnexal cysts with a low risk of malignancy from the Gynecology Service of Bellvitge Hospital (Barcelona, Spain) between March 2013 and September 2016 were recruited for the study. A total of 68 women, including 19 bearing endometriomas and 47 bearing ovarian simple cysts, who meet the inclusion criteria were included in this study.

Inclusion criteria in the study for patients were: (i) age > 18 years old, (ii) ultrasound features predictive of a ovarian low risk of cyst malignancy: smooth walls, no solid component, maximum diameter between 25 and 150 mm, no more than one septation (<2-3 mm), and no internal flow on color Doppler imaging in the case of bilateral cysts, according to IOTA criteria,<sup>19</sup> (iii) cyst persistence from diagnosis  $\geq 6$  months, (iv) tumour marker CA 125 < 200 IU/mL and CA 19.9 < 35 IU/mL, and (v) written informed consent from the patients.

For ultrasound-guided aspiration, following disinfection of the abdomen or the vagina, a sterilized 17-G spinal needle (BD Medical Franklin Lakes, NJ Becton, Dickinson and Company) was aimed at the center of the cyst under direct ultrasound guidance, and the contents were aspirated. Then, several intracyst saline washes were performed until clearance, followed by the instillation of ethanol as a sclerosing agent. The ethanol volume instilled was equal to two-thirds of the volume aspirated from the ovarian cyst and always less than 100 mL. Ethanol was left inside the cyst for 15 minutes and then removed, and

it was then washed out again with the saline solution. The intracystic fluids were analyzed cytologically at the Pathology Service of Bellvitge Hospital to confirm the absence of atypical cells.

Patients were divided into two groups following the ultrasound features and internal color fluid: (i) the endometriomas group with homogeneous appearance involving diffuse internal echoes on a hypochoic background and containing blood color fluid, and (ii) the simple cysts group that with an anechoic structure and containing clear serous fluid. Table 1 presents the descriptive statistics of the two groups of patients, including the age, and size and volume of the cysts.

Endometriomas and simple cyst fluids were aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

## 2.2 | Detection of ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3 Concentrations by double-antibody sandwich ELISA

Before the immunoassays, the samples were centrifuged at  $1000\times g$  for 15 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  to remove cells and cell debris, and the supernatants were transferred to sterile tubes. The ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3 concentrations in endometriomas and simple cyst fluid samples were determined using commercial double-antibody sandwich ELISA kits (human adenosine deaminase (ADA) ELISA Kit, CUSABIO, College Park, MD, USA; human ALP (alkaline phosphatase) ELISA Kit, Elabscience Biotechnology Co., Hubei, China; ELISA Kit for ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1), Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA; human ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 (ENPP3) ELISA Kit, CUSABIO) following the manufacturers' instructions. Each standard was serially diluted, and the standard curves were established according to the manufacturers' instructions.

## 2.3 | Statistical methods

Protein levels were calculated generating a four-parameter logistic (4-PL) curve fit by the professional soft Curve Expert 1.4 (Daniel

Hyams) following the manufacturers' specifications. The determinations below the lowest protein concentration that could be quantified and differentiated from zero, or lower limit of quantification (LLQ), were considered as half of the LLQ of the ELISA kit. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics v22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Because the asymmetric data distribution in the two groups was being compared (endometrioma vs simple cyst), Mann-Whitney U test was used to compare data distribution of the groups. Hodges-Lehman procedure was used to estimate the differences between medians of both groups and their 95% confidence interval.

## 3 | RESULTS

Ectoenzymes ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3 were present and quantifiable in the aspirated fluids of both endometriomas and simple ovarian cysts. The concentrations and differences between the two groups are shown in Table 2. The comparison of ADA and ENPP1 concentrations for the two groups showed significant differences. ADA was detected in higher levels in endometrioma fluids as compared to simple cyst fluids (Mann-Whitney U test = 881.0,  $P < .001$ ). The difference between medians of ADA was estimated to be 2787 U/L more in the contents of endometriomas (95% CI: 2198-3039). ENPP1 levels were also higher in endometrioma fluids (Mann-Whitney U test = 645.5,  $P < .001$ ). ENPP1 concentration was estimated to be 103.9 ng/mL higher in endometrioma fluids than simple ovarian cysts (95% CI: 55.0-163.7). Comparisons of ALP and ENPP3 levels between simple cysts and endometriomas were not significant (Mann-Whitney U test = 452.0,  $P = .94$  and Mann-Whitney U test = 85.0,  $P = .71$ , respectively).

## 4 | DISCUSSION

Late diagnosis is an important problem in endometriosis.<sup>2</sup> Recently, many studies of endometriosis biomarkers have been made, but not

**TABLE 2** Comparison of ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3 levels between contents of ovarian endometriomas and simple ovarian cysts aspirates

Protein	Group	N	Number below LLQ	Median <sup>a</sup>	IQR	Minimum	Maximum	P-value <sup>b</sup>
ADA	Simple cysts	47	13	22.31	168.16	0.78 <sup>c</sup>	1319.79	<.001
	Endometriomas	19	0	2864.56	1940.86	201.45	5577.40	
ALP	Simple cysts	47	0	7988.64	28941.62	458.52	61263.30	.94
	Endometriomas	19	0	12367.36	16110.71	394.11	35978.48	
ENPP1	Simple cysts	42	5	9.87	97.55	0.08 <sup>c</sup>	397.61	<.001
	Endometriomas	19	1	172.48	127.80	0.08 <sup>c</sup>	278.55	
ENPP3	Simple cysts	36	12	0.11	0.02	0.08 <sup>c</sup>	0.17	.71
	Endometriomas	17	4	0.11	0.01	0.08 <sup>c</sup>	0.12	

<sup>a</sup>The concentrations of ADA are expressed in U/L and the concentrations of ALP, ENPP1, and ENPP3 are expressed in ng/mL.

<sup>b</sup>Mann-Whitney U test.

<sup>c</sup>The determinations below the LLQ were considered as half of the LLQ of the ELISA kit.

IQR, interquartile range; LLQ, lower limit of quantification; ADA, adenosine deaminase; ALP, alkaline phosphatase; ENPP1, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1; ENPP3, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3.

a single biomarker or combination of biomarkers has been validated for a noninvasive diagnostic test with sufficient sensitivity and specificity.<sup>2,11,20</sup> Blood, urine, and endometrial fluid are the main samples used in order to identify peripheral biomarkers for this pathology.<sup>18</sup> However, follicular fluid has also been validated as a reliable biological fluid to study biomarkers and to discover the underlying causes of the disease.<sup>10,11,21</sup>

In the present study, we determined the presence and levels of different ectoenzymes in ovarian endometriomas in comparison with simple ovarian cysts, with the purpose of identifying biomarker candidates for endometriosis. ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3 were present and quantifiable in the aspirated fluid of both endometriomas and simple cysts. Despite the large quantity of fluid contained in the majority of ovarian cysts, one limitation of this study was the sample volume needed to perform all the assays and replicas. For this reason, the statistical analyses of the ENPP1 and ENPP3 levels were performed with a lower number of samples. The samples analyzed were, however, sufficient to be able to draw conclusions.

We had previously quantified ecto-nucleotidase activity in the same kind of samples.<sup>10</sup> We found that the ecto-nucleotidase activity was significantly increased in the contents of ovarian endometriomas compared with simple cysts.<sup>10</sup> Coinciding with these findings, we showed significantly higher levels of ENPP1 in endometriomas than in simple cysts. The increased levels of ENPP1 contribute to the accumulation of extracellular adenosine. In this sense, it would be involved in avoiding immune clearance by endometriotic cells and the inhibition of local immune responses necessary for the formation and progression of the endometriotic lesions. Although transmembrane ENPP1 is the most relevant form of ENPP1 in terms of purinergic signaling, a soluble form of the enzyme has been described.<sup>18</sup> In addition, ENPP1 is also found in human serum.<sup>18</sup> On this basis, we propose studying its presence in peripheral blood of women with endometriosis in order to evaluate its possible use as a biomarker for endometriosis.

Our most notable result is the significantly increased levels of ADA in ovarian endometriomas. In endometriosis, inflammatory processes are increased as a result of the pathological state.<sup>9-14</sup> ADA activity is involved in recovering and maintaining local homeostasis. ADA might be increased in an attempt to maintain the clearance of the high levels of adenosine produced by a persistent inflammatory microenvironment and the increased activity of ecto-nucleotidases.<sup>10</sup> Several studies have shown the clinical use of ADA levels as a diagnostic and/or prognostic marker in various diseases with an important inflammatory component such as oral squamous cell carcinoma,<sup>22</sup> chronic lymphocytic leukemia,<sup>23</sup> tuberculosis,<sup>24</sup> common chronic ears, nose and throat infections,<sup>25</sup> Chagas disease,<sup>26</sup> and leishmaniasis.<sup>27</sup> The great difference in ADA levels between ovarian endometriomas and simple cysts found here suggests that ADA can also be a good biomarker for endometriosis. The contents of endometriomas are fluids derived from blood.<sup>28</sup> For this reason, alterations in blood ADA activity in women with endometriosis may be detected. Future work should be directed toward quantifying the activity of ADA in

serum of women with endometriosis to find the diagnostic value of ADA in this pathology.

Concerning ALP levels, there are no significant differences between endometrioma and simple cyst contents. ALP is an enzyme routinely tested in blood for its diagnostic value in liver and bone diseases. Furthermore, according to previous studies, high ALP levels have been related with a worse prognosis in some malignancies.<sup>29</sup> Despite its role as a biomarker in several diseases, our results show a large concentration of ALP in both types of aspirates without differences between them. For this reason, ALP may be excluded as candidate for diagnosis of endometriosis.

Finally, ENPP3 is well studied in relation to the field of allergy. It is employed as a marker for clinical diagnosis of allergic diseases.<sup>30</sup> In endometrium, ENPP3 is expressed at the cell surface of luminal and glandular epithelium.<sup>31</sup> We detected very low levels of ENPP3 in both ovarian endometrioma and simple cyst contents coinciding with the fact that a soluble ENPP3 isoform has not been described. Moreover, there are no differences of ENPP3 levels between the two groups. Although our results show that ENPP3 is not useful as an endometriosis biomarker for diagnosis, considering its expression in endometrium, we cannot rule out a role in the pathogenesis and progression of the disease.

In conclusion, this study emphasizes the utility of analyzing the composition of endometrioma contents, a waste fluid, for the selection of biomarker candidates for the diagnosis of endometriosis. Furthermore, our results show that ADA and ENPP1 are biomarker candidates for endometriosis. Future studies are necessary to compare their levels in blood samples of women with endometriosis and women without this pathology. In addition, the diagnostic values of ADA and ENPP1 have to be determined in order to assess whether they are peripheral biomarkers useful for a noninvasive diagnosis of endometriosis. Moreover, this new data reinforce the growing evidence linking purinergic signaling and endometriosis and add up to the knowledge about the pathophysiology of endometriosis, which is essential in the development of new diagnostic methods and effective treatments.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the *Instituto de Salud Carlos III (FIS PI15/00036)*, co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-"a Way to Build Europe"-//FONDOS FEDER "una manera de hacer Europa," and a grant from the *Fundación Merck Salud (Ayuda Merck de Investigación 2016-Fertilidad)*. We are grateful for the technical support of Serveis Científics i Tecnològics (Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona) and the Tumour Bank of Hospital Universitari de Bellvitge (IDIBELL's Biobank, PT17/0015/0024). The authors thank Tom Yohannan for language editing.

## ORCID

Mireia Martín-Satué  <http://orcid.org/0000-0002-9718-4664>



## REFERENCES

1. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertil Steril*. 2012;98:511-519.
2. Fassbender A, Burney RO, Dorien FO, D'Hooghe T, Giudice L. Update on biomarkers for the detection of endometriosis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:130854.
3. Redwine DB. Ovarian endometriosis: a marker for more extensive pelvic and intestinal disease. *Fertil Steril*. 1999;72:310-315.
4. Brillhante AV, Augusto KL, Portela MC, et al. Endometriosis and ovarian cancer: an integrative review (Endometriosis and Ovarian Cancer). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18:11-16.
5. Yazbeck C, Madelenat P, Ayel JP, et al. Ethanol sclerotherapy: a treatment option for ovarian endometriomas before ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:121-125.
6. Gatta G, Parlato V, Di Grezia G, et al. Ultrasound-guided aspiration and ethanol sclerotherapy for treating endometrial cysts. *Radiol Med*. 2010;115:1330-1339.
7. García-Tejedor A, Castellarnau M, Ponce J, Fernández ME, Burdio F. Ethanol sclerotherapy of ovarian endometrioma: a safe and effective minimal invasive procedure. Preliminary results. *Eur J Obstet Gynecol. Reprod Biol*. 2015;187:25-29.
8. Yamaguchi K, Mandai M, Toyokuni S, et al. Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res*. 2008;14:32-40.
9. Olovsson M. Immunological aspects of endometriosis: an update. *Am J Reprod Immunol*. 2011;66(Suppl 1):101-104.
10. Texidó L, Romero C, Vidal A, et al. Ecto-nucleotidases activities in the contents of ovarian endometriomas: potential biomarkers of endometriosis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:120673.
11. Gupta S, Harlev A, Agarwal A. *Endometriosis A Comprehensive Update*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2015:7, p. 79.
12. Nothnick W, Alali Z. Recent advances in the understanding of endometriosis: the role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. *F1000Res*. 2016;5:186.
13. Sikora J, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation-The role of IL-8 in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2017;77:e12622.
14. Oh YK, Ha YR, Yi KW, et al. Increased expression of resistin in ectopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2017;78:e12726.
15. Sévigny J, Martín-Satué M, Pintor J. Purinergic signalling in immune system regulation in Health and disease. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:106863.
16. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses? *Mol Aspects Med*. 2017;55:9-19.
17. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal*. 2012;8:437-502.
18. Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49:473-497.
19. Timmerman D, Valentin L, Bourne TH, Collins WP, Verrelst H, Vergote I. Terms, definitions and measurements to describe the sonographic features of adnexal tumors: a consensus opinion from the International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) group. *Ultrasound ObstetGynecol*. 2000;16:500-505.
20. May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM. Peripheral biomarkers of endometriosis: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2010;16:651-674.
21. Lo Turco EG, Cordero FB, de Carvalho Lopes PH, et al. Proteomic analysis of follicular fluid from women with and without endometriosis: new therapeutic targets and biomarkers. *Mol Reprod Dev*. 2013;80:441-450.
22. Kelgandre DC, Pathak J, Patel S, Ingale P, Swain N. Adenosine deaminase - a novel diagnostic and prognostic biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17:1865-1868.
23. Ghaderi B, Amini S, Maroofi F, et al. Adenosine deaminase activity in chronic lymphocytic leukemia and healthy subjects. *Iran J Cancer Prev*. 2016;9:e5069.
24. Michot JM, Madec Y, Bulifon S, et al. Adenosine deaminase is a useful biomarker to diagnose pleural tuberculosis in low to medium prevalence settings. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;84:215-220.
25. Santosh UP, Renukananda GS, Abhilash S. Role of adenosine deaminase in common chronic ENT infections. *J ClinDiagn Res*. 2016;10:MC01-MC02.
26. Bravo-Tobar ID, Nello-Pérez C, Fernández A, et al. Adenosine deaminase activity and serum C-reactive protein as prognostic markers of Chagas disease severity. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57:385-392.
27. Vijayamahantesh, Amit A, Dikhit MR, et al. Elevated serum ADA activity as a marker for diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis in Indian Patients. *PLoS ONE*. 2016;11:e0154117.
28. Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol* 1927;3:93-110. 41.
29. Chen B, Dai D, Tang H, et al. Pre-treatment serum alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase as prognostic factors in triple negative breast cancer. *J Cancer*. 2016;7:2309-2316.
30. Tsai SH, Takeda K. Regulation of allergic inflammation by the ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) on basophils and mast cells. *Semin Immunopathol*. 2016;38:571-579.
31. Aliagas E, Vidal A, Torrejon-Escribano B, et al. Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal*. 2013;9:227-237.

**How to cite this article:** Trapero C, Jover L, Fernández-Montolí ME, et al. Analysis of the ectoenzymes ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3, in the contents of ovarian endometriomas as candidate biomarkers of endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2018;79:e12794. <https://doi.org/10.1111/aji.12794>



## CAPÍTOL 2

### **Caracterització de les ectonucleotidases en trompes uterines humanes amb un enfocament millorat que identifica simultàniament l'expressió proteica i l'activitat enzimàtica *in situ***

**Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach  
simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity.**

Villamonte ML, Torrejon-Escribano B, Rodriguez-Martinez A, Trapero C, Vidal A, Gomez de  
Aranda I, Sevigny J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M.

**Histochemistry and Cell Biology. 2018;149(3):269-276.**



En aquest capítol es resol l'objectiu metodològic de millorar les eines d'estudi de les ectonucleotidases en teixit i en cultiu. Hem desenvolupat una tècnica de detecció simultània de l'enzim, mitjançant l'ús d'anticossos, i la seva activitat enzimàtica, a través de la detecció *in situ* del fosfat inorgànic generat en afegir-li el substrat específic. Aquesta tècnica és de gran interès ja que permet la validació de nous inhibidors per les diferents ectonucleotidases, que també es poden aplicar en el moment de fer la tècnica.

El resultat destacable d'aquest estudi ha estat l'**establiment d'un nou protocol que permet la identificació directa de la proteïna i de la seva activitat nucleotidasa associada.**

A més, aquest estudi ha permès estudiar les ectonucleotidases en les trompes uterines humanes.

L'estudi ha estat publicat a la revista [Histochemistry and Cell Biology](https://doi.org/10.1007/s00418-017-1627-8) 2018; 149(3):269-276. doi:10.1007/s00418-017-1627-8. Aquest treball forma part també de la tesi doctoral de l'investigador Aitor Rodríguez Martínez. CTC i ARM han participat en el disseny i optimització de la nova tècnica descrita, en la realització d'experiments, en la discussió dels resultats i en el disseny del manuscrit. La nova metodologia descrita ha sigut essencial per assolir la caracterització de les ectonucleotidases en la present tesi, però també en el desenvolupament de la tesi de l'ARM. Aquesta metodologia també està detallada en el capítol del llibre de l'**Annex 1** [165].





# Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity

María Lina Villamonte<sup>1</sup> · Benjamín Torrejón-Escribano<sup>1,2</sup> · Aitor Rodríguez-Martínez<sup>1,3</sup> · Carla Trapero<sup>1,3</sup> · August Vidal<sup>1,3,4</sup> · Inmaculada Gómez de Aranda<sup>1</sup> · Jean Sévigny<sup>5,6</sup> · Xavier Matías-Guiu<sup>3,4</sup> · Mireia Martín-Satué<sup>1,3</sup>

Accepted: 15 December 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

## Abstract

Extracellular ATP and its hydrolysis product adenosine modulate various reproductive functions such as those taking place in oviducts, including contraction, beating of cilia, and maintenance of fluid composition that, in turn, influences sperm capacitation and hyperactivation, as well as oocyte and embryo nourishing. Ecto-nucleotidases are the enzymes that regulate extracellular ATP and adenosine levels, thus playing a role in reproduction. We have optimized a convenient method for characterizing ecto-nucleotidases that simultaneously localizes the protein and its associated enzyme activity in the same tissue slice and characterizes ecto-nucleotidases in human oviducts. The technique combines immunofluorescence and in situ histochemistry, allowing precise identification of ecto-nucleotidases at a subcellular level. In oviducts, remarkably, ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (NTPDase2) and NTPDase3, with the ability to hydrolyze ATP to AMP, are expressed in ciliated epithelial cells but with different subcellular localization. Ecto-5′nucleotidase/CD73 is also expressed apically in ciliated cells. CD73, together with alkaline phosphatase, also expressed apically in oviductal epithelium, complete the hydrolysis sequence by dephosphorylating AMP to adenosine. The concerted action of these enzymes would contribute to the local increase of adenosine concentration necessary for sperm capacitation. The use of this method would be an asset for testing new potential therapeutic drugs with inhibitory potential, which is of great interest presently in the field of oncology and in other clinical disciplines.

**Keywords** Ecto-nucleotidases · CD39 · CD73 · Alkaline phosphatase · ATP · Adenosine · Oviduct

## Abbreviations

ADA Adenosine deaminase  
AP Alkaline phosphatase  
 $\alpha,\beta$ -meADP Alpha, beta-methylene adenosine 5′-diphosphate

E-NTPDase Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase  
PLAP Placental alkaline phosphatase

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00418-017-1627-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mireia Martín-Satué  
martinsatue@ub.edu

<sup>1</sup> Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Campus Bellvitge, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Serveis Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Campus Bellvitge, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Oncobell Program, CIBERONC, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Servei d'Anatomia Patològica, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Centre de Recherche du CHU de Québec, CHUL, Université Laval, Québec, Canada

<sup>6</sup> Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada

## Introduction

Oviducts are the anatomical structures that host fertilization and early stages of embryo development. They collect and transport the oocyte from the ovary, afford protection to the sperm after ejaculation, and create the appropriate milieu for sperm capacitation and hyperactivation to occur (Coy et al. 2012). The oviductal fluid is generated by secretory cells that define the mucosa layer together with ciliated cells, necessary for oocyte and embryo transport (Li and Winuthayanon 2017).

Purinergic signaling, the group of cell responses to extracellular nucleotides, such as ATP, and nucleosides, such as adenosine, is involved in oviduct function (Burnstock 2014). Extracellular ATP mediates oviduct smooth muscle contraction, increases ciliary beat frequency (Barraera et al. 2004), and determines luminal fluid composition (Keating and Quinlan 2008) by inducing ion secretion by oviduct epithelial cells. Adenosine is a key molecule in sperm capacitation, the series of biochemical changes that sperm undergo in the female reproductive tract to acquire fertilizing ability (Fraser 2008; Torres-Fuentes et al. 2015; Bellezza and Minelli 2017).

Extracellular ATP and adenosine levels are mainly regulated by the action of ecto-nucleotidases, the group of enzymes acting sequentially hydrolyzing ATP to ADP, AMP and adenosine (Yegutkin 2014). Amongst cell surface ecto-nucleotidases, the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family is predominant. This family of enzymes hydrolyzes ATP (and ADP) to AMP which in turn is hydrolyzed to adenosine by the action of ecto-5'-nucleotidase (CD73). Adenosine inactivation is produced by the action of adenosine deaminase (ADA) which catalyzes its deamination to inosine. ADA in humans is often associated with CD26/dipeptidyl peptidase IV expressed at the cell membrane (Yegutkin 2008). Ecto-nucleotidases and also CD26 were previously characterized in human endometrium showing differences along the cycle (Aliagas et al. 2013). In the case of oviducts, expression of NTPDase3 and CD73 has been described in mice in epithelial oviductal cells (Martín-Satué et al. 2009; Aliagas et al. 2010), suggesting a possible sequential activity of the two enzymes in the hydrolysis of ATP to adenosine in the luminal environment. Although the relevance of ecto-nucleotidases in the control of ATP and adenosine concentrations in oviductal fluid is considerable, no studies have yet been conducted in human oviducts.

Ecto-nucleotidase activities can be identified at a sub-cellular level in frozen tissue sections, taking advantage of the ability of these enzymes to generate inorganic phosphorus (Pi) when incubated in the presence of appropriate substrates, e.g., AMP for CD73 (Yegutkin 2014).

Considering that the same substrate might usually be hydrolyzed by more than one enzyme, specific inhibitors, or the use of antibodies, are needed for complete characterization of these ecto-enzymes (Langer et al. 2008). We implemented a new methodological approach combining immunofluorescence and in situ histochemistry that allows direct identification of an ecto-enzyme and its associated enzyme activity.

In the present study we analyzed, with this optimized method, the expression and activity of NTPDase1 (CD39), NTPDase2, NTPDase3, CD73, and alkaline phosphatases (AP) in human oviducts.

## Materials and methods

### Samples

The study was performed in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and the protocol was approved by the ethics committee for clinical investigation of Bellvitge Hospital. Human oviduct samples ( $n = 13$ ) were obtained from salpingectomy specimens without tubal malignancy at the Pathology Service of Bellvitge Hospital (mean age 52, standard deviation 9.87, range 35–64 years).

Tissue samples were fixed with 4% paraformaldehyde, then embedded in 30% sucrose at 4 °C for 24 h and snap frozen in O.C.T freezing media (Tissue-Tek®; Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands). 15 µm sections were obtained using a CM1950 Leica Cryostat (Leica, Wetzlar, Germany). Sections were put onto poly-L-lysine-coated glass slides and stored at – 20 °C until use. Routine hematoxylin and eosin staining was performed.

### Antibodies

Primary antibodies used in this study are listed in Table 1. Secondary antibodies used were horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse (EnVision™ + System; DAKO, Carpinteria, CA, USA), Alexa Fluor 488-goat anti-mouse IgG2b and anti-rabbit, Alexa Fluor 555-goat anti-mouse IgG1 and anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA). Secondary antibodies were used at 1:500 and dilutions were made in PBS.

### Immunolabeling experiments

Sections were washed three times with PBS to remove the O.C.T freezing media. The slices were pre-incubated for 1 h at room temperature (RT) with PBS containing 20% normal goat serum (NGS; Gibco, Paisley, UK), 0.2% Triton, and 0.2% gelatin (Merck, Darmstadt, Germany). For immunohistochemistry experiments, a previous blocking of



**Table 1** List of primary antibodies used for immunolabeling experiments

Antibody specificity	Name/clone	Source (isotype)	Supplier	Dilution
CD26	202-36	Mouse (IgG2b)	Abcam (ab3154)	1:100
NTPDase1 (CD39)	BU-61	Mouse	Ancell (188–820)	1:500
Ecto-5'-nucleotidase (CD73)	4G4	Mouse (IgG1)	Abcam (ab81720)	1:50
Human placental alkaline phosphatase (PLAP)	8B6	Mouse	Sigma (A2951)	1:1000
NTPDase2 (CD39L1)	–	Rabbit	Enzo (ALX-215-045)	1:100
NTPDase3	B <sub>3</sub> S <sub>10</sub>	Mouse	<a href="http://ectonucleotidases-ab.com">http://ectonucleotidases-ab.com</a>	1:500

endogenous peroxidase activity was performed with 10% methanol (v/v) and 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) in PBS for 30 min. Slices were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies (listed in Table 1) diluted in PBS. After three washes in PBS, tissue sections were incubated with the appropriate secondary antibodies for 1 h at RT. Secondary antibodies alone were routinely included as control for the experiments (Supplementary Fig. 1).

For immunohistochemistry, the peroxidase reaction was performed in a solution containing 0.6 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine substrate (DAB; D-5637, Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and 0.5 µL/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 10 min, and stopped with PBS. Nuclei were counterstained with hematoxylin, and slides were then dehydrated and mounted with DPX mounting medium. Samples were observed under a light Nikon Eclipse E200 and photographed under a light Leica DMD 108 microscope. In fluorescence assays, for nuclei visualization, samples were incubated with To-Pro<sup>®</sup>-3 (Life Technologies, Paisley, UK) for 7 min. After three washes, slides were mounted with aqueous mounting medium (Fluoromount<sup>™</sup>, Sigma–Aldrich). Fluorescence samples were observed and photographed under a Leica TCS-SL spectral confocal microscope.

### In situ nucleotidase activity experiments

A protocol based on the Wachstein/Meisel lead phosphate method was used (Wachstein et al. 1960; Aliagas et al. 2010, 2014). The sections were washed twice with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 and pre-incubated for 30 min at RT with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 containing 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 250 mM sucrose. The enzymatic reaction was carried out by incubating tissue sections for 1 h at 37 °C with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 supplemented with 250 mM sucrose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 3% Dextran, 2 mM Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and 2 mM CaCl<sub>2</sub>. All experiments were performed in the presence of 2.5 mM levamisole, as an inhibitor of alkaline phosphatase (AP) activity, and in the presence of 1 mM AMP, ADP, or ATP as a substrate. Control assays were performed in the absence of a nucleotide. For CD73 inhibition experiments, 1 mM α,β-methylene-ADP (α,β-meADP) was added to both pre-incubation and

enzymatic reaction buffers. The reaction was revealed by incubation with 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S (v/v) for exactly 1 min. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Samples were mounted with aqueous mounting medium (Fluoromount<sup>™</sup>; Sigma–Aldrich), observed under light Nikon Eclipse E200 microscope and photographed under a light Leica DMD 108 microscope.

### Combined NTPDase1 (CD39) immunolabeling and in situ ADPase activity experiments

Sample sections were washed twice with PBS and blocked in PBS containing 20% NGS (Gibco), 0.2% Triton and 0.2% gelatin (Merck) at RT for 1 h. The samples were incubated overnight at 4 °C with the anti-human CD39 antibody. The sections were then washed three times with PBS and twice with 50 mM Tris-maleate buffer. In situ ADPase activity experiment was performed in the same sections as indicated above, using 1 mM ADP as substrate. Subsequently, the tissues were washed three times in PBS before Alexa Fluor-488 goat anti-mouse secondary antibody was added. After three final washes with PBS, samples were mounted on a glass slide with Prolong Gold antifade reagent with DAPI mounting medium (Thermo Fisher Scientific). The sections were observed and photographed under a Nikon Eclipse E800 microscope.

### Combined NTPDase2 (CD39L1) immunolabeling and in situ ATPase activity experiments

Immunolocalization of NTPDase2 (CD39L1) and ATPase activity assay were performed in the same slides using the protocol indicated above. The samples were incubated with rabbit anti-human CD39L1 primary antibody and Alexa Fluor-488 goat anti-rabbit secondary antibody.

### Combined immunolabeling of human placental alkaline phosphatase (PLAP) and in situ AP activity experiments

The sections were rinsed twice with PBS and pre-incubated for 1 h at RT with PBS containing 20% NGS (Gibco, Paisley,

UK), 0.2% Triton and 0.2% gelatin (Merck). The samples were incubated overnight at 4 °C with the anti-human PLAP primary antibody. Subsequently, the sections were incubated with Alexa Fluor 488-goat anti-mouse secondary antibody for 1 h at RT. The histochemical localization of AP was addressed in the same slides using the Gossrau method (Schelstraete et al. 1985; Aliagas et al. 2013) with some modifications. Briefly, slices were rinsed with 0.1 M Tris–HCl buffer pH 7.4 containing 5 mM MgCl<sub>2</sub> and then incubated with the same buffer at pH 9.4 for 15 min at RT. The enzymatic reaction was detected using the revealing reagent BCIP (Sigma-Aldrich) for 20 min at RT. The reaction was stopped by rinsing with 0.1 M Tris–HCl buffer, pH 7.4. For AP inhibition experiments, 5 mM levamisole was added to both pre-incubation and enzymatic reaction buffers. In control experiments, the revealing reagent BCIP was omitted. The samples were mounted in ProLong Gold anti-fade reagent with DAPI mounting medium (Thermo Fisher Scientific) and observed and photographed under a Nikon Eclipse E800 microscope.

## Results and discussion

In the present study, we characterized the ecto-nucleotidases in human oviducts with a method that we set up to simultaneously detect, in the same tissue section, both protein expression and enzyme activity with immunofluorescence and *in situ* histochemistry, respectively. Our results show that ecto-nucleotidases are abundantly present in human oviducts, where they might act in concert to regulate extracellular nucleotide and nucleoside concentrations.

Methodologically, although other protocols are feasible, in our hands, the most suitable combination for optimal visualization and further photographing is the sequence of techniques shown here, with histochemistry being performed between primary and secondary antibody incubations. Equivalent results were obtained when immunofluorescence and histochemistry were analyzed separately in different tissue slices (data not shown). We recommend testing different nucleotide concentrations and incubation times to optimize the results for a particular tissue, since dark brown deposits can hamper fluorescence capture. Notably, phosphate buffer used for incubation of antibodies and for immunolabeling washing steps did not increase the background of the tissue after histochemistry, performed in Tris-maleate (phosphate-free) buffer (Supplementary Fig. 1). Since the use of primary antibodies with possible enzyme inhibitory action, such as the one to NTPDase3 (Munkonda et al. 2009), can impede the subsequent *in situ* enzyme activity reaction, in these cases, the *in situ* histochemistry should be performed at the beginning of the procedure. This consideration, which is apparently a limitation, indeed represents an asset, since

the technique might well be used to validate antibodies with potential inhibitory action, such as those against CD39 and CD73, which are already being used in cancer clinical trials (Allard et al. 2017).

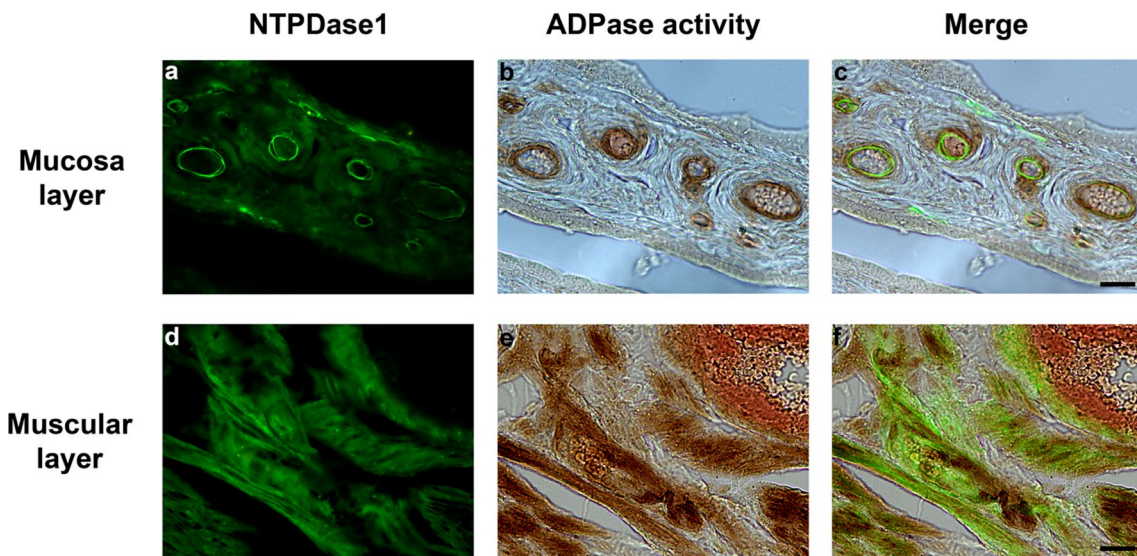
The hydrolysis of ATP to AMP is catalyzed mainly by the E-NTPDase family. As expected, NTPDase1 (CD39) label was prominent in the vascular endothelial cells and in smooth muscle cells (Kaczmarek et al. 1996; Sévigny et al. 2002). The strong ADPase activity detected coincided with the CD39 immunolocalization (Fig. 1). Moreover, NTPDase2 and 3 were not detected in these structures.

NTPDase2 was largely expressed in ciliated epithelial cells (Fig. 2A) and in fibroblasts of the lamina propria (not shown). NTPDase3 was also detected in ciliated epithelial cells (Fig. 2B). Strong signal for ATPase activity was detected in cilia, coinciding with NTPDase2 and NTPDase3 expression (Fig. 2A). Double immunolabeling for NTPDase2 and NTPDase3 revealed that both proteins were expressed at the apical pole of ciliated cells, but with different subcellular distribution. While NTPDase2 is expressed throughout the entire length of the cilia, NTPDase3 expression is limited to the apical side of the cell membrane, basally in the cilia (Fig. 2B).

The next step in the metabolism of purine nucleotides is the dephosphorylation of extracellular AMP to adenosine, mainly accomplished by ecto-5′nucleotidase (CD73). This enzyme was abundantly detected on the apical side of ciliated epithelial cells. As expected, the enzyme was also expressed in smooth muscle, connective tissue and endothelial cells (Fig. 3). *In situ* AMPase activity experiments demonstrated that the enzyme was active where the protein was immunodetected. *In situ* AMPase activity was inhibited by  $\alpha,\beta$ -meADP, a specific CD73 inhibitor, further demonstrating the identity of the immunodetected protein in the above-mentioned structures (Fig. 3A).

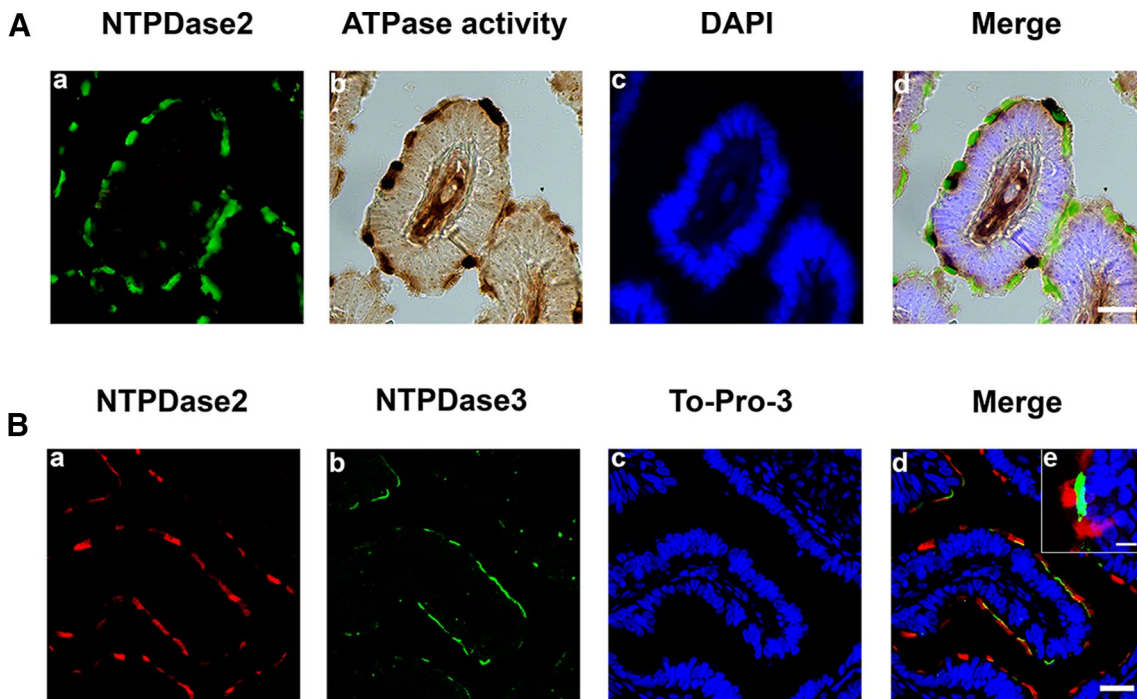
Placental alkaline phosphatase, an ecto-nucleotidase that catalyzes the hydrolysis of phosphate from a broad range of substrates, was expressed and active in luminal epithelium and also, as expected, in the endothelial cells of blood vessels. In the present study, we demonstrate with this new method the correlation between PLAP protein expression and AP activity in the fallopian tubes (Fig. 4). The activity was inhibited with the AP inhibitor levamisole, confirming the specificity of the activity (data not shown).

The generated adenosine can be further inactivated by other enzymes such as adenosine deaminase (ADA), which may be expressed as a soluble ecto-enzyme or as membrane-associated enzyme often forming larger complexes with CD26/dipeptidyl peptidase IV, converting adenosine to inosine. CD26 receptor expression was detected in the secretory, non-ciliated, epithelial cells (Supplementary Fig. 2). Double immunofluorescence showed that CD26 staining and CD73 staining were mutually exclusive.



**Fig. 1** Immunolocalization of NTPDase1 (**a, d**) and in situ ADPase histochemistry (**b, e**) in cryosections of human oviducts. NTPDase1 was detected with immunofluorescence in endothelial cells of lamina propria (**a**) and in smooth muscle cells (**d**). Microphotographs **b** and

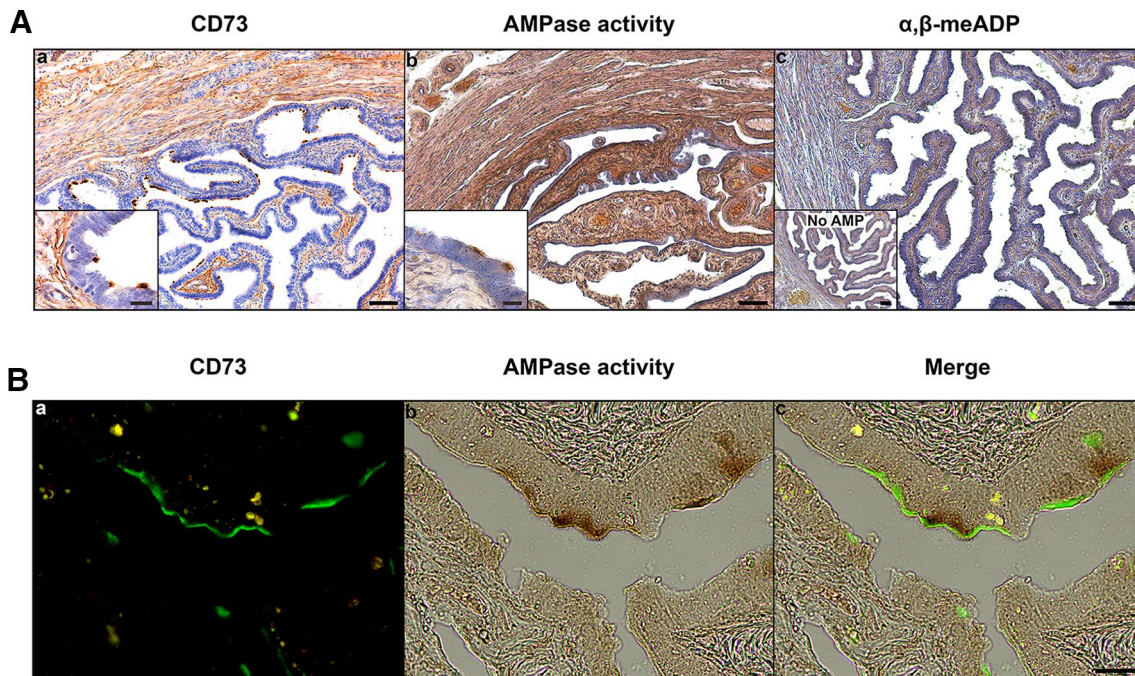
**e** show dark brown deposits corresponding to in situ ADPase activity. Merged images (**c, f**) confirms that NTPDase1 is active in the same structures where it immunolocalizes. Reddish structure at the top right of the image is the blood inside the vessel. Scale bars 25  $\mu$ m



**Fig. 2** **A** Immunolocalization of NTPDase2 (**a**) and in situ ATPase histochemistry (**b**) in cryosections of human oviducts. NTPDase2 was largely detected with immunofluorescence in ciliated epithelial cells. Microphotograph **b** shows dark brown deposits corresponding to in situ ATPase activity. Nuclei were labeled with DAPI (**c**). Merged image (**d**) confirms that NTPDase2 is active in the same structures where it immunolocalizes. Scale bar 25  $\mu$ m. **B** Confocal fluorescence

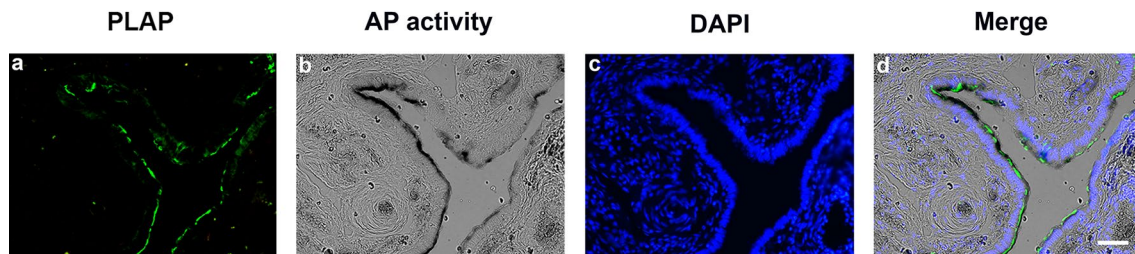
images of the mucosa of oviducts with antibodies against NTPDase2 (**a**) and NTPDase3 (**b**). Nuclei were labeled with To-Pro-3 (**c**). Merged image shows that NTPDase2 and NTPDase3 are expressed in ciliated epithelial cells; NTPDase2 is detected throughout the entire length of the cilia and NTPDase3 expression is confined to the apical side of the cell membrane, basally in the cilia (**d, e**). Scale bars 40  $\mu$ m (**d**) and 5  $\mu$ m (**e**)





**Fig. 3** **A** Immunolocalization of CD73 (**a**) and in situ AMPase histochemistry (**b**, **c**) in cryosections of human oviducts. **a** CD73 was abundantly immunodetected on the apical side of ciliated epithelial cells (inset). CD73 was also detected in smooth muscle cells, connective tissue and endothelial cells. Microphotograph **b** shows dark brown deposits corresponding to in situ AMPase activity, coinciding with CD73 localization. **c** Activity experiment performed in the presence of the inhibitor  $\alpha,\beta$ -meADP shows complete inhibition of AMPase activity. Inset in **c** corresponds to the activity experiments

in the absence of substrate. Nuclei were counterstained with aqueous hematoxylin. Scale bars 100  $\mu\text{m}$  and 25  $\mu\text{m}$  in insets. **B** Immunolocalization of CD73 (**a**) and in situ AMPase histochemistry (**b**) in cryosections of human oviducts. **a** CD73 was detected with immunofluorescence on the apical side of ciliated epithelial cells. Microphotograph **b** show dark brown deposits corresponding to in situ AMPase activity. **c** Merged image confirms that CD73 is active in the same structures where it immunolocalizes. Scale bar 25  $\mu\text{m}$



**Fig. 4** Immunolocalization of PLAP (**a**) and in situ AP histochemistry (**b**) in cryosections of human oviducts. PLAP was detected with immunofluorescence in luminal epithelium. Microphotograph

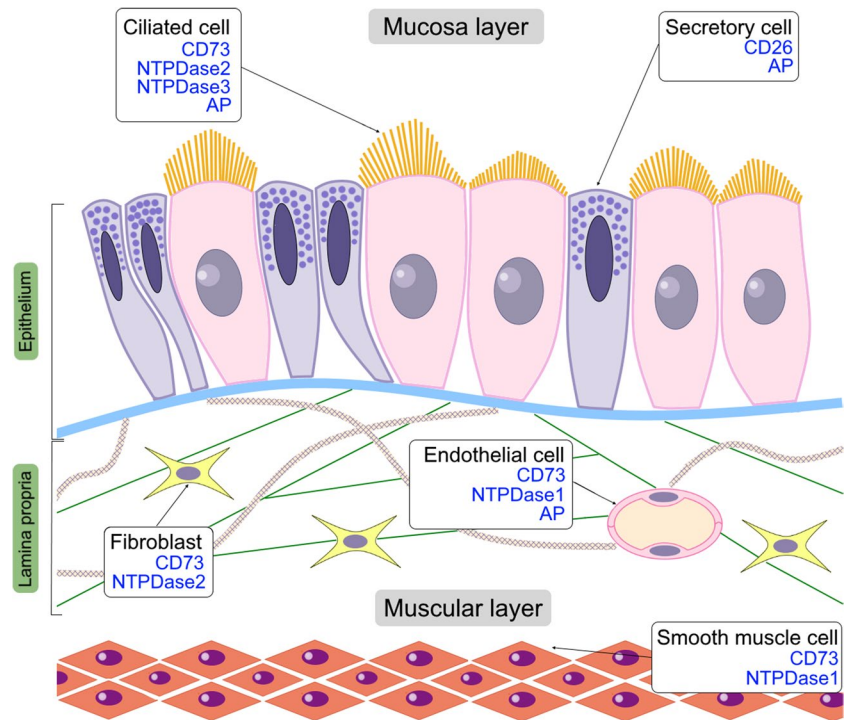
**b** shows dark deposits corresponding to in situ AP activity. Merged image (**d**) confirms that PLAP is active in the same structures where it immunolocalizes. Scale bar 50  $\mu\text{m}$

A schematic representation of the ecto-enzymes studied in human oviducts can be seen in Fig. 5. In summary, ciliated cells, remarkably, have the complete enzyme mechanism needed to efficiently hydrolyze extracellular ATP, ADP and AMP to adenosine, and thus they might well be the key cells in the control of purinergic signaling in the lumen of oviducts. A local increase of adenosine would favor sperm capacitation. This would add a new function to the already versatile ciliated cells that, besides triggering fluid movement by cilia beating, contribute, amongst other functions, to

the anchorage of the sperm favoring successful fertilization (Spassky and Meunier 2017).

Considering that ecto-nucleotidases are involved in the physiology of tissue homeostasis as well as the physiopathology of many diseases, the improvement of methods for their study in the context of tissue architecture is of relevance. As mentioned above, an example is the study of specific inhibitors for developing new therapeutic strategies in oncology (Allard et al. 2017). This protocol optimizes resources and, remarkably, saves tissue samples, which is of

**Fig. 5** Schematic representation showing the distribution of ecto-nucleotidases in human oviducts



particular interest in those cases in which only a small piece of tissue sample is available.

**Acknowledgements** This work was supported by a grant from the *Instituto de Salud Carlos III (FIS PI15/00036)*, co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF) “a Way to Build Europe”-// *FONDOS FEDER “una manera de hacer Europa”*, and a grant from the *Fundación Merck Salud (Ayuda Merck de Investigación 2016-Fertilidad)*. ARM was awarded a fellowship from the *Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)*. JS received support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and was the recipient of a *Chercheur National Scholarship* from the *Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS)*. We are grateful for the technical support of Serveis Científics i Tecnològics, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona. The authors thank Tom Yohannan for language editing.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

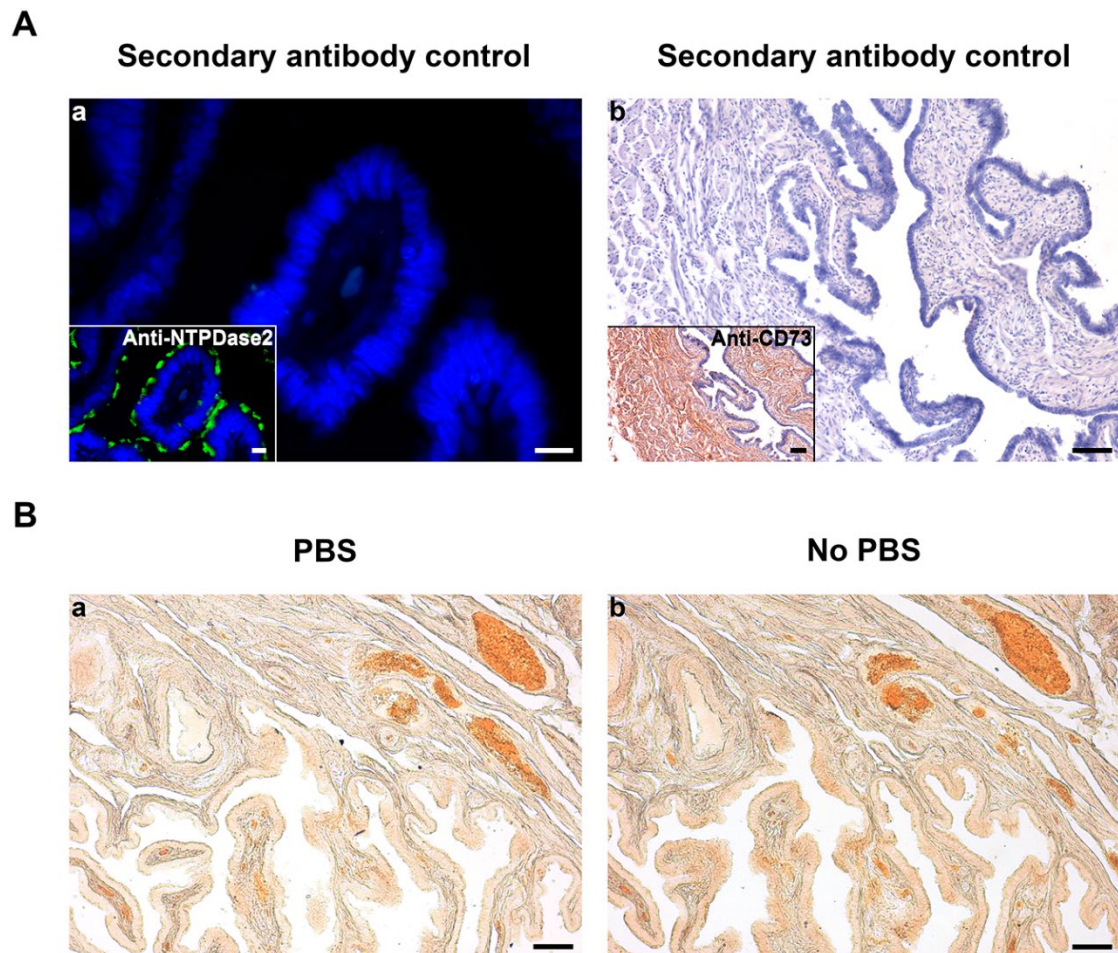
## References

- Aliagas E, Torrejón-Escribano B, Lavoie EG, de Aranda IG, Sévigny J, Solsona C, Martín-Satué M (2010) Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidase/CD73 along the mouse female estrous cycle. *Acta Physiol (Oxf)* 199(2):191–197. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x>
- Aliagas E, Vidal A, Torrejón-Escribano B, Taco M, del R, Ponce J, de Aranda IG, Sévigny J, Condom E, Martín-Satué M (2013) Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal* 9(2):227–37. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9345-0>
- Aliagas E, Vidal A, Teixidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M (2014) High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediat Inflamm* 2014:509027. <https://doi.org/10.1155/2014/509027>
- Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J (2017) The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* 276(1):121–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12528>
- Barrera NP, Morales B, Villalón M (2004) Plasma and intracellular membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate the  $Ca^{2+}$  increase associated with the ATP-induced increase in ciliary beat frequency. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1114–C1124. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00343.2003>
- Bellezza I, Minelli A (2017) Adenosine in sperm physiology. *Mol Aspects Med* 55:102–109. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.009>
- Burnstock G (2014) Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. *Purinergic Signal* 10:157–187. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9399-7>
- Coy P, García-Vázquez FA, Visconti PE, Avilés M (2012) Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* 144(6):649–660. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0279>
- Fraser LR (2008) The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology* 70(8):1356–1359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.016>
- Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC (1996) Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 271(51):33116–33122. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.33116>
- Keating N, Quinlan LR (2008) Effect of basolateral adenosine triphosphate on chloride secretion by bovine oviductal epithelium. *Biol Reprod* 78:1119–1126. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065508>
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent

- brain revisited. *Cell Tissue Res* 334(2):199–217. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0681-x>
- Li S, Winuthayanon W (2017) Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *J Endocrinol* 232:R1–R26. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>
- Martín-Satué M, Lavoie ÉG, Pelletier J, Fausther M, Csizmadia E, Guckelberger O, Robson SC, Sévigny J (2009) Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* 131:615–628. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0551-3>
- Munkonda MN, Pelletier J, Ivanenkov VV, Fausther M, Tremblay A, Künzli B, Kirley TL, Sévigny J (2009) Characterization of a monoclonal antibody as the first specific inhibitor of human NTP diphosphohydrolase-3: partial characterization of the inhibitory epitope and potential applications. *FEBS J* 276(2):479–496. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06797.x>
- Schelstraete K, Deman J, Vermeulen FL, Strijckmans K, Vandecasteele C, Slegers G, De Schryver A (1985) Kinetics of <sup>13</sup>N-ammonia incorporation in human tumours. *Nucl Med Commun* 6(8):461–70
- Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC (2002) Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99(8):2801–2809. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2801>
- Spassky N, Meunier A (2017) The development and functions of multiciliated epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18(7):423–436. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.21>
- Torres-Fuentes JL, Rios M, Moreno RD (2015) Involvement of a P2X7 receptor in the acrosome reaction induced by ATP in rat spermatozoa. *J Cell Physiol* 230:3068–3075. <https://doi.org/10.1002/jcp.25044>
- Wachstein M, Meisel E, Niedzwiedz A (1960) Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead adenosine triphosphate technique. *J Histochem Cytochem* 8:387–388. <https://doi.org/10.1177/8.5.387>
- Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783(5):673–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>
- Yegutkin GG (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(6):473–497. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>

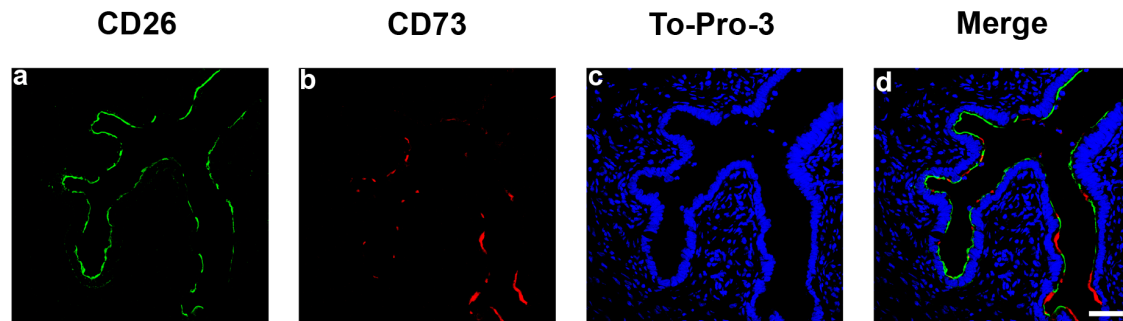


## Material suplementari 1



**Supplementary Fig. 1** A Secondary antibody controls for immunofluorescence (a) and immunohistochemistry (b) experiments. In these experiments primary antibody was omitted to determine the background level due to nonspecific secondary antibody binding. Nuclei were labeled with DAPI (a) or hematoxylin (b). Insets show the results of the experiments that included primary antibodies (anti-NTPDase2 in a and anti-CD73 in b). Note the clean background obtained with both techniques. Scale bars 25  $\mu\text{m}$  (a) and 100  $\mu\text{m}$  (b). B Histochemistry controls in consecutive slides incubated with the same buffers and washing steps but omitting the nucleotide to visualize the background of the technique when samples included PBS (a) or not (b) in the initial steps. Note the clean background obtained in both cases. Scale bars 100  $\mu\text{m}$ .

## Material suplementari 2



**Supplementary Fig. 2** Confocal fluorescence images of the mucosa of human oviducts with antibodies against CD26 (a) and CD73 (b). a CD26 receptor expression was detected in the secretory, non-ciliated, epithelial cells. b CD73 was abundantly immunodetected on the apical side of ciliated epithelial cells. Nuclei were labeled with To-Pro-3 (c). Merge image shows that CD26 staining and CD73 staining were mutually exclusive (d). Scale bar 40  $\mu\text{m}$ .



## CAPÍTOL 3

### **L'NTPDasa2 en l'endometri humà: nou marcador d'estroma basal i de cèl·lules mare mesenquimals**

**The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: A novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells.**

Trapero C, Vidal A, Rodriguez-Martinez A, Sevigny J, Ponce J, Coroleu B, Matias-Guiu X, Martín-Satué M.

**Purinergic Signalling. 2019;15(2):225–236.**



Per l'estudi de les ectonucleotidases en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic ha estat essencial conèixer l'expressió i la distribució d'aquests enzims en l'endometri no patològic per poder determinar canvis d'expressió associats a la malaltia.

En aquest treball hem caracteritzat l'NTPDasa2, coneguda també com CD39L1, en els endometris de dones sense patologia endometrial. S'ha realitzat l'estudi de la distribució de l'NTPDasa2 en les cèl·lules epitelials i en les cèl·lules estromals d'endometris cíclics i atròfics mitjançant experiments d'immunohistoquímica i d'immunofluorescència, d'activitat ectonucleotidasa *in situ* amb i sense la presència d'inhibidors específics, i la utilització de la tècnica de detecció simultània de la proteïna i l'activitat ATPasa.

Les principals troballes d'aquesta investigació són:

- 1) **L'expressió i activitat ATPasa de l'NTPDasa2 en els cilis de les cèl·lules ciliades endometrials i en les cèl·lules estromals de la capa basal de l'endometri cíclic i atròfic**, sense variacions en la seva expressió al llarg del cicle menstrual (veure **capítol 3, Figura 1 i Taula 2**).
- 2) **L'expressió de l'NTPDasa2 en l'estroma de les lesions adenomiòtiques**, similar a l'expressió detectada en la capa basal de l'endometri (veure **capítol 3, Figura 5**).
- 3) **La colocalització de l'NTPDasa2 amb el marcador de cèl·lules mare mesenquimal endometrials (eMSCs) Sushi Domain Containing 2 (SUSD2)** en la població d'eMSCs perivasculars en la capa funcional i basal de l'endometri cíclic i atròfic, i en el miometri (veure **capítol 3, Figura 4**).


Aquestes troballes presenten l'NTPDasa2 com a un nou marcador de l'estroma de la capa basal amb utilitat en el traçat de l'adenomiosi, la presència de teixit endometrial en el miometri. I, per una altra banda, l'NTPDasa2 també és un nou marcador per la població perivascular d'eMSCs SUSD2<sup>+</sup>.

Aquest estudi s'ha publicat a la revista [Purinergic Signalling 2019;15\(2\):225-236](https://doi.org/10.1007/s11302-019-09656-3). doi: [10.1007/s11302-019-09656-3](https://doi.org/10.1007/s11302-019-09656-3). Aquest treball no ha estat utilitzat per a la realització de cap altre tesi doctoral. La doctoranda ha participat en el disseny de l'estudi, la realització dels experiments, la discussió dels resultats i l'escriptura de l'article.





# The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: a novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells

Carla Trapero<sup>1,2</sup> · August Vidal<sup>1,2,3</sup> · Aitor Rodríguez-Martínez<sup>1,2</sup> · Jean Sévigny<sup>4,5</sup> · Jordi Ponce<sup>2,6</sup> · Buenaventura Coroleu<sup>7</sup> · Xavier Matias-Guiu<sup>2,3</sup> · Mireia Martín-Satué<sup>1,2</sup> 

Received: 30 November 2018 / Accepted: 17 April 2019 / Published online: 23 May 2019  
© Springer Nature B.V. 2019

## Abstract

The human endometrium undergoes repetitive regeneration cycles in order to recover the functional layer, shed during menses. The basal layer, which remains in charge of endometrial regeneration in every cycle, contains adult stem or progenitor cells of epithelial and mesenchymal lineage. Some pathologies such as adenomyosis, in which endometrial tissue develops within the myometrium, originate from this layer. It is well known that the balance between adenosine triphosphate (ATP) and adenosine plays a crucial role in stem/progenitor cell physiology, influencing proliferation, differentiation, and migration. The extracellular levels of nucleotides and nucleosides are regulated by the ectonucleotidases, such as the nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (NTPDase2). NTPDase2 is a membrane-expressed enzyme found in cells of mesenchymal origin such as perivascular cells of different tissues and the stem cells of adult neurogenic regions. The aim of this study was to characterize the expression of NTPDase2 in human nonpathological cyclic and postmenopausal endometria and in adenomyosis. We examined proliferative, secretory, and atrophic endometria from women without endometrial pathology and also adenomyotic lesions. Importantly, we identified NTPDase2 as the first marker of basal endometrium since other stromal cell markers such as CD10 label the entire stroma. As expected, NTPDase2 was also found in adenomyotic stroma, thus becoming a convenient tracer of these lesions. We did not record any changes in the expression levels or the localization of NTPDase2 along the cycle, thus suggesting that the enzyme is not influenced by the female sex hormones like other previously studied ectoenzymes. Remarkably, NTPDase2 was expressed by the Sushi Domain containing 2 (SUSD2)<sup>+</sup> endometrial mesenchymal stem cells (eMSCs) found perivascularly, rendering it useful as a cell marker to improve the isolation of eMSCs needed for regenerative medicine therapies.

**Keywords** Purinergic signaling · Adenomyosis · SUSD2 · MSC · Ectonucleotidases

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11302-019-09656-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mireia Martín-Satué  
martinsatue@ub.edu

<sup>1</sup> Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Oncobell Program, CIBERONC, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Centre de Recherche du CHU de Québec, Université Laval, Québec City, QC, Canada

<sup>5</sup> Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec City, QC, Canada

<sup>6</sup> Servei de Ginecologia, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Hospital Universitari Quiron Dexeus, Salut de la Mujer Dexeus, Barcelona, Spain

## Introduction

The human endometrium, the innermost layer of the uterus, is a dynamic tissue undergoing repetitive regeneration cycles in order to recover the tissue shed during menses. The endometrium consists of two layers: the upper layer, known as functionalis, which contains the surface epithelium, the glandular epithelium, and a vascularized stroma; and the deeper basal layer (the basalis), formed by the basal region of the glands, a dense stroma, and blood vessels. The functionalis is lost during the menstrual phase while the basalis remains in charge of endometrial regeneration in every cycle, throughout the woman's reproductive life. There is no marker of endometrial basal stroma although it would be of interest to study pathologies that arise from this zone such as adenomyosis, which consists of the presence of endometrial tissue within the myometrium. As in other highly proliferative tissues, stem/progenitor cells are responsible for this tissue regeneration. Adult stem or progenitor cells of endometrium reside in the basalis and are present in cyclic and in postmenopausal endometria [1]. The N-cadherin has recently been identified as a marker of human endometrial epithelial progenitors (eEPs) [2]. N-cadherin<sup>+</sup> eEPs reside in the bases of endometrial glands in the basalis, adjacent to the myometrium, where the stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) is also expressed [3].

Endometrial mesenchymal stem cells (eMSCs) have been identified in both functionalis and basalis of human endometrium, using a combination of two pericyte cell markers: platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR $\beta$ )/CD140b and CD146 [4]. In 2012, Masuda et al. identified the perivascular marker Sushi Domain containing 2 (SUSD2) (previously known as W5C5) as an individual marker of another population of eMSCs [5]. So to date, the eMSC niche has been identified perivascularly, as in other organs [6, 7], with PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> pericytes) wrapping the endothelial cells, and the SUSD2<sup>+</sup> cells surrounding the pericytes.

Recently, numerous studies have been carried out on the role of the purinergic signaling in MSC function [8, 9]. Extracellular nucleotides and their metabolites, the effectors of the purinergic signaling, have been included in the list of molecular signals produced by MSCs. In fact, adenosine triphosphate (ATP) and its derivatives, such as adenosine, are involved in the regulation of the proliferation, differentiation, motility, migration, death, and immunomodulatory capacity of MSCs [8, 10–21]. All of these effects are possible through the presence of purinergic receptors, specific for adenosine (P1 receptors) and nucleotides (P2 receptors), in the plasma membrane of MSCs. In addition, nucleotide and nucleoside levels in the extracellular milieu of MSC are controlled by the presence of nucleotide-hydrolyzing enzymes called ectonucleotidases, acting alone or sequentially, on the MSC

cell surface. Four ectonucleotidase families have been identified: (i) ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (E-NTPDase), with NTPDase1 (CD39), 2, 3, and 8 as plasma membrane-bound members, which hydrolyses extracellular ATP to adenosine diphosphate (ADP), and ADP to adenosine monophosphate (AMP); (ii) ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family (E-NPP), which hydrolyses ATP to AMP; (iii) ecto-5'-nucleotidase (CD73), which converts AMP to adenosine; and (iv) alkaline phosphatase family (ALP), able to hydrolyze adenine nucleotides and pyrophosphate [22, 23].

Besides CD73, which is a cell surface marker defining MSCs, other ectonucleotidases have been identified in relation to MSCs, such as NTPDase1 in gums and NPP1 and NPP3 in bone marrow. In addition, NTPDase2, 3, 5, and 6 mRNAs have been detected in dermal and limb MSCs [20].

NTPDase2 is a cell surface-located enzyme that mainly catalyzes the dephosphorylation of ATP with minimal ADPase activity [23]. This enzyme has been identified in different tissues, in cells of mesenchymal origin, including microvascular pericytes and adventitial cells of muscularized vessels [24], as well as in adventitia of glomerular arterioles of the kidney [25] and portal fibroblasts of the liver [26]. Moreover, NTPDase2 is highly expressed in stem/progenitor cells in adult neurogenic regions, such as the type B cells of the subventricular zone and the rostral migratory stream, and the residual radial glial cells of the hippocampal dental gyrus in mice [27, 28], where NTPDase2 is probably involved in the progenitor cell homeostasis, limiting progenitor cell proliferation and expansion under baseline conditions [29]. In murine uterus, NTPDase2 is immunolocalized at the connective tissue cells lining endometrial glands and surrounding the myometrial fibers [30]. To date, although the presence of other ectonucleotidases has been well characterized in human endometrium, with variations in the expression along the cycle, studies on NTPDase2 in the human endometrium have yet to be performed. Moreover, P2Y receptors, activated by ADP (and UDP), which are the products of the hydrolytic activity of NTPDase2, are present in human endometrium and are also described in MSCs [8, 21, 31–33].

So, the eMSCs are pericytes and perivascular cells present in endometrium, and the ectoenzyme NTPDase2 has been identified in cells with perivascular localizations, such as micropericytes and adventitial cells in several different types of tissue. Knowing the role of purinergic signaling in MSCs and, specifically, the role of NTPDase2 in the control of stem/progenitor cell proliferation in neurogenic niches, it is evident that more studies of NTPDase2 in other tissues are required.

Based on these observations, we aimed to study NTPDase2 expression in human endometrium in relation to endometrial stromal cells as well as adenomyosis.

## Materials and methods

### Samples

Twenty-nine normal human endometrial samples from 29 women (mean age 56, standard deviation 12.32, and range 39–86 years) were obtained from hysterectomy specimens without endometrial malignancy at the Service of Gynecology of Bellvitge Hospital between February 2017 and June 2018. Three cases of adenomyosis (mean age 48, standard deviation 6.24, and range 43–55 years) were also included in the study. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. Six proliferative endometria, 4 secretory endometria, and 19 atrophic endometria were used in this study. The endometrial dating was done at the Service of Pathology of Bellvitge Hospital.

Tissue samples were cut and fixed with 4% paraformaldehyde, then introduced in 30% (*w/v*) sucrose solution at 4 °C for 24 h for their cryoprotection and embedded in O.C.T freezing media (Tissue-Tek®; Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands). Fifteen-micrometer sections were obtained using a Cryostat Leica CM1950 (Leica, Wetzlar, Germany). Sections were put onto poly-L-lysine coated glass slides and stored at –20 °C until use. Routine hematoxylin and eosin staining was performed.

### Antibodies

Primary antibodies used in this study are listed in Table 1. Secondary antibodies used for immunohistochemistry were as follows: horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse (EnVision™ + System; DAKO, Carpinteria, CA, USA) and HRP-conjugated goat anti-rabbit (EnVision™ + System). Secondary antibodies used for immunofluorescence assays were as follows: Alexa Fluor 488-goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Alexa Fluor 488-goat anti-mouse IgG2b (Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 555-goat anti-mouse IgG1 (Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 555-goat anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 488-goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific), Alexa Fluor 555-goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific), and Alexa Fluor 647-goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific). Secondary antibodies were used at 1:500 and dilutions were made in PBS.

### Immunolabeling experiments

Sections were washed twice with PBS to remove the O.C.T freezing media. The slices were pre-incubated for 1 h at room temperature (RT) with PBS containing 20% normal goat serum (NGS; Gibco, Paisley, UK), 0.2%

Triton, and 0.2% gelatin (Merck, Darmstadt, Germany). For immunohistochemistry experiments, a previous blocking of endogenous peroxidase activity was performed with 10% methanol (*v/v*) and 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*v/v*) in PBS for 30 min. Slices were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies (listed in Table 1) diluted in PBS. After three washes with PBS, tissue sections were incubated with the appropriate secondary antibodies at RT for 1 h in the case of fluorescence and for 30 min in the case of HRP-conjugated antibodies. Secondary antibodies alone were routinely included as controls for the experiments.

For immunohistochemistry, the peroxidase reaction was performed in a solution containing 0.6 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine substrate (DAB; D-5637, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and 0.5 μL/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 10 min, and stopped with PBS. Nuclei were counterstained with hematoxylin and slides were then dehydrated and mounted with DPX mounting medium (VWP International Ltd., Radnor, PA, USA). Samples were observed under light Nikon Eclipse E200 and photographed under light Leica DMD 108 microscope. In fluorescence assays, for nuclei labeling, slides were mounted with aqueous mounting medium with DAPI (ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI, Life Technologies, Paisley, UK). Samples were then observed and photographed under a Zeiss LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope. Fluorescence images were processed with the software ZEN 2.3 SP1 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Immunohistochemical staining was independently evaluated by two observers. Labeling distribution was recorded. Label intensity was scored as negative (–), weak (+), intermediate (++) , or strongly positive (+++).

### In situ ATPase activity experiments

A protocol based on the Wachstein/Meisel lead phosphate method was used [32, 34–36]. The sections were washed twice with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 and were pre-incubated for 30 min at RT with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 containing 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.25 M sucrose. The enzymatic reaction was carried out by incubating tissue sections for 1 h at 37 °C with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 supplemented with 0.25 M sucrose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 3% Dextran, 2 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Experiments were performed in the presence of 2.5 mM levamisole, as an inhibitor of the alkaline phosphatase activity, and in the presence of 1 mM ATP as a substrate. Control assays were performed in the absence of nucleotide. For inhibition experiments, 1 mM POM 1 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) was added to both pre-incubation and enzymatic reaction buffers. Reactions were revealed by incubation with 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S (*v/v*) for exactly 1 min. Nuclei were

**Table 1** List of primary antibodies used for immunolabeling experiments

Antibody specificity	Name/clone	Source	Supplier	Dilution
NTPDase1 (CD39)	BU-61	Mouse (IgG1)	Ancell (188-820)	1:500
NTPDase2 (CD39L1)	–	Rabbit	Enzo (ALX-215-045)	1:100
NTPDase2 (CD39L1)	H9s	Mouse (IgG2b)	<a href="http://ectonucleotidases-ab.com">http://ectonucleotidases-ab.com</a>	1 µg/mL
CD10	SP67	Rabbit	Ventana (790-4506)	4.5 µg/mL
α-SMA	–	Rabbit	Abcam (ab5694)	1:200
SUSD2	–	Rabbit	Abcam (ab121214)	1:400
CD146	PIH12	Mouse (IgG1)	Abcam (ab24577)	1:100
PDGFRβ (CD140b)	–	Rabbit	Assay Biotechnology (B0544)	1:100
CD31	–	Rabbit	Abcam (ab28364)	1:50

counterstained with hematoxylin. Samples were mounted with aqueous mounting medium (Fluoromount™, Sigma-Aldrich), observed under light Nikon Eclipse E200 microscope, and photographed under light Leica DMD 108 microscope.

### Combined immunofluorescence staining and in situ ATPase activity experiments

A protocol based on the combination of immunolabeling experiments and the Wachstein/Meisel lead phosphate method was performed, as previously described by Villamonte et al. [36]. Briefly, sample sections were washed twice with PBS and blocked in PBS containing 20% NGS (Gibco), 0.2% Triton, and 0.2% gelatin (Merck) at RT for 1 h. The samples were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies diluted with PBS. The sections were then washed three times with PBS and twice with 50 mM Tris-maleate buffer. In situ ATPase activity experiment was performed in the same sections as indicated above, using 1 mM of ATP as substrate. Subsequently, the tissues were washed three times in PBS before appropriate secondary antibody (Alexa Fluor) was added. After three final washes with PBS, samples were mounted on a glass slide with Prolong Gold antifade reagent with DAPI mounting medium (Thermo Fisher Scientific). The sections were observed and photographed under a light and fluorescence Nikon Eclipse E800 microscope. Immunofluorescence and activity images were merged using Adobe Photoshop CC (vs 20.0).

### Statistical analyses

The predictive analytics software IBM SPSS Statistics v22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the creation of frequency tables with the distribution of NTPDase2 in each endometrial component and the label intensity in each case. Data are compiled in Table 2.

## Results

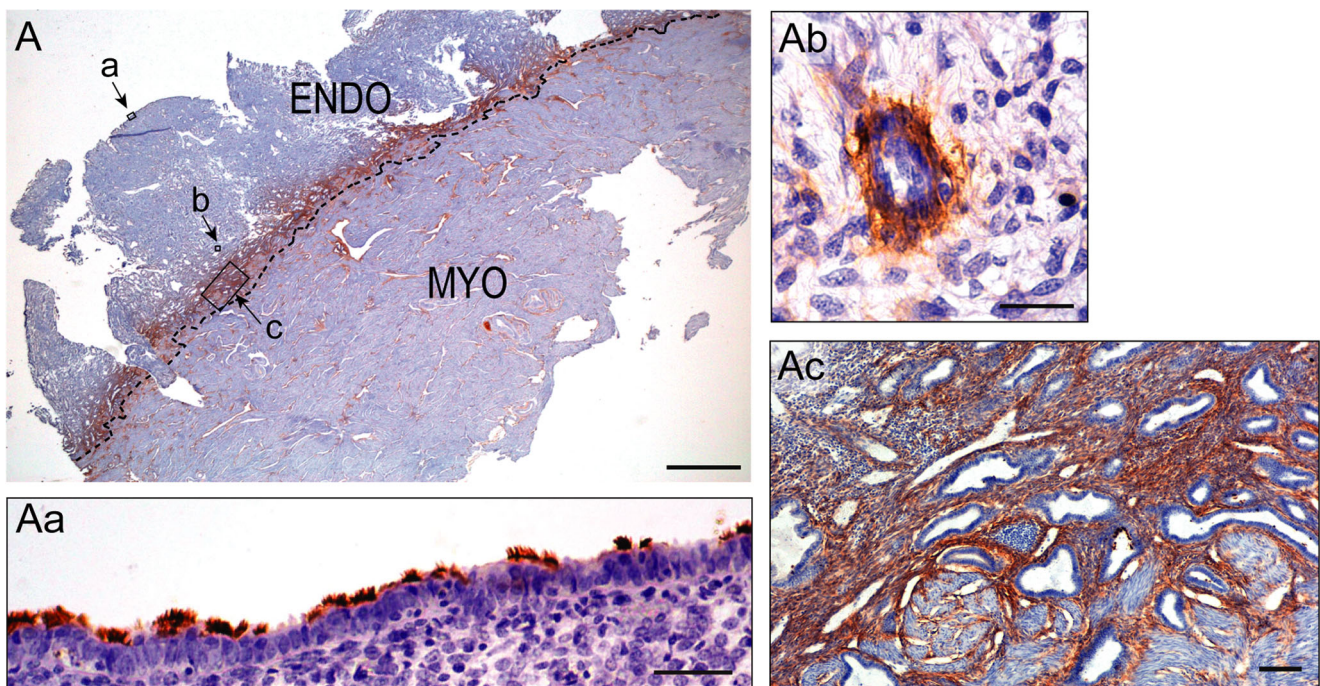
NTPDase2 was detected in the entire length of the cilia of epithelial ciliated cells, in some perivascular cells of both functional and basal layers, and in the stroma only from the basal layer (Fig. 1). ATPase activity coincided with these locations. Combined immunofluorescence and in situ ATPase activity experiments allowed us to simultaneously identify the protein and its enzyme activity (Fig. 2a). Moreover, ATPase activity was inhibited by the E-NTPDase inhibitor POM 1, confirming that a member of the E-NTPDase family is responsible for the hydrolysis of ATP in these structures (Fig. 2b). Distribution and label intensity of NTPDase2 did not show differences at any point in the cycle or with atrophic endometrium (Suppl. Fig. 1).

**Table 2** Summary of NTPDase2 expression in proliferative, secretory and atrophic endometria

	NTPDase2
<i>Proliferative and secretory</i>	
Surface epithelium	+++ <sup>a</sup>
Glandular epithelium	+++ <sup>a</sup>
Stromal cells	
Functional layer	–
Basal layer	+++
Vessels	
Endothelial cells	–
Perivascular cells	+++
<i>Atrophic</i>	
Surface epithelium	+++ <sup>a</sup>
Glandular epithelium	+++ <sup>a</sup>
Endometrial stromal cells	+++
Vessels	
Endothelial cells	–
Perivascular cells	+++

<sup>a</sup> Only cilia from ciliated cells





**Fig. 1** Immunolocalization of NTPDase2 in a human secretory endometrium (Endo) and myometrium (Myo) by immunohistochemistry. Image A shows the immunolabeling of NTPDase 2 at the endometrial stroma but only of the basal layer. Image Aa shows the presence of NTPDase2 in the cilia of ciliated epithelial cells of the surface epithelium.

Ab is a detail of the NTPDase2 immunolabeling in cells in a perivascular location. Ac shows a detail of the basal layer. NTPDase2 antibody used was H9s from <http://ectonucleotidases-ab.com>. Scale bars 2 mm (A), 50  $\mu$ m (Aa), 25  $\mu$ m (Ab), and 100  $\mu$ m (Ac)

In functional layer, NTPDase2 label was limited to perivascular locations. Only occasionally in the proliferative phase, periglandular labeling was seen in the functional layer, but always at the deepest part of the layer. NTPDase2 immunolabeling was strong in the stroma of the basal layer with stronger periglandular label also coinciding with ATPase activity. NTPDase2<sup>+</sup> cells of stroma, including those periglandularly located, were also positive for CD10, a marker of endometrial stroma (Fig. 3). In postmenopausal endometrium, NTPDase2 was present in the stromal cells throughout the endometrium, but strongest periglandularly (Suppl. Fig. 1). To further study NTPDase2<sup>+</sup> cells in relation to the already identified eMSCs, double and triple immunolabelings were performed. Perivascular NTPDase2<sup>+</sup> cells were negative for  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), a marker of pericytes and vascular smooth muscle cells (Fig. 3). Thus, we ruled out the possibility of NTPDase2<sup>+</sup> cells being pericytes. Moreover, triple immunolabeling for NTPDase2 with the pericyte markers CD146 and PDGFR $\beta$ , which when merged identify an endometrial mesenchymal stem cell population (eMSC), did not show colocalization of NTPDase2 and the other two proteins. In fact, CD146- and PDGFR $\beta$ -labeled cells directly wrapped endothelial cells while NTPDase2<sup>+</sup> cells were located more at the periphery (Suppl. Fig. 2). This result confirms that NTPDase2<sup>+</sup> cells are neither pericytes nor PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup> eMSCs. In contrast, we found complete colocalization with the eMSC marker SUSD2, detected

perivascularly in both the functional and basal layers (Fig. 4a). Figure 4b shows this external position of the two proteins in relation to the vessel using antibodies against another member of the E-NTPDase family, NTPDase1, which was expressed by the endothelial cells (Suppl. Fig. 3). These results were obtained in cyclic and postmenopausal endometrium. NTPDase2<sup>+</sup>/SUSD2<sup>+</sup> perivascular cells were also detected in the myometrium (Fig. 4a).

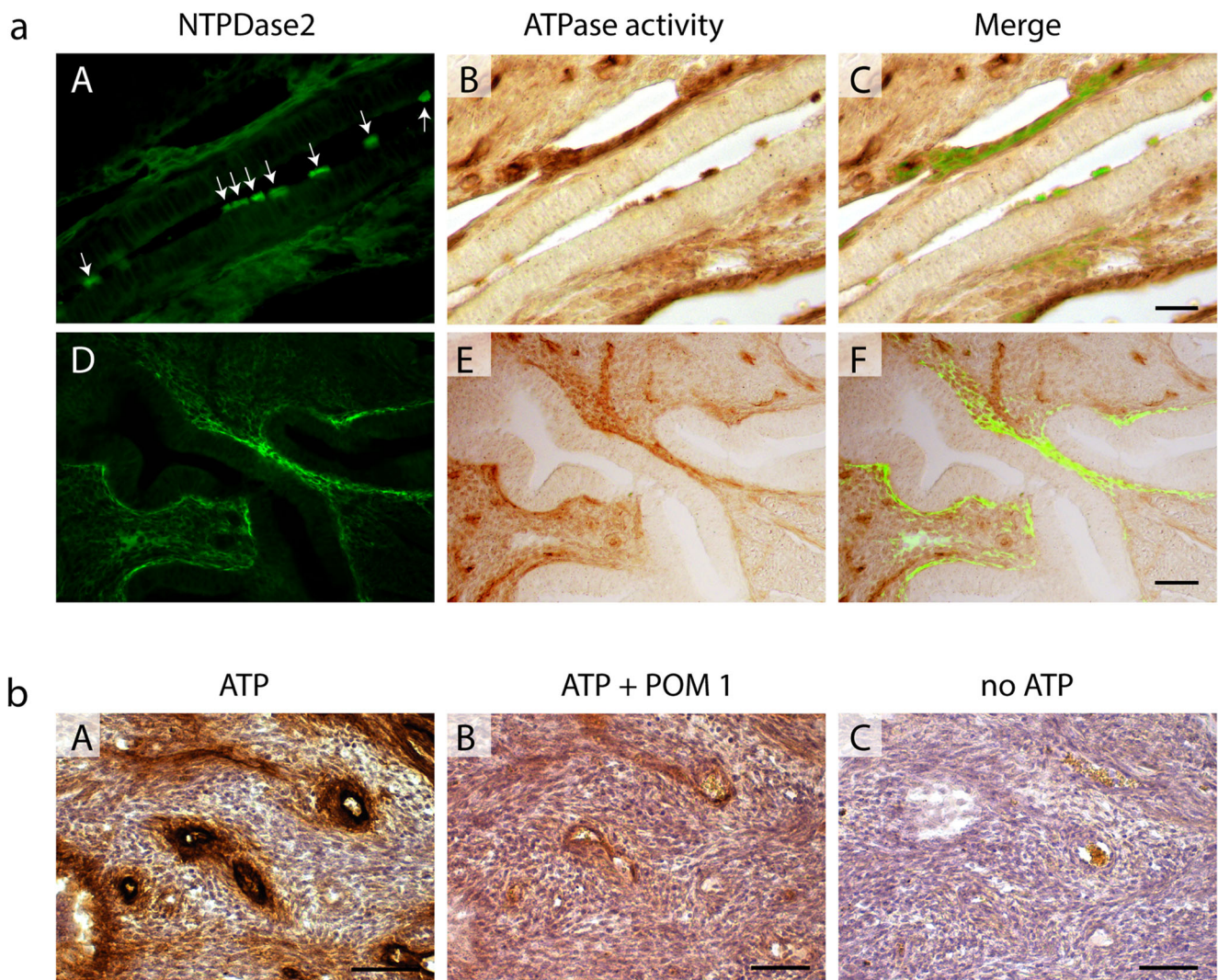
We analyzed adenomyotic lesions, where endometrial tissue is present within the myometrium, and found that the stroma was made up of NTPDase2<sup>+</sup> cells (Fig. 5). Perivascular NTPDase2<sup>+</sup> population was also found in these lesions (data not shown) although the small area of the lesions with minor presence of blood vessels hampered this analysis.

Table 2 is a compilation of the results of distribution and expression levels of NTPDase2 in human endometrium and Fig. 6 puts the NTPDase2 expression in endometrium into context.

## Discussion

Purinergic ligands, such as ATP and adenosine, are signaling molecules that play important roles in reproduction [37], including the regulation of the endometrial functions; they also influence MSC function, contributing to the maintenance of a harmonious stem cell niche [8, 9]. The eMSC are promising





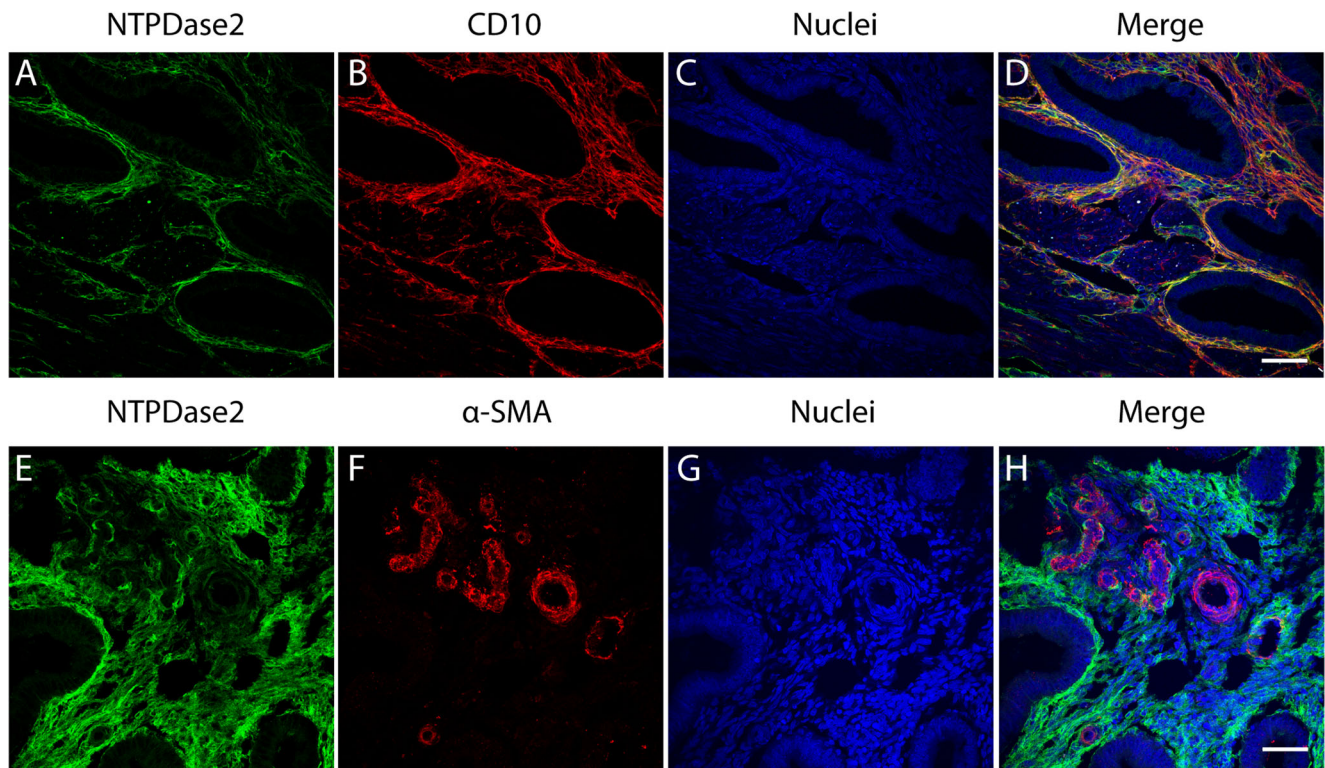
**Fig. 2** **a** Immunofluorescence of NTPDase2 (A, D) and in situ ATPase histochemistry (B, E) in cryosections of a human proliferative endometrium. NTPDase2 was detected by immunofluorescence in the cilia of ciliated epithelial cells (A; *arrows*) and in stromal cells of basal layer (A, D). Higher NTPDase2 expression and ATPase activity was found in periglandular stromal cells (C, F). Merged images (C, F) show that ATPase activity correlates with the immunolabeling of NTPDase2

protein. NTPDase2 antibody used was ALX-215-045 from Enzo. Scale bars 25 (C) and 150  $\mu$ m (F). **b** In situ ATPase activity in functional layer of a proliferative endometrium. ATPase activity was found in endothelial cells and perivascular cells (A). Image B corresponds to the activity experiment of a serial section in the presence of POM 1 inhibitor and shows a huge inhibition of the ATPase activity. Image C shows an activity experiment performed in the absence of substrate. Scale bar 100  $\mu$ m

therapeutic targets due to their possible involvement in the pathogenesis of gynecological diseases, such as endometriosis, adenomyosis, and cancer, and in other tissues for their immunomodulatory, differentiation, and tissue regeneration properties [4, 8, 38, 39]. More studies of the purinome in the MSCs are required in order to increase knowledge of MSC physiology and to identify new therapeutic targets. In the present work, we have characterized, the ectoenzyme NTPDase2 in the human cyclic and postmenopausal endometrium and analyzed its expression in adenomyosis samples.

We found high expression and activity of NTPDase2 in both cyclic and postmenopausal endometria without any change along the cycle or in the atrophic endometrium. Thus, NTPDase2 expression does not seem to be regulated

by the female sex hormones. This is a differential feature in comparison to other ectonucleotidases whose expression fluctuates at points along the cycle [32]. The sustained expression of NTPDase2 throughout the cycle points to the constant need for regulation of the ATP levels in stroma. NTPDase2, in combination with NTPDase1, also present in the stroma, can generate AMP which in turn is converted into adenosine by the action of stromal ecto-5'-nucleotidase (CD73). Considering their abundance, NTPDase2 and CD73 [32] would be the two main ectonucleotidases acting sequentially to generate adenosine in endometrial stroma. We demonstrate NTPDase2 expression, with two different antibodies, in two main locations of endometrium: in cilia from ciliated epithelial cells, especially of the luminal epithelium, which is in accordance with



**Fig. 3** Confocal fluorescence images of the basal layer of a secretory endometrium with antibodies against NTPDase2 (A, E), CD10 (B), and  $\alpha$ -SMA (F). Nuclei were labeled with DAPI (C, G). Merged images show that NTPDase2 colocalizes with CD10 in the stromal cells of basal layer

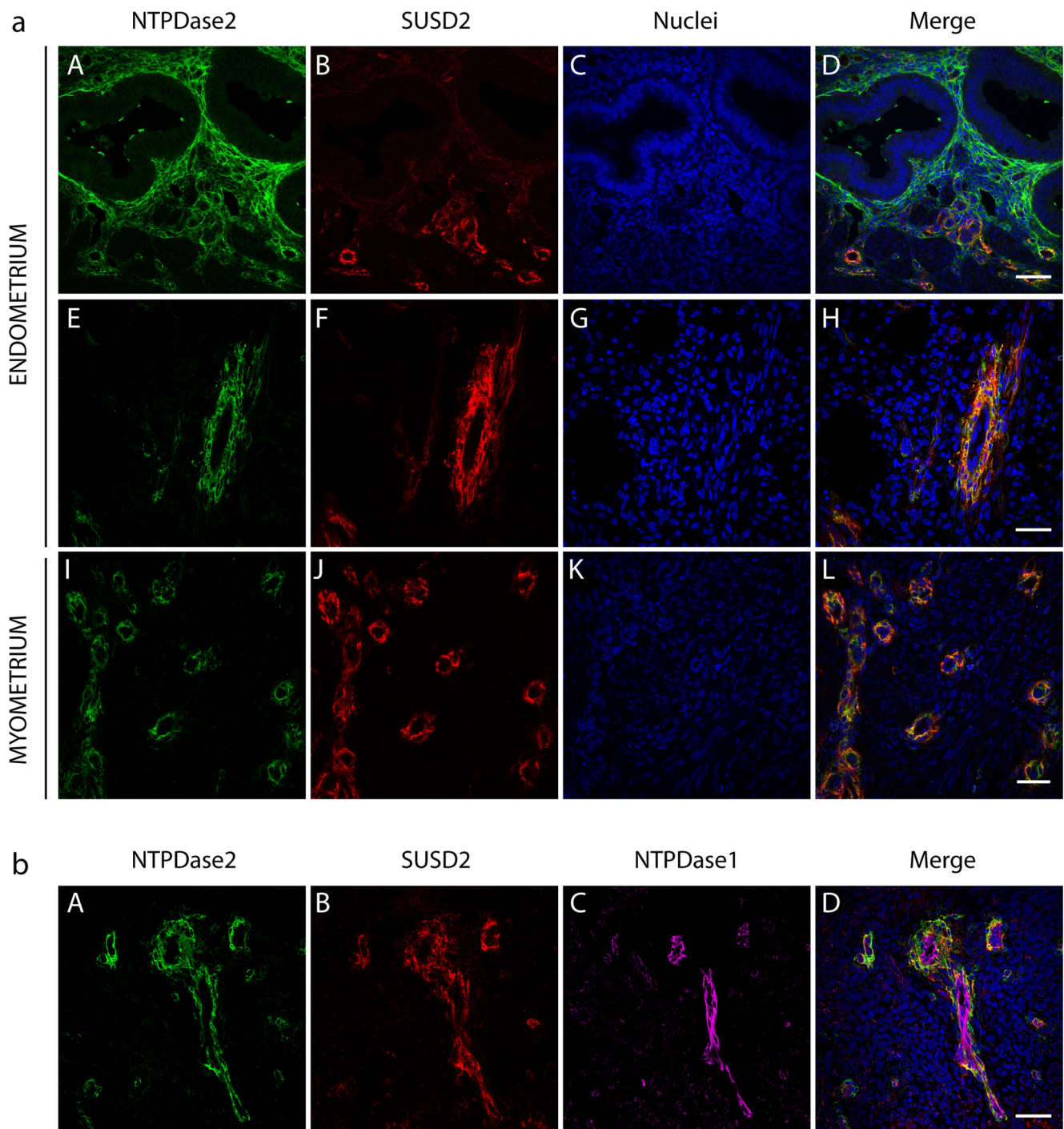
(D) but does not co-occur with the  $\alpha$ -SMA (H) vascular smooth muscle cells marker. NTPDase2 antibody used was H9s from <http://ectonucleotidases-ab.com>. Scale bar 50  $\mu$ m (D, H)

our previous finding of NTPDase2 expression in cilia of Fallopian tubes [36], and, in stromal cells. A striking finding is that only the stroma of the basalis is labeled; in functionalis, labeling was only detected perivascularly. CD10, a marker of stromal cells, labeled all the stroma and clearly colocalized with NTPDase2<sup>+</sup> cells of the basal stroma; the NTPDase2 label was more intense periglandularly. To our knowledge, this is the first cell marker of basal stroma, a finding that is of relevance in the tracing of basal stroma in pathologies, such as adenomyosis, that originate in the basalis. Adenomyosis is a gynecological disease defined by the growth of endometrial cells and their migration into the myometrium. We analyzed adenomyosis samples and found NTPDase2 in the stromal cells of the lesion. Despite the diagnosis of adenomyosis made by histopathology, NTPDase2 represents a suitable marker to separate the limits of ectopic endometrial tissue from the rest of myometrium.

Since the basalis physiologically regenerates the endometrium in every cycle, it is assumed that both epithelial and mesenchymal progenitor cells are located in this basal layer of human endometrium [2, 3, 38–42]. The epithelial progenitor cells are postulated to be contained by the basalis glands [1–3]. N-cadherin<sup>+</sup> epithelial progenitor cells were recently identified in the deep basalis at the bases of endometrial glands [2]. The combination of N-cadherin and the basal

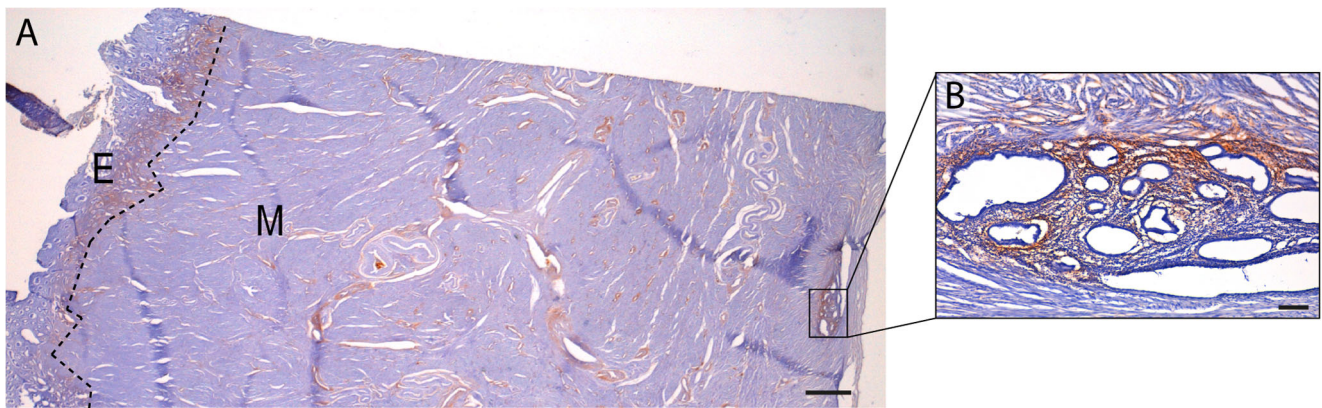
glandular epithelial marker SSEA-1 seems to be a useful tool to determine the differentiation hierarchy of epithelial cells in the basal zone of the gland [2]. Although N-cadherin<sup>+</sup> cells might have some progenitor activity, functional studies confirming this point have not been yet performed. The presence of NTPDase2 surrounding basal glands, and not in functional glands, could be related to the possible action of NTPDase2 in the maintenance of epithelial progenitor cells. In fact, in adult murine neurogenic regions, NTPDase2 is highly expressed in progenitor cells; it is the main ectoenzyme regulating the nucleotide levels of the progenitor cell milieu [27, 28]. Gampe et al. showed an increase in the number of bromodeoxyuridine (BrdU)-positive cells in the neurogenic niches, subventricular zone, and subgranular layer of dentate gyrus, in *Ntpd2* KO mice, but *Ntpd2* deletion does not affect the number of neurons [29]. In addition, *Ntpd2* deletion also leads to increased progenitor cell proliferation in vitro, while the addition of the ATP/ADP-hydrolyzing enzyme apyrase reduced the number of neurosphere cells derived from mice deficient in NTPDase2 expression [29]. These observations suggest that the deletion of NTPDase2 results in an increase in neural progenitor cells. So NTPDase2 may play a role in the proliferation and expansion of neural progenitor cells [29]. The role of NTPDase2 identified in neurogenic regions might well also be found in other stem cell niches, such as the





**Fig. 4 a** Confocal fluorescence images of a secretory (A–D) and a proliferative (E–H) endometrium and myometrium (I–L) labeled with the antibodies against NTPDase2 (A, E, I) and the eMSC marker SUSD2 (B, F, J). Nuclei were labeled with DAPI (C, G, K). The images A–D show part of the basal layer of a secretory endometrium. NTPDase2 label is present in cilia of ciliated cells of glands, in stromal cells, especially periglandularly, and in perivascular cells. Images E–H show a detail of an endometrial vessel localized in the functional layer of a proliferative endometrium and images I–L show a detail of the vessels in myometrium. NTPDase2 is only present in perivascular cells (E, I).

The eMSC marker SUSD2 is present in perivascular cells (B, F, J). Merge images (D, H, L) show the colocalization of NTPDase2 and SUSD2 in the perivascular cells. Scale bars 50  $\mu$ m (D, H) and 35  $\mu$ m (L). **b** Immunolocalization of NTPDase2 (A), SUSD2 (B), and NTPDase1 (C) in the vessel of an atrophic endometrium. Nuclei were labeled with DAPI. NTPDase2 (A) and SUSD2 (B) were present in perivascular cells while NTPDase1 was detected in endothelial cells (C). Merged image shows the colocalization of NTPDase2 and SUSD2 in perivascular cells (D). Scale bar 50  $\mu$ m (D) NTPDase2 antibody used in all the experiments shown in this figure was H9s from <http://ectonucleotidases-ab.com>



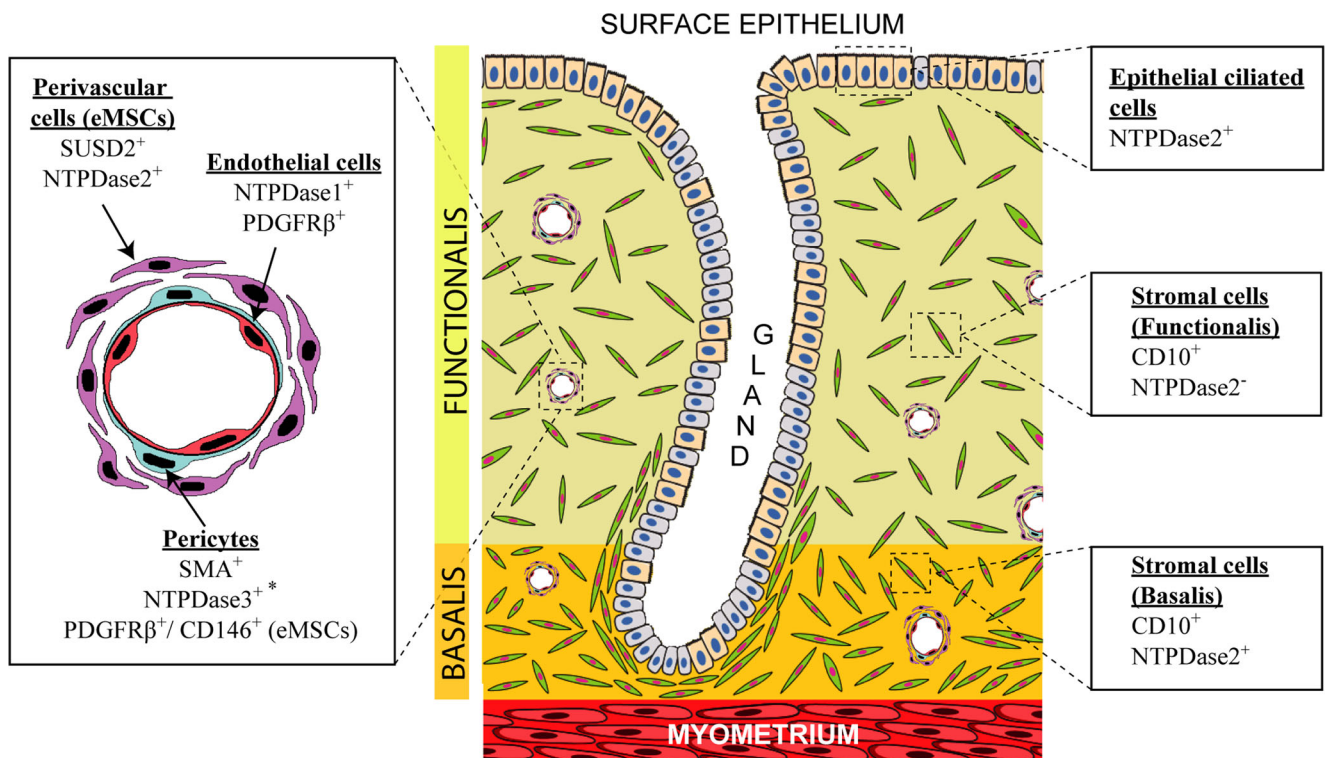
**Fig. 5** Immunolocalization of NTPDase2 in a human uterus with adenomyosis. Image A shows the immunolabeling of NTPDase2 at the stroma of the basal layer of the endometrium and at the stroma of

adenomyosis lesion. B shows a detail of adenomyosis lesion with the presence of NTPDase2. NTPDase2 antibody used was H9s from <http://ectonucleotidases-ab.com>. Scale bars 1 mm (A) and 100  $\mu\text{m}$  (B)

endometrial basal layer. Other proteins such as Musashi-1, an RNA-binding protein identified in neural stem cells and also an epithelial progenitor cell marker, were also detected in human endometrium, mainly in the basalis in the proliferative phase [43], suggesting their possible progenitor cell function. Some stromal Musashi-1 positive cells were found in the periglandular region, where some stromal label-retaining cells were found in mouse endometrium [39, 43, 44]. It is likely that the periglandular expression of NTPDase2 matches with the periglandular clusters of stromal Musashi-1<sup>+</sup> cells. The ATP-adenosine balance is a key regulator of progenitor/stem cell

pathophysiology, involved in the differentiation and self-renewal of stem cells [21]. Further work is needed to determine the action of NTPDase2 in the progenitor/stem cell function in endometrium.

A notable result of this work is the identification of NTPDase2 as a mesenchymal progenitor marker since it is expressed in SUSD2<sup>+</sup> eMSCs, which constitute the most abundant population of MSCs in human endometrium, representing 4.2% of the stromal cell population [5], almost three times more abundant than the PDGF $\beta$ <sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> cells [45]. The presence and activity of NTPDase2 in the



**Fig. 6** Schematic representation of human endometrium showing the main distribution findings for NTPDase2 and other proteins. NTPDase3 is only present in spiral arteries (*asterisk*) [32]



perivascular SUSD2<sup>+</sup> eMSCs in cyclic and atrophic endometria is in line with previous findings suggesting that human endometrium is a source of MSCs independently of the woman's age [47]. Our results point to a role for NTPDase2 in the biological properties of the endometrial stem cells throughout the woman's life.

The presence of NTPDase2 in eMSCs entails the hydrolysis of ATP and a sustained ADP accumulation in the stem cell niche. Different studies performed *in vivo* and *in vitro* in recent years have demonstrated that MSCs release ATP and nucleosides constitutively or in response to mechanical or chemical stimulation [21]. Moreover, MSCs are sensitive to these purinergic signaling effectors due to their broad expression of purinergic receptors on their plasma membranes, including ATP and ADP receptors [10, 13, 16, 17, 48, 49]. In fact, both ATP and adenosine are involved in the immunomodulatory capacity and in the lineage commitment of the MSCs. Nucleotides have been associated with the proliferation [8, 10, 11, 13, 21, 50] and differentiation of MSCs [16, 17, 48], while adenosine is involved in the survival of MSCs [8], proliferation (with an opposite ATP effect) [21], and lineage commitment [15, 19, 48]. Given the implications of nucleotides and nucleosides in the maintenance and behavior of MSCs, ectonucleotidases play a necessary role in the maintenance of the homeostasis of the perivascular stem cell niche. Indeed, the remarkable machinery of ATP hydrolysis is present in this vascular environment, where, in addition to the expression of NTPDase2 in eMSCs, other members of the NTPDase family are present: NTPDase1 is expressed by endothelial cells and NTPDase3 is found in  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> pericytes of spiral arteries [32].

We also find NTPDase2<sup>+</sup>SUSD2<sup>+</sup> perivascular cells in human myometrium, pointing to the presence of an equivalent number of MSCs as found in the endometrium, which is consistent with the shared embryonic origin of the two tissues. In fact, Patterson et al. identified PGFR $\beta$ <sup>+</sup>CD146<sup>+</sup> perivascular, possibly progenitor, cells in murine myometrium [50] although functional studies need to be done. They found that this population of cells was label-retaining and not sensitive to female hormones, two features that indicate their possible role as progenitor cells in the myometrium. Functional studies with myometrial are needed with this NTPDase2<sup>+</sup>SUSD2<sup>+</sup> perivascular cell population.

In conclusion, NTPDase2 is a marker of the endometrial stromal basal layer of utility in tracing adenomyosis. Moreover, the NTPDase2 antibodies label SUSD2<sup>+</sup> perivascular cells, pointing to their usefulness in improving isolation of uterine mesenchymal progenitor cells to be used in regenerative medicine. The findings from our study provide new information about the purinergic signaling in the healthy endometrium and its physiological regeneration. Further investigation into the specific involvement of NTPDase2 in the physiology of eMSCs, human fertility, and endometrial

pathology is essential for the development of new therapeutic strategies in regenerative medicine.

**Acknowledgments** This study was supported by a grant from the *Instituto de Salud Carlos III* (FIS PI15/00036), co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-“a Way to Build Europe”-/FONDOS FEDER “una manera de hacer Europa,” and a grant from the *Fundación Merck Salud* (Ayuda Merck de Investigación 2016-Fertilidad). ARM was awarded a fellowship from the *Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)*. JS received support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and was the recipient of a “Chercheur National” research award from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). We thank CERCA Programme (Generalitat de Catalunya) for institutional support. We are grateful to Inmaculada Gómez de Aranda for technical support and to Benjamín Torrejón of Serveis Científics I Tecnològics (Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona). The authors thank Tom Yohannan for language editing.

**Funding** This study was funded by Instituto de Salud Carlos III (grant number FIS PI15/00036); FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-“a Way to Build Europe”; Fundación Merck Salud (Ayuda Merck de Investigación 2016-Fertilidad).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments, or comparable ethical standards.

**Informed consent** Informed consent was obtained from all individual participants in the study.

## References

- Gargett CE, Schwab KE, Deane JA (2016) Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod Update* 22(2): 137–163. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv051>
- Nguyen HTP, Xiao L, Deane JA, Tan K, Cousins FL, Masuda H, Sprung CN, Rosamilia A, Gargett CE (2017) N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by *in vitro* stem cell assays. *Hum Reprod* 32(11):2254–2268. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex289>
- Valentijn AJ, Palial K, Al-lamee H, Tempest N, Drury J, Von Zglinicki T, Saratzki G, Murray P, Gargett CE, Hapangama DK (2013) SSEA-1 isolates human endometrial basal glandular epithelial cells: phenotypic and functional characterization and implications in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod* 28(10): 2695–2708. <https://doi.org/10.1093/humrep/det285>
- Schwab KE, Gargett CE (2007) Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 22(11):2903–2911. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem265>
- Masuda H, Anwar SS, Bühring HJ, Rao JR, Gargett CE (2012) A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplant* 21(10):2201–2214. <https://doi.org/10.3727/096368911X637362>

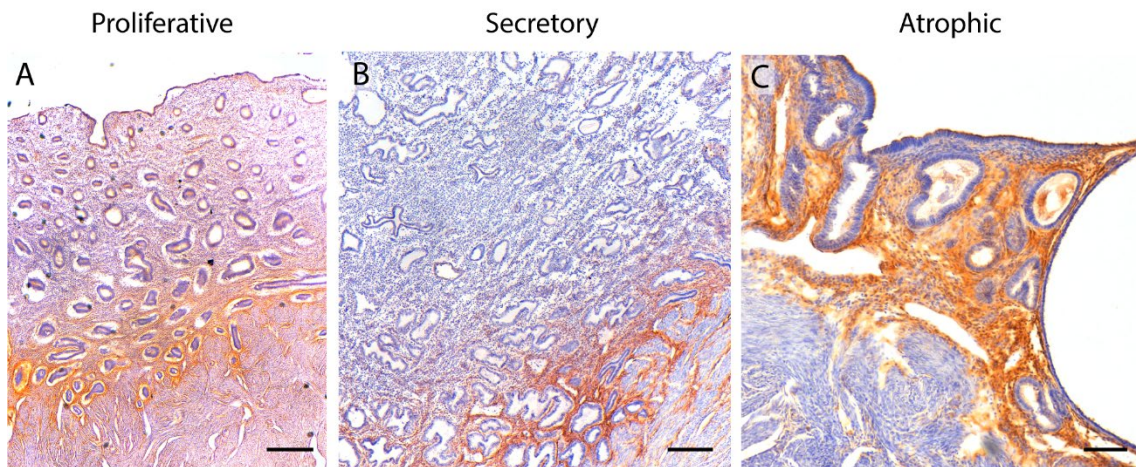
6. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo C, Sun B, Zheng B, Zheng L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badyaluk S, Bühring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3(3):301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
7. Vezzani B, Pierantozzi E, Sorrentino V (2018) Mesenchymal stem cells: from the perivascular environment to clinical applications. *Histol Histopathol*. <https://doi.org/10.14670/HH-11-998>
8. Scarfi S (2014) Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J Stem Cells* 6(2):153–162. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.153>
9. Cavaliere F, Donno C, D'Ambrosi N (2015) Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Front Cell Neurosci* 9(211). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00211>
10. Coppi E, Pugliese AM, Urbani S, Melani A, Cerbai E, Mazzanti B, Bosi A, Saccardi R, Pedata F (2007) ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25(7):1840–1849. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0669>
11. Ichikawa J, Gemba H (2009) Cell density-dependent changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization via the P2Y<sub>2</sub> receptor in rat bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 219(2):372–381. <https://doi.org/10.1002/jcp.21680>
12. Katebi M, Soleimani M, Cronstein BN (2009) Adenosine A<sub>2A</sub> receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J Leukoc Biol* 85(3):438–444. <https://doi.org/10.1189/jlb.0908520>
13. Ferrari D, Gulinelli S, Salvestrini V, Lucchetti G, Zini R, Manfredini R, Caione L, Piacibello W, Ciciarello M, Rossi L, Idzki M, Ferrari S, Di Virgilio F, Lemoli RM (2011) Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Exp Hematol* 39(3):360–374. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.12.001>
14. Fruscione F, Scarfi S, Ferraris C, Bruzzone S, Benvenuto F, Guida L, Uccelli A, Salis A, Usai C, Jacchetti E, Ilengo C, Scaglione S, Quarto R, Zocchi E, De Flora A (2011) Regulation of human mesenchymal stem cell functions by an autocrine loop involving NAD<sup>+</sup> release and P2Y<sub>11</sub>-mediated signaling. *Stem Cells Dev* 20(7):1183–1198. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0295>
15. Carroll SH, Wigner NA, Kulkarni N, Johnston-Cox H, Gerstenfeld LC, Ravid K (2012) A<sub>2B</sub> adenosine receptor promotes mesenchymal stem cell differentiation to osteoblasts and bone formation in vivo. *J Biol Chem* 287(19):15718–15727. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.344994>
16. Zippel N, Limbach CA, Ratajski N, Urban C, Luparello C, Pansky A, Kassack MU, Tobiasch E (2012) Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 21(6):884–900. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0576>
17. Sun D, Junger WG, Yuan C, Zhang W, Bao Y, Qin D, Wang C, Tan L, Qi B, Zhu D, Zhang X, Yu T (2013) Shockwaves induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through ATP release and activation of P2X<sub>7</sub> receptors. *Stem Cells* 31(6):1170–1180. <https://doi.org/10.1002/stem>
18. Chen M, Su W, Lin X, Guo Z, Wang J, Zhang Q, Bramd D, Ryffel B, Huang J, Liu Z, He X, Le AD, Zheng SG (2013) Adoptive transfer of human gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis via suppression of Th1 and Th17 cells and enhancement of regulatory T cell differentiation. *Arthritis Rheum* 65(5):1181–1193. <https://doi.org/10.1002/art.37894>
19. Ode A, Schoon J, Kurtz A, Gaetien M, Ode JE, Geissier S, Duda GN (2013) CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater* 25:37–47. <https://doi.org/10.22203/eCM.v025a03>
20. Naasani LIS, Rodrigues C, de Campos RP, Beckenkamp LR, Iser IC, Bertoni APS, Wink MR (2017) Extracellular nucleotide hydrolysis in dermal and limbal mesenchymal stem cells: a source of adenosine production. *J Cell Biochem* 118:2430–2442. <https://doi.org/10.1002/jcb.25909>
21. Roszek K, Wujak M (2018) How to influence the mesenchymal stem cells fate? Emerging role of ectoenzymes metabolizing nucleotides. *J Cell Physiol*. <https://doi.org/10.1002/jcp.26904>
22. Zimmerman H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8(3):437–502. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>
23. Yegutkin GG (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49(6):473–497. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>
24. Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Simmermann H, Robson SC (2002) Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implication for thromboregulation. *Blood* 99(8):2801–2809. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2801>
25. Kishore BK, Isaac J, Fausther M, Tripp SR, Shi H, Gill PS, Braun N, Zimmermann H, Sévigny J, Robson SC (2005) Expression of NTPDase1 and NTPDase2 in murine kidney: relevance to regulation of P<sub>2</sub> receptor signaling. *Am J Physiol Ren Physiol* 288(5):F1032–F1043. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00108.2004>
26. Feldbrügge L, Jiang ZG, Csizmadia E, Mitsuhashi S, Tran S, Yee EU, Rothweller S, Vaid KA, Sévigny J, Schmelzle M, Popov YV, Robson SC (2017) Distinct roles of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in liver regeneration and fibrosis. *Purinergic Signal* 14(1):37–46. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9590-3>
27. Shukla V, Zimmermann H, Wang L, Kettenmann H, Raab S, Hammer K, Sévigny J, Robson SC, Braun N (2005) Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J Neurosci Res* 80(5):600–610. <https://doi.org/10.1002/jnr.20508>
28. Mishra SK, Braun N, Shukla V, Füllgrabe M, Schomerus C, Korff HW, Gachet C, Ikehara Y, Sévigny J, Robson SC, Zimmermann H (2006) Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* 133(4):675–684. <https://doi.org/10.1242/dev.02233>
29. Gampe K, Stefani J, Hammer K, Brendel P, Pöttsch A, Enikolopov G, Enyoji K, Acker-Palmer A, Robson SC, Zimmermann H (2015) NTPDase2 and purinergic signaling control progenitor cell proliferation in neurogenic niches of the adult mouse brain. *Stem Cells* 33(1):253–264. <https://doi.org/10.1002/stem.1846>
30. Martín-Satué M, Lavoie ÉG, Pelletier J, Fauster M, Csizmadia E, Guckelberger O, Robson SC, Sévigny J (2009) Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* 131:615–628. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0551-3>
31. Arase T, Uchida H, Kajitani T, Ono M, Tamaki K, Oda H, Nishikawa S, Kagami M, Nagashima T, Masuda H, Asada H, Yoshimura Y, Maruyama T (2009) The UDP-glucose receptor P2R14 triggers innate mucosal immunity in the female reproductive tract by inducing IL-8. *J Immunol* 182(11):7074–7084. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900001>
32. Aliagas E, Vidal E, Torrejón-Escribano B, Taco MR, Ponce J, de Aranda IG, Sévigny J, Condom E, Martín-Satué M (2013) Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal* 9(2):227–237. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9345-0>

33. Von Kügelgen I, Hoffmann K (2016) Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* 106:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.030>
34. Wachstein M, Meisel E, Niedzwiedz A (1960) Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead-adenosine triphosphate technique. *J Histochem Cytochem* 8:387–388. <https://doi.org/10.1177/8.5.387>
35. Aliagas E, Vidal A, Teixidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M (2014) High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediat Inflamm* 2014(509027):1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/509027>
36. Villamonte ML, Torrejón-Escribano B, Rodríguez-Martínez A, Traperó C, Vidal A, de Aranda IG, Sévigny J, Matías-Guiu M-SM (2018) Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity. *Histochem Cell Biol* 149(3):269–276. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1627-8>
37. Burnstock G (2013) Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. *Purinergic Signal* 10(1):157–187. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9399-7>
38. Cousins FL, O DF, Gargett CE (2018) Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 50:27–38. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.01.011>
39. Tempest N, Maclean A, Hapangama DK (2018) Endometrial stem cell markers: current concepts and unresolved questions. *Int J Mol Sci* 19(10):E3240. <https://doi.org/10.3390/ijms19103240>
40. Gargett CE (2007) Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update* 13(1):87–101. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml045>
41. Cervelló I, Mirantes C, Santamaria X, Dolcet X, Matias-Guiu X, Simón C (2011) Stem cells in human endometrium and endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 30(4):317–327. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e3182102754>
42. Gargett CE, Masuda H (2010) Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* 16(11):818–834. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq061>
43. Gotte M, Wolf M, Staebler A, Buchweitz O, Kelsch R, Schuring AN, Kiesel L (2008) Increased expression of the adult stem cell marker mushashi-1 in endometriosis and endometrial carcinoma. *J Pathol* 215(3):317–329. <https://doi.org/10.1002/path.2364>
44. Chan RW, Gargett CE (2006) Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells* 24(6):1529–1538. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0411>
45. Darzi S, Werkmeister JA, Deane JA, Ce G (2016) Identification and characterization of human endometrial mesenchymal stem/stromal cells and their potential for cellular therapy. *Stem Cells Transl Med* 5(9):1127–1132. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0190>
46. Ulrich D, Tan KS, Deane J, Schwab K, Cheong A, Rosamilia A, Gargett CE (2014) Mesenchymal stem/stromal cells in postmenopausal endometrium. *Hum Reprod* 29(9):1895–1905. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu159>
47. Ciciarello M, Zini R, Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, Manfredini R, Lemoli RM (2013) Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages. *Stem Cells Dev* 22(7):1097–1111. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0432>
48. D'Alimonte I, Nargi E, Lannutti A, Marchisio M, Pierdomenico L, Costanzo G, Di Iorio P, Ballerini P, Giuliani F, Ciccarelli R (2013) Adenosine A1 receptor stimulation enhances osteogenic differentiation of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells via WNT signalling. *Stem Cell Res* 11(1):611–624. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.04.002>
49. Czarnecka J, Porowińska D, Bajek A, Holysz M, Roszek K (2017) Neurogenic differentiation of mesenchymal stem cells induces alterations in extracellular nucleotides metabolism. *J Cell Biochem* 118(3):478–486. <https://doi.org/10.1002/jcb.25664>
50. Patterson AL, George J, Chatterjee A, Carpenter T, Wolfrum E, Pru JK, Teixeira JM (2018) Label-retaining, putative mesenchymal stem cells contribute to repair of the myometrium during uterine involution. *Stem Cells Dev* 27:1715–1728. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0146>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

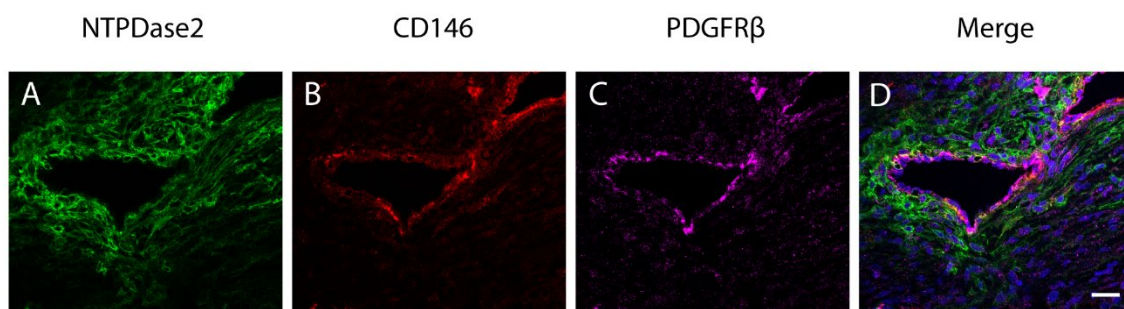


## Material suplementari 1



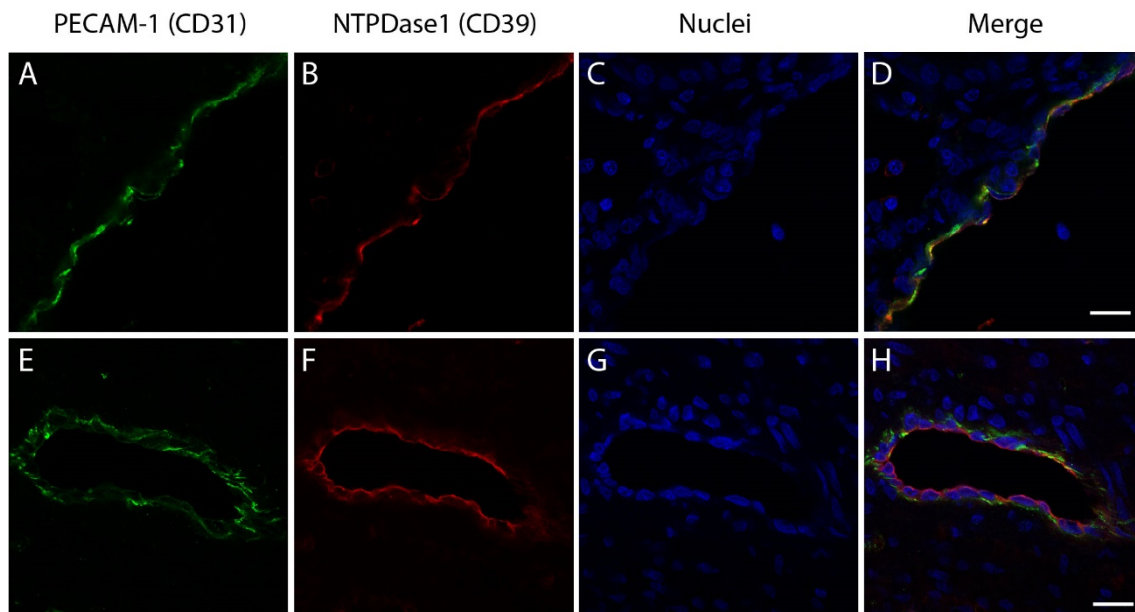
**Suppl. Fig. 1** Immunolocalization of NTPDase2 in human proliferative (**A**), secretory (**B**), and atrophic (**C**) endometrium. Stroma is labelled in the three cases although labelling is restricted to basal layer in cyclic endometria (**A**, **B**). NTPDase2 antibodies used were ALX-215-045 from Enzo (**A**, **C**) and H9s from <http://ectonucleotidases-ab.com> (**B**). Scale bars 400  $\mu\text{m}$  (**A**), 300  $\mu\text{m}$  (**B**), and 100  $\mu\text{m}$  (**C**).

## Material suplementari 2



**Suppl. Fig. 2** Confocal fluorescence images of some vessels of human atrophic endometrium labeled with NTPDase2 (A), CD146 (B), and PDGFR $\beta$  (C). Merged image shows a more external position of NTPDase2<sup>+</sup> cells than CD146- and PDGFR $\beta$ -positive cells in the perivascular region (D). NTPDase2 antibody used was H9s from <http://ectonucleotidases-ab.com>. Scale bar 25  $\mu$ m (D).

## Material suplementari 3



**Suppl. Fig. 3** Confocal fluorescence images of endometrial blood vessels labeled with PECAM-1 (CD31) and NTPDase1 (CD39). Endothelial cells labelled with CD31 (**A, E**) are also positive for NTPDase1 (**B, F**) as shown in merge images (**D, H**). Scale bars 20  $\mu\text{m}$ .



## **CAPÍTOL 4**

### **L'expressió aberrant de les ectonucleotidases en teixit endometrial ectòpic i eutòpic està a favor de l'acumulació d'ATP en el microambient tissular en l'endometriosis**

**Impaired Expression of Ectonucleotidases in Ectopic and Eutopic Endometrial Tissue Is in Favor of ATP Accumulation in the Tissue Microenvironment in Endometriosis.**

Trapero C, Vidal A, Fernandez-Montoli ME, Coroleu B, Tresserra F, Barri P, Gomez de Aranda I, Seigny J, Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M.

**International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(22):5532**



En el capítol 1 de la present tesi doctoral s'ha observat una expressió significativament superior d'alguns enzims encarregats de metabolitzar l'ATP i l'adenosina en el fluid contingut en endometriomes en comparació amb el contingut de quists ovàrics simples, coincidint amb l'increment de l'activitat nucleotidasa detectat prèviament pel nostre grup en els mateixos fluids [234]. Tot i la possible implicació de les ectonucleotidases en la malaltia, no s'han realitzat estudis on es caracteritzi la seva expressió en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis i es determinin expressions diferencials respecte a l'endometri de dones sense la patologia.

En aquest capítol hem caracteritzat l'expressió de les ectonucleotidases en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb la malaltia. Concretament, hem estudiat per assajos d'immunohistoquímica i immunofluorescència l'expressió de les ectonucleotidases CD39, NTPDasa2, NTPDasa3, NPP3, CD73 i de l'enzim CD26, així com la determinació *in situ* de les seves activitats nucleotidasa, amb i sense presència d'inhibidors específics en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic, i en endometris de dones sense la patologia com a control, definint la localització específica de cada ectonucleotidasa estudiada. Determinar l'expressió i avaluar la participació d'aquestes proteïnes, directament involucrades en la degradació de l'ATP, en l'endometriosis, pot contribuir en definir noves dianes o vies moleculars implicades en la malaltia que podrien ser útils per a la millora de les eines diagnòstiques i terapèutiques actuals.

Les principals troballes d'aquest estudi són:

- 1) La **pèrdua d'expressió de CD39** en l'**estroma del teixit endometrial eutòpic i en l'estroma endometrial de les lesions profundes** en dones amb endometriosis (veure capítol 4, Figura 1).
- 2) La **pèrdua d'expressió de l'NTPDasa2** en l'**estroma endometrial de les lesions ovàriques** (veure capítol 4, Figura 3).
- 3) La **pèrdua d'expressió de l'NTPDasa3** en les **cèl·lules epitelials de les lesions profundes i de les artèries espirals de l'endometri eutòpic** de dones amb endometriosis (veure capítol 4, Figura 4).
- 4) L'**expressió de novo de l'NPP3** en les **cèl·lules estromals del teixit endometrial eutòpic i ectòpic** de dones amb endometriosis (veure capítol 4, Figura 5).
- 5) La **pèrdua de CD73** en l'**estroma dels endometris de tipus atròfic** de dones amb endometriosis i en l'**estroma de les lesions ovàriques i profundes** (veure capítol 4, Figura 6).

Aquestes troballes mostren una expressió diferencial de les ectonucleotidases en el teixit endometrial eutòpic en comparació amb l'endometri de dones sense la patologia, i diferències d'expressió entre el teixit endometrial ectòpic de les principals formes de manifestació d'endometriosis (lesions peritoneals, ovàriques i profundes). Els principals canvis s'han detectat en les cèl·lules estromals. Hem determinat la pèrdua de l'eix CD39-CD73, la principal ruta d'hidròlisi de l'ATP, en les lesions endometriòtiques profundes, la forma de presentació més greu



de la malaltia. Aquesta situació apunta a una acumulació de l'ATP en el microambient del teixit endometrial que possiblement estigui implicada en el dolor i la infertilitat associada a la malaltia. Per una altra banda, l'expressió *de novo* de l'NPP3 en l'estroma endometrial exclusivament en les dones amb endometriosis presenta l'NPP3 com un marcador histològic de l'endometriosis.

Aquest estudi s'ha publicat en la revista [International Journal of Molecular Sciences](#) [2019;20\(22\):5532](#). doi: [10.3390/ijms20225532](#). Aquest treball no ha estat utilitzat per a la realització de cap altre tesi doctoral. La doctoranda ha participat en el disseny de l'estudi, la realització dels experiments, la discussió dels resultats i l'escriptura de l'article.



Article

# Impaired Expression of Ectonucleotidases in Ectopic and Eutopic Endometrial Tissue Is in Favor of ATP Accumulation in the Tissue Microenvironment in Endometriosis

Carla Trapero <sup>1,2</sup> , August Vidal <sup>1,2,3</sup> , Maria Eulàlia Fernández-Montolí <sup>2,4</sup> ,  
Buenaventura Coroleu <sup>5</sup> , Francesc Tresserra <sup>5</sup> , Pere Barri <sup>5</sup>, Inmaculada Gómez de Aranda <sup>1</sup>,  
Jean Sévigny <sup>6,7</sup>, Jordi Ponce <sup>2,4</sup>, Xavier Matias-Guiu <sup>2,3</sup> and Mireia Martín-Satué <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona, 08907 Barcelona, Spain; ctrapero@idibell.cat (C.T.); avidal@bellvitgehospital.cat (A.V.); igomezdearanda@ub.edu (I.G.d.A.)

<sup>2</sup> Oncobell Program, CIBERONC, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), 08908 Barcelona, Spain; mefernandez@bellvitgehospital.cat (M.E.F.-M.); jponce@bellvitgehospital.cat (J.P.); fjmatiasguiu.lleida.ics@gencat.cat (X.M.-G.)

<sup>3</sup> Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, 08907 Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Servei de Ginecologia, Hospital Universitari de Bellvitge, 08907 Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Salut de la Mujer Dexeus, Hospital Universitari Quiron Dexeus, 08028 Barcelona, Spain; VENCOR@dexeus.com (B.C.); francesc.tresserra@quironsalud.es (F.T.); barper@dexeus.com (P.B.)

<sup>6</sup> Centre de Recherche du CHU de Québec - Université Laval, Québec City, QC G1V 4G2, Canada; jean.sevigny@crchudequebec.ulaval.ca

<sup>7</sup> Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec City, QC G1V 4G2, Canada

\* Correspondence: martinsatue@ub.edu

Received: 16 September 2019; Accepted: 2 November 2019; Published: 6 November 2019



**Abstract:** Endometriosis is a prevalent disease defined by the presence of endometrial tissue outside the uterus. Adenosine triphosphate (ATP), as a proinflammatory molecule, promotes and helps maintain the inflammatory state of endometriosis. Moreover, ATP has a direct influence on the two main symptoms of endometriosis: infertility and pain. Purinergic signaling, the group of biological responses to extracellular nucleotides such as ATP and nucleosides such as adenosine, is involved in the biology of reproduction and is impaired in pathologies with an inflammatory component such as endometriosis. We have previously demonstrated that ectonucleotidases, the enzymes regulating extracellular ATP levels, are active in non-pathological endometria, with hormone-dependent changes in expression throughout the cycle. In the present study we have focused on the expression of ectonucleotidases by means of immunohistochemistry and in situ activity in eutopic and ectopic endometrial tissue of women with endometriosis, and we compared the results with endometria of women without the disease. We have demonstrated that the axis CD39-CD73 is altered in endometriosis, with loss of CD39 and CD73 expression in deep infiltrating endometriosis, the most severe, and most recurring, endometriosis subtype. Our results indicate that this altered expression of ectonucleotidases in endometriosis boosts ATP accumulation in the tissue microenvironment. An important finding is the identification of the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (NPP3) as a new histopathological marker of the disease since we have demonstrated its expression in the stroma only in endometriosis, in both eutopic and ectopic tissue. Therefore, targeting the proteins directly involved in ATP breakdown could be an appropriate approach to consider in the treatment of endometriosis.

**Keywords:** endometriosis; endometrium; uterus; purinergic signaling; ATP

## 1. Introduction

Endometriosis is a chronic gynecological estrogen-dependent disease characterized by the presence of endometrial tissue, both glands and stroma, outside the uterus. There are multiple possible locations for this ectopic tissue which may be grouped into three endometriosis subtypes: peritoneal, ovarian, with ovarian cysts called endometriomas, and deeply infiltrative. It is a debilitating disorder affecting around 10% of women of reproductive age [1], with pelvic pain and infertility as the two main symptoms. The etiology and physiopathology of this disease remain unknown and there are no clinical biomarkers; in consequence, there is no cure and a long delay in the diagnosis. Studies focused on the discovery of diagnostic tools for endometriosis to help to design effective treatments that preserve fertility are of great interest.

Inflammation is necessary for the establishment and maintenance of endometrial cells in ectopic locations [2–5]. Purinergic signaling, the group of biological effects mediated by extracellular nucleotides, such as adenosine triphosphate (ATP), and nucleosides, such as adenosine, is involved in a wide range of physiological and pathological inflammatory conditions [6]. Extracellular ATP is mostly a proinflammatory molecule released during tissue stress situations, such as necrosis or apoptosis, hypoxia, and inflammation. Purinergic signaling is also studied in the context of human reproduction [7–11]; for instance, ATP is involved in the initiation and maintenance of myometrium and oviduct contractions. It increases the oviductal ciliary beat frequency [12] and contributes to the regulation of the uterine fluid microenvironment [9]. Moreover, adenosine, an ATP hydrolysis product, is necessary for sperm capacitation [10]. ATP is also a pain-related molecule, and some of the pharmacological treatments used to relieve pain in endometriosis do indeed affect ATP levels or their effects. Moreover, extracellular ATP and its derivative adenosine influence cell migration, proliferation and survival—three necessary events for the establishment of ectopic endometrial foci.

Extracellular ATP and adenosine levels are controlled by the ecto-nucleotidases, which are broadly expressed enzymes that, acting alone or sequentially, hydrolyze ATP into adenosine. There are four families of ectonucleotidases: (i) the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family, also known as CD39 family, which hydrolyzes the ATP, and adenosine diphosphate (ADP), to adenosine monophosphate (AMP); (ii) the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) family, which mainly hydrolyzes ATP to AMP; (iii) the 5'-nucleotidase (5'-NT) (known as CD73) that dephosphorylates AMP to adenosine; and, (iv) the alkaline phosphatases family that hydrolyzes nucleoside triphosphates and diphosphates to monophosphates [6]. Adenosine deaminase (ADA) inactivates adenosine. This is a soluble enzyme often associated with CD26/dipeptidyl peptidase IV, expressed at the cell membrane [13]. Ectonucleotidases and CD26 are well characterized in human cyclic and postmenopausal endometria, showing differences in its expression and distribution throughout the cycle [8,14]. The presence of ectonucleotidases in the contents of endometrioma had previously been described [15,16] but no studies had yet to be conducted on eutopic and ectopic endometrial tissue from women with endometriosis.

With the present study, we aimed to characterize the expression of ectonucleotidases in the eutopic and ectopic endometrial tissue of women with endometriosis and compare it with the eutopic endometrium of women without this pathology. We believe that assessing the participation of these proteins directly involved in ATP breakdown in endometriosis could contribute to facilitating the diagnosis and ameliorating the treatment status of this pathology.

## 2. Results

Protein expression of NTPDase1 (CD39 from here on), NTPDase2, NTPDase3, NPP3, 5'-NT (CD73 from here on), and CD26 was detected in the eutopic and ectopic endometrial tissue of women with endometriosis. Results are compared with endometria from women without the disease whose data was previously published [8,14]. Staining distribution and intensity scores were recorded for each protein by double blinded observation. In situ nucleotidase activity, in the presence or absence of specific inhibitors, was also detected. The most relevant findings in eutopic endometria and

endometrial lesions are described for each protein hereafter, and compiled in detail in Tables 1 and 2. The proportion of positive tissues stained in the immunolabeling assays is commented on in the text and compiled in Appendix A (Table A1).

**Table 1.** Summary of the ectoenzyme expression in the eutopic endometrium from women with endometriosis.

	NTPDase1 (CD39)	NTPDase2	NTPDase3	NPP3	5'-NT (CD73)	CD26
<i>Proliferative endometrium</i>						
Surface epithelium	-	+++	+	++	++	-
Glandular epithelium						
Functional layer	-	+++	++	++	+++	++/- <sup>1</sup>
Basal layer	-	+++	+	+	+++	+++
Endometrial stromal cells	-	+++	-	+++	++	-
Spiral arteries	+++	-	-	+	-	-
<i>Secretory endometrium</i>						
Surface epithelium	-	+++	+/- <sup>1</sup>	+++	+++	+
Glandular epithelium						
Functional layer	-	+++	+++	+++	++	+++
Basal layer	-	+++	+++	+++	+++	++
Endometrial stromal cells	-	+++	-	+	++	-
Spiral arteries	+++	-	-	+	-	-
<i>Atrophic endometrium</i>						
Surface epithelium	-	+++	-	+	+	++/- <sup>1</sup>
Glandular epithelium	-	+++	-	++	++	-
Endometrial stromal cells	++	+++	-	++	-	-
Vessels	++	-	-	+	-	-

Semi-quantitative analysis independently evaluated by two observers. Label is recorded as: (-) negative, (+) weak, (++) moderate, (+++) strong. <sup>1</sup> 50% of tissues studied had each of these staining intensities.

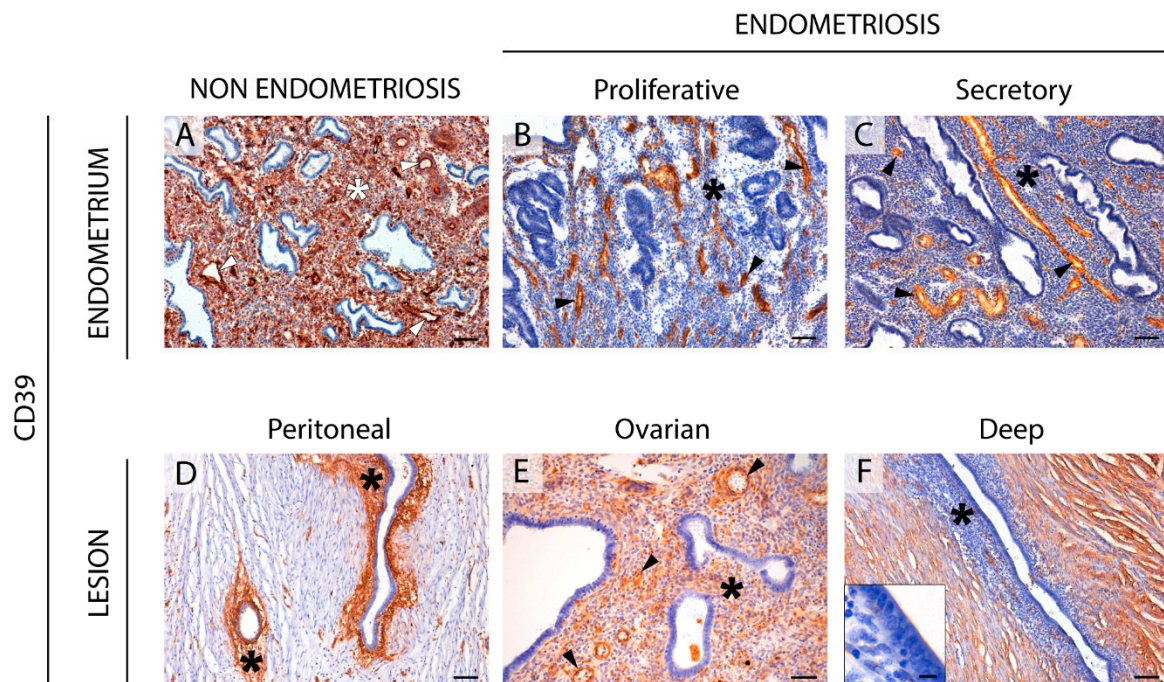
**Table 2.** Summary of the ectoenzyme expression in the ectopic endometrial tissue (peritoneal, ovarian, and deep infiltrative lesions) from women with endometriosis.

	NTPDase1 (CD39)	NTPDase2	NTPDase3	NPP3	5'-NT (CD73)	CD26
<i>Peritoneal endometriosis</i>						
Endometrial epithelial cells	-	+++	+	+++	+++	+++
Endometrial stromal cells	+++	++	-	++	++	-
Vessels of the lesion	+++	-	-	-	-	-
<i>Ovarian endometriosis</i>						
Endometrial epithelial cells	-	+++	+++	+++	+++	+++
Endometrial stromal cells	++	-	-	+	-	-
Vessels of the lesion	+++	-	-	-	-	-
<i>Deep endometriosis</i>						
Endometrial epithelial cells	-	+++	-	++	+++	+++
Endometrial stromal cells	-	++	-	+	-	-
Vessels of the lesion	-	-	-	-	-	-

Semi-quantitative analysis independently evaluated by two observers. Label is recorded as: (-) negative, (+) weak, (++) moderate, (+++) strong.

### 2.1. CD39 Expression in the Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues

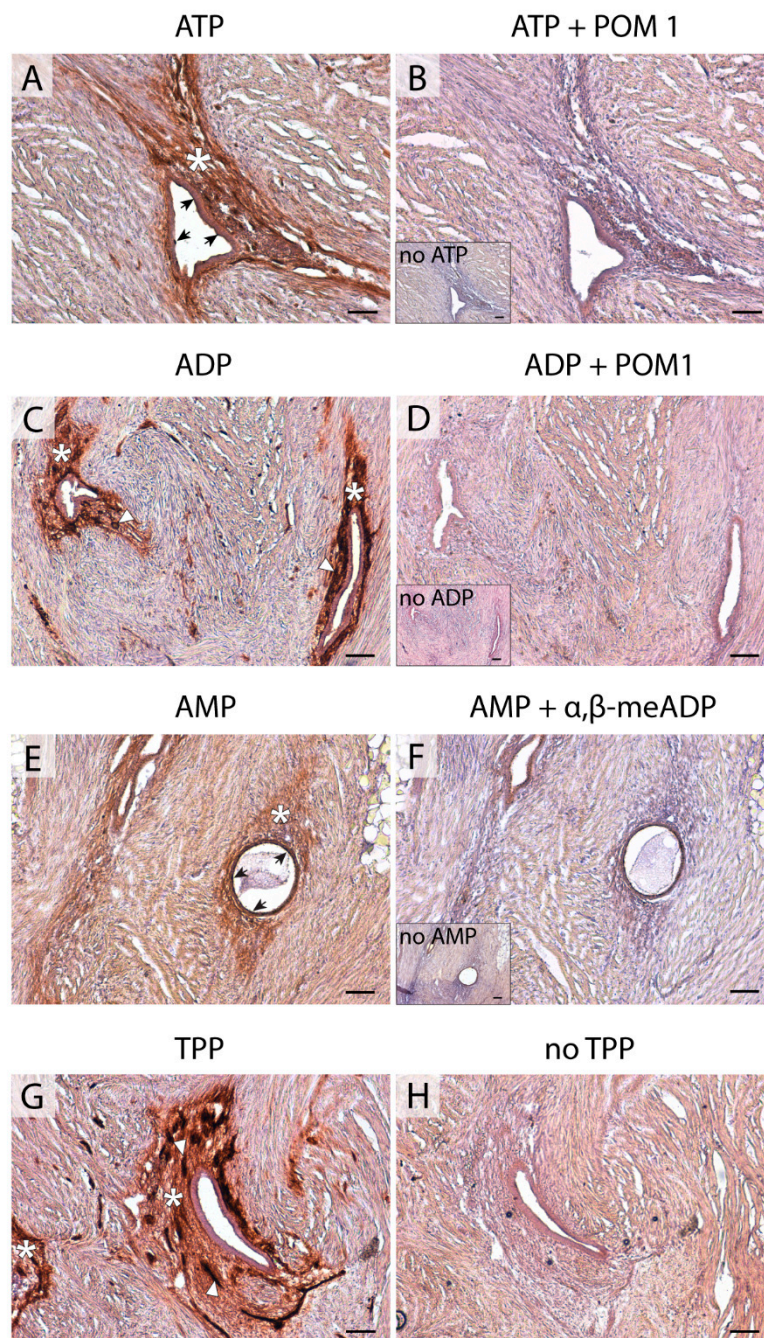
CD39 staining was detected in stromal cells and in endothelial cells from blood vessels of endometria from women without endometriosis (Figure 1), coinciding with previously published findings [8]. In the eutopic cyclic endometria from women with endometriosis, CD39 label in the stroma was absent in 65% of cases although it was always present in endothelial cells (Figure 1). However, atrophic endometria from women with endometriosis maintained the CD39 expression in the stromal component (Figure S1).



**Figure 1.** Immunolocalization of CD39 in eutopic (A–C) and ectopic (D–F) endometrial tissue. CD39 was expressed in blood vessels (arrowheads) of eutopic endometria from women without (NON ENDOMETRIOSIS, (A)) or with endometriosis (ENDOMETRIOSIS, (B,C)), and in peritoneal (D), ovarian (E), and deep infiltrating (F) lesions. CD39 was immunodetected in the stroma (asterisk) of endometrium of women without the disease (A), but not in endometria of women with endometriosis (B,C). Stroma is also labelled in the peritoneal (D) and ovarian (E) ectopic tissues of women with endometriosis. Inset in (F) is a detail of a deep lesion (oviductal infiltrating nodule) showing the absence of CD39 in the endometrial stroma. Scale bars are 100 µm (A–F) and 10 µm (F inset).

In endometriotic lesions, CD39 was immunodetected with strong labeling in the stroma of the peritoneal (86% of cases) and ovarian (59%) lesions, but not in the deep ones, where this label was only in 36% of the samples. Moreover, 54% of deeply infiltrative lesions lost the expression of CD39 in blood vessels. ADPase activity was seen at the same locations where the protein was immunodetected. The activity was inhibited by the E-NTPDase inhibitor POM 1 (Figure 2).

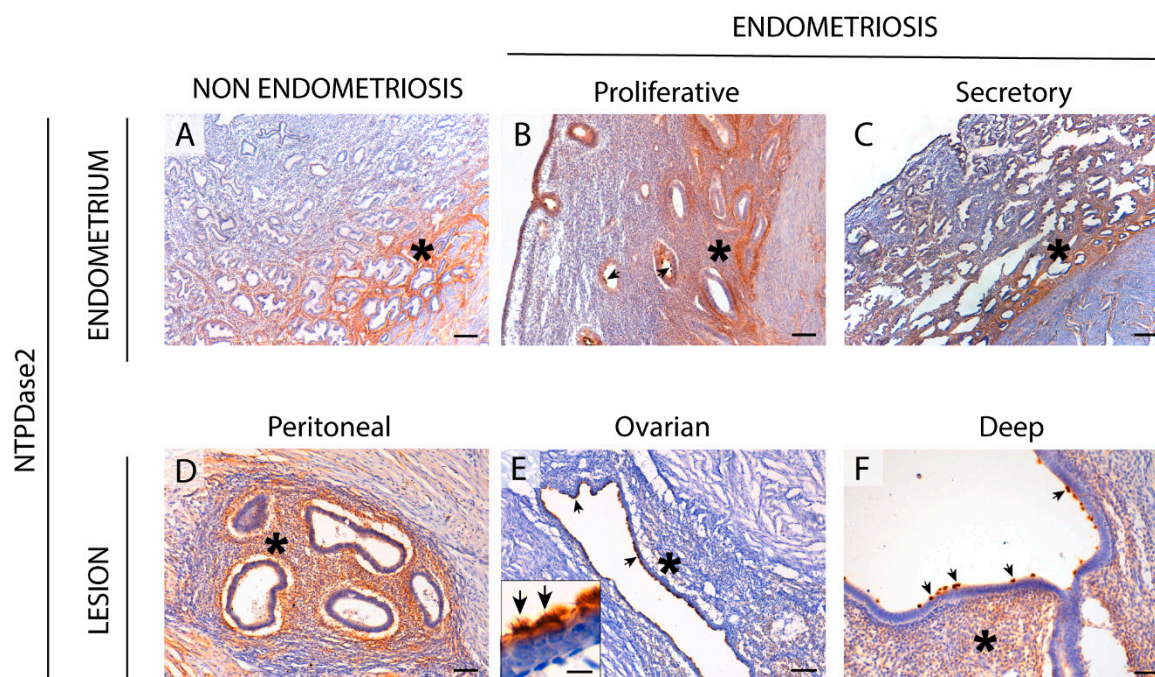




**Figure 2.** Nucleotidase in situ histochemistry in superficial peritoneal endometriosis lesions. Dark brown deposits correspond to enzyme activity. ATPase activity was detected in the epithelial cells (arrows) and stroma (asterisk) of the lesion (A). ADPase activity was strongly detected in the stroma (asterisks) of the lesion and, remarkably, in blood vessels (arrowheads) (C). ATPase and ADPase activities were abrogated in the presence of the NTPDase inhibitor POM 1 (B,D, respectively). In situ AMPase activity was detected in the epithelial (arrows) and stromal (asterisk) components of the lesion (E). The AMPase was inhibited in the presence of  $\alpha,\beta$ -meADP (F). Insets in (B,D,F) correspond to the activity experiments performed in the absence of substrate (no ATP, no ADP, and no AMP, respectively). TPPase activity was distributed in the stroma (asterisks), including the blood vessels (arrowheads) of lesions (G). As a control, TPPase activity was also performed without substrate (no TPP, H). Scale bars are 100  $\mu$ m.

### 2.2. NTPDase2 Expression in the Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues

NTPDase2 label in endometria of women with endometriosis was found in basal stroma and cilia of epithelial ciliated cells (Figure 3), coinciding with the recently described expression in non-pathological endometria [14]. All types of ectopic lesions displayed cilia staining, except three deeply infiltrative lesions localized in oviducts that did not display NTPDase2 staining in the cilia. However, the rest of the deep lesions with another ectopic location showed NTPDase2 labeling in their ciliated cells. Stroma was labeled in peritoneal (100% of the cases) and deep lesions (65%), but much less so in ovarian lesions (37%). In situ ATPase activity was detected in the same locations where NTPDase2 was expressed, and it was inhibited by the E-NTPDase inhibitor POM 1 (Figure 2).



**Figure 3.** Immunolocalization of NTPDase2 in the eutopic (A–C) and ectopic (D–F) endometrial tissue. NTPDase2 was detected in the stroma of the basal layer (asterisks) in cyclic endometria from women without (A) and with (B,C) endometriosis. It was also present in the stromal component (asterisks) of the superficial peritoneal (D) and deep infiltrating lesions (F, vaginal nodule). NTPDase2 was also found in eutopic and ectopic epithelial ciliated cells in the cilia (arrows) (detail in the inset in E). Scale bars are 200  $\mu\text{m}$  (A,C), 100  $\mu\text{m}$  (B,D–F), and 10  $\mu\text{m}$  (inset in E).

Interestingly, we observed the NTPDase2 label in the connective tissue that surrounds the lesions clearly defining the limits of the ectopically located endometrial tissue in a large number of cases (Figure S2).

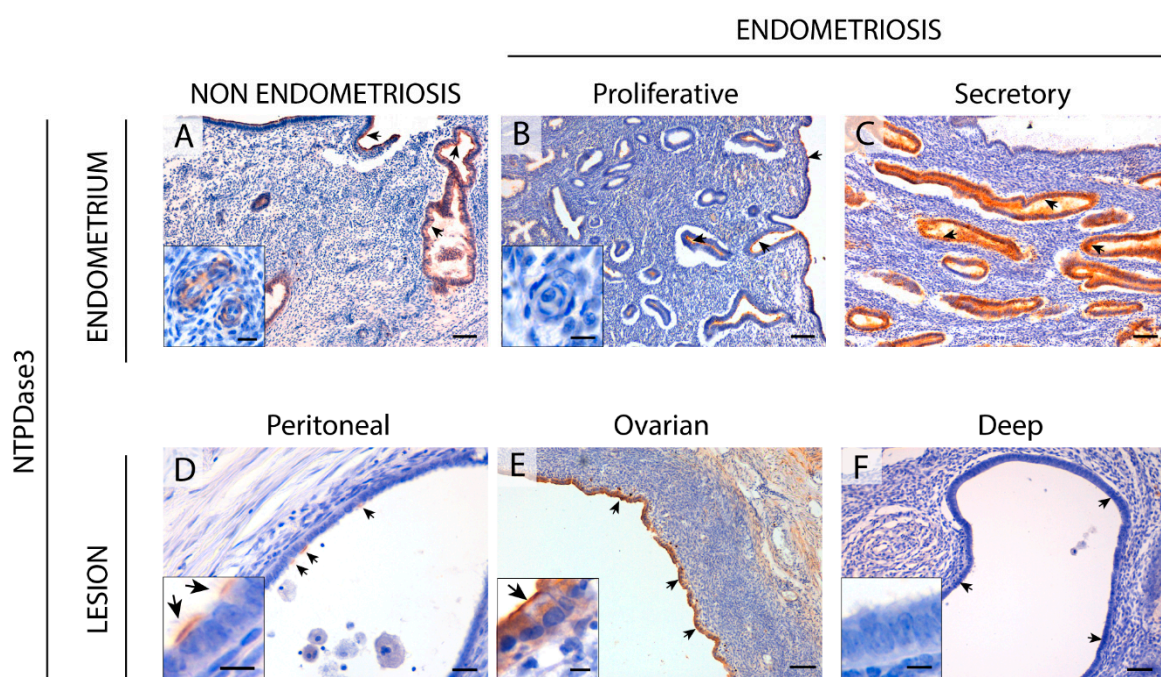
Perivascular NTPDase2+ cells were also found in eutopic and ectopic endometrial tissue. We confirmed that these cells were also positive for the endometrial mesenchymal stem cell (eMSC) marker Sushi Domain Containing 2 (SUSD2). Double immunolabeling for NTPDase2 and SUSD2 revealed that both proteins were expressed by the same perivascular cells (Figure S3). This coincides with recently published results in non-pathological endometria [14]. Nevertheless, NTPDase2+ SUSD2+ perivascular cells were not present in all the endometriotic lesions.

### 2.3. NTPDase3 Expression in the Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues

In endometrium, NTPDase3 was immunolocalized apically in the epithelial glandular cells. The expression varied during the cycle, being maximal in the secretory phase, as previously described for non-pathological endometria [8]. Ciliated cells were also apically labeled with the label accumulated



at the base of the cilia (Figure 4). In addition, NTPDase3 was not detected in atrophic endometria in endometriosis (Figure S1) while it is expressed in atrophic endometria of women without the disease.



**Figure 4.** Immunolocalization of NTPDase3 in the eutopic (A–C) and ectopic (D–F) endometrial tissue. NTPDase3 was immunodetected in ciliated and non-ciliated cells of cyclic endometrium from women without (A) and those with (B,C) endometriosis (arrows), with changes in expression along the menstrual cycle, reaching a maximum at the secretory phase (C). Moreover, NTPDase3 was present in the endothelial cells of spiral arteries of women without endometriosis (inset in A) but not in the cyclic endometria from women with the disease (inset in B). In ectopic endometrial tissue, NTPDase3 was weakly expressed in the epithelial cells (arrows) of peritoneal lesions (D) and highly expressed in the epithelium (arrows) of the ovarian endometriomas (E). NTPDase3 was absent in the deep infiltrating lesions (F, vaginal nodule) (arrows). Insets in images (D–F) are details of the epithelium of the three different ectopic lesions. Scale bars are 100  $\mu\text{m}$  (A–F), 20  $\mu\text{m}$  (inset in A), and 10  $\mu\text{m}$  (insets in B,D–F).

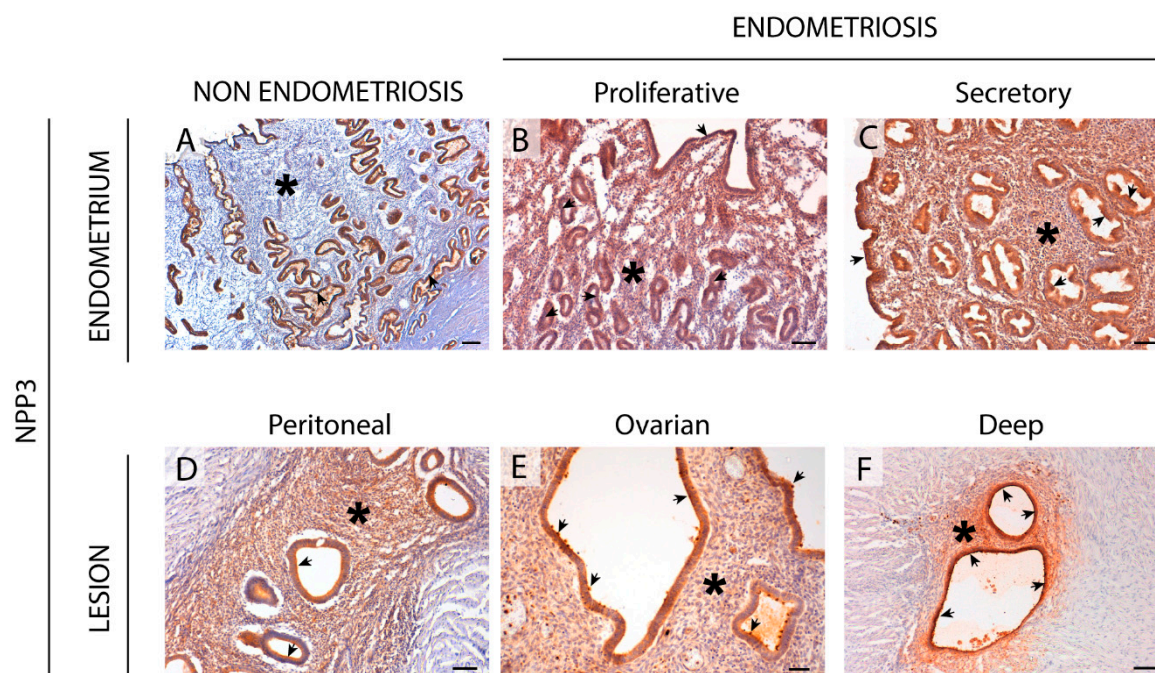
The only, but not negligible, difference between endometria from women with and those without endometriosis is the lack of NTPDase3 staining in spiral arteries in endometriosis. It was previously reported that NTPDase3 was a marker of spiral arteries, displaying a perivascular smooth muscle actin (SMA)+ labeling [8].

In endometriotic lesions, NTPDase3 expression was found in the epithelial component. And while in ovarian lesions labeling was intense, in deep infiltrating lesions labeling was sparse and it was only present in 44% of lesions (Figure 4).

#### 2.4. NPP3 Expression in the Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues

NPP3 was expressed in epithelial cells of endometria from women with endometriosis with changes in expression throughout the cycle, being maximal in the secretory phase, similar to the features described in a non-endometriosis condition [8].

Remarkably, de novo NPP3 expression was seen in the stroma of endometrial tissue, both eutopic (including atrophic) and ectopic, from women with endometriosis (Figure 5 and Figure S1). Thiamine pyrophosphatase (TPPase) in situ activity, a functional assay for E-NPPs, was also seen in the stroma of eutopic endometrium and endometriotic lesions (Figure 2).



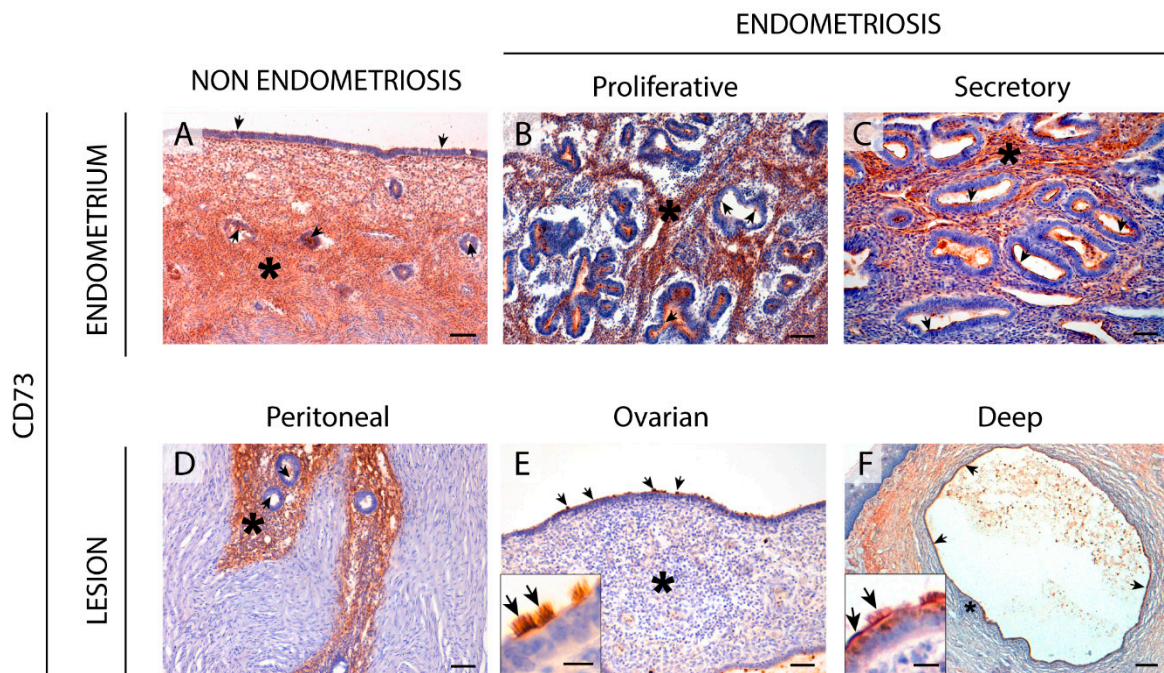
**Figure 5.** Immunolocalization of NPP3 in the eutopic (A–C) and ectopic (D–F) endometrial tissue. NPP3 is present in the luminal and glandular epithelial cells of endometrium from women without (A) or with (B,C) endometriosis (arrows), with changes in expression along the menstrual cycle, reaching a maximum at the secretory phase (C). NPP3 was expressed by the stroma (asterisks) only in endometriosis condition, including eutopic endometrium (B,C), and ectopic lesions: peritoneal (D), ovarian (E), and deep infiltrating (F, intestinal nodule). NPP3 is also present in the endometrial epithelial cells of lesions (arrows). Scale bars are 200  $\mu\text{m}$  (A) and 100  $\mu\text{m}$  (B–F).

### 2.5. CD73 Expression in the Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues

CD73 was expressed in ciliated cells from the surface epithelium. The label is apical and comprised the entire length of the cilia. CD73 was also immunodetected in glands.

Moreover, CD73 was detected in the stromal cells in both proliferative and secretory phases, mainly in the functional layer. CD73 was, however, absent in the stromal cells of the atrophic endometria from women with endometriosis, in contrast to the atrophic endometria of women without endometriosis (Figure 6). The ectopic endometrial tissue also displayed CD73 epithelial label; however, the endometriotic lesions with stromal CD73 label decreased in relation to the severity of the lesion. In fact, 71% of peritoneal lesions presented CD73 in the endometrial stromal cells versus 48% of the ovarian endometriomas and 22% of deep infiltrating lesions.



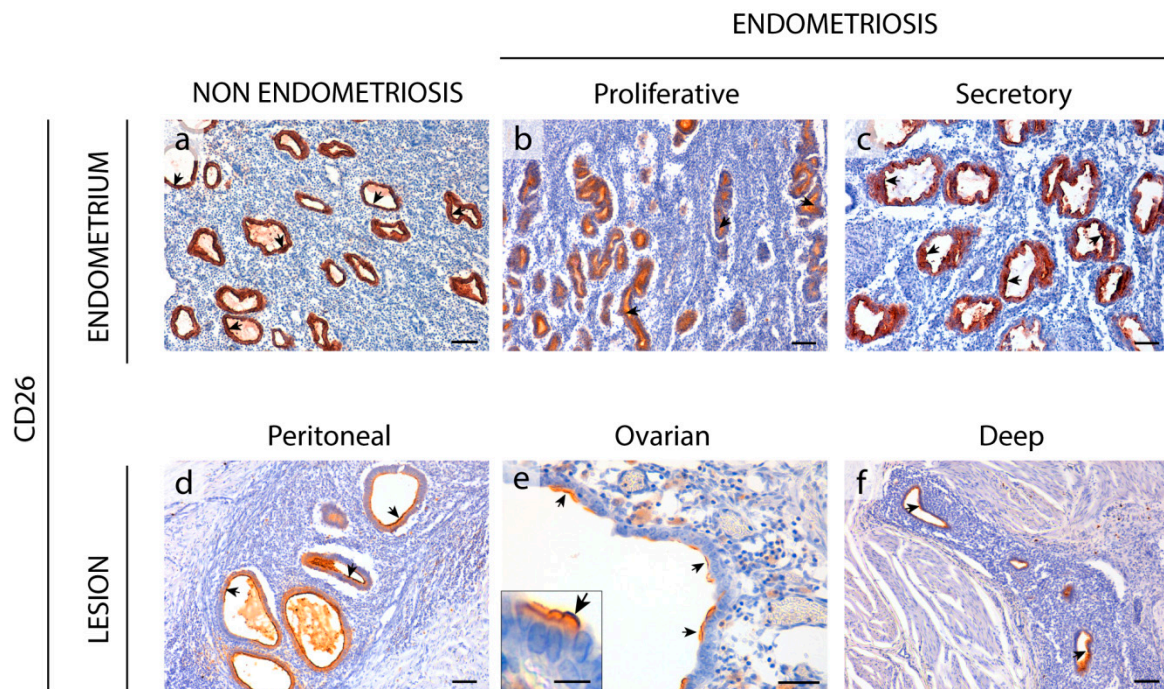


**Figure 6.** Immunolocalization of CD73 in the eutopic (A–C) and ectopic (D–F) endometrial tissue. CD73 was detected in the stroma (asterisks) of the cyclic endometrium from women without (A) or with (B,C) endometriosis and in the superficial peritoneal lesions (D). CD73 labelling was absent in the stroma (asterisks) of the ovarian (E) and deep infiltrating lesions (F, vaginal nodule). CD73 was also present in the ciliated and non-ciliated epithelial cells in the eutopic and ectopic endometrial tissue (arrows). Insets in images E and F correspond to the epithelium of ovarian and deep lesions, respectively. Scale bars are 100  $\mu\text{m}$  (A,B,D), 50  $\mu\text{m}$  (C,E), 10  $\mu\text{m}$  (E inset), 200  $\mu\text{m}$  (F), and 15  $\mu\text{m}$  (F inset).

In situ AMPase activity was detected in the same locations where CD73 was expressed and it was inhibited by the specific inhibitor  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene-ADP ( $\alpha$ ,  $\beta$ -meADP) (Figure 2).

#### 2.6. Enzyme Dipeptidyl Peptidase IV/CD26 Expression in the Eutopic and Ectopic Endometrial Tissues

CD26 was immunodetected in endometria from women with and without endometriosis. CD26 was only detected in the epithelial cells of endometrium with the already described changes in the level of expression throughout the cycle (Figure 7). CD26 staining was very weak in atrophic endometria, and only 33% of cases presented CD26 labeling in the glandular epithelium (Figure S1).

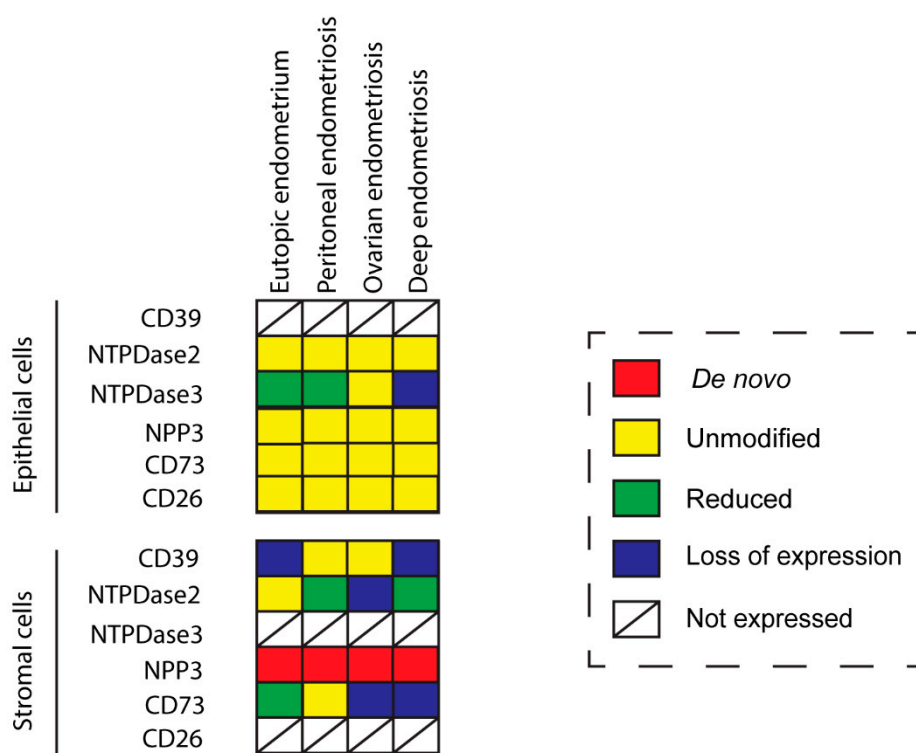


**Figure 7.** Immunolocalization of CD26 in the eutopic (a–c) and ectopic (d–f) endometrial tissue. CD26 was detected in epithelial cells (arrows) of the cyclic endometria of women without (a) or with (b,c) endometriosis. CD26 was also expressed by the endometrial epithelial cells (arrows) of peritoneal (d), ovarian (e), and deep infiltrating lesions (F, vesical nodule). Inset in (e) shows a detail of the CD26 labelling at the apical membrane of epithelial non-ciliated cells of an ovarian lesion. Scale bars are 100  $\mu\text{m}$  (a–d,f), 50  $\mu\text{m}$  (e), and 10  $\mu\text{m}$  (e inset).

CD26 was expressed in the epithelial component of all types of endometriotic lesions (Figure 7).

### 3. Discussion

Purinergic signaling plays a role in reproduction, and changes in its elements have been described in the pathology of endometriosis. Extracellular ATP may be involved in two of the major symptoms of endometriosis, which are infertility and pain [9,15,16]. In the present study we characterized the expression in eutopic and ectopic endometrial tissue of different ectonucleotidases involved in the regulation of ATP levels in tissue microenvironment. We have compared the results with those previously published in non-pathological endometria [8,14]. Tissue distribution in endometriosis coincides with the control condition except in the case of NPP3 which is present in stroma only in endometriosis. Ciliated cells of endometria display the same expression pattern as in control fallopian tubes. Changes in expression and activity are consistently recorded, the greatest being in the stroma (Figure 8). These findings provide information to elucidate the cellular and molecular mechanism as well as the etiology and the progression of the disease, which might help to identify new diagnostic and therapeutic targets.



**Figure 8.** Color representation of changes of ectonucleotidase expression in the eutopic and ectopic endometrial tissue in endometriosis in comparison to the endometria of women without endometriosis. De novo, in red, indicates that this is the first time the label is detected in this cell type; unmodified, in yellow, indicates no changes in label between endometriosis and non-endometriosis; reduced, in green, indicates that the label is diminished in the endometriosis condition; loss of expression, in blue, indicates lack of expression in endometriosis; not expressed indicates that the label is never reported in this particular cell type in any condition.

The CD39-adenosinergic axis, with CD39 and CD73 acting sequentially to hydrolyze ATP to adenosine, is considered the main duo responsible for metabolizing extracellular ATP, generating an immunosuppressive adenosine-rich microenvironment in physiological and pathophysiological conditions [17]. In endometrium, the expression pattern of these ectonucleotidases and their changes throughout the cycle are well studied. Under physiological conditions, endometrial stromal cells express both CD39 and CD73. While CD39 expression is constant throughout the cycle, CD73 fluctuates [8,18], thus determining variations in adenosine level in the microenvironment. In the present study we note that eutopic endometrium of women with endometriosis displays the same already known expression pattern of CD73 but mostly loses CD39 stromal expression. A plausible consequence of the concomitant unbalanced ATP hydrolysis is the accumulation of extracellular ATP in the endometrial stromal microenvironment. This might well play a role in the generation and maintenance of the chronic inflammatory state of endometria of women with endometriosis. Moreover, extracellular ATP is closely related to various immune and inflammatory factors that are known to be involved in the infertility of women with endometriosis, by reducing the quality of gametes and their rates of transport and implantation, and by increasing the pregnancy loss rate [19].

This situation could explain the de novo stromal expression of NPP3 in endometriosis throughout the cycle and in atrophic endometrium, as a cellular tool to offset the loss of ATPase activity due to the lack of CD39. However, NPP3 action would not be sufficient to replace ATPase activity because NPP3 has a lower affinity for ATP than CD39 [6]; moreover stromal NPP3 expression is not coordinated with CD73 expression throughout the cycle.



Changes in the CD39-CD73 pathway were also found in endometriotic lesions. Our findings indicate that the changes in ATP hydrolysis resulting from CD39 and CD73 activity are related to the severity of endometriosis since their expression is lost in deep infiltrating lesions. These changes of expression would lead to an extracellular ATP accumulation that would in turn promote the secretion of cytokines and growth factors into the ectopic milieu, with a concomitant increase in survival and growth rates of endometrial cells [20,21]. Unfortunately, the exact function of extracellular ATP in endometriosis is not clear. While ATP signaling seems to be closely related to the origin and progression of endometriosis, intramuscular injection of ATP in a rat model of endometriosis was found to reduce the size of the ectopic induced lesions [22]. Our results are in line with previous studies that showed differing expression of the protein ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Transporting Family Member Beta 4 (ATP1B4) between patients with and without endometriosis, in favor of a decrease of the hydrolysis of ATP in the endometriosis patients [23,24]. The authors stated that ATP was clearly related with the formation and development of endometriosis disease. Moreover, pain is a characteristic symptom of endometriosis, and ATP is a pain factor mainly acting through the purinoreceptor P2X3 that has also been studied in endometriosis. P2X3 has been found in the epithelial and some stromal cells of eutopic and ectopic endometrial tissue as well as on sensory nerve fibers in endometriotic lesions. Its expression levels correlate with the severity of pain in women with endometriosis [25]. Moreover, the use of A-317491, a selective P2X3 receptor antagonist, relieved pain with a prolonged antinociceptive effect in rats [26], and the receptor is thus a target for the pharmacological approach of endometriosis pain relief. Therefore, the increased levels of extracellular ATP might well be related to the endometriosis-associated pain. These results parallel the difference in CD73 and CD39 expression between the three entities of endometriosis, where the most extreme change has been detected in the deep infiltrating lesions, an important indicator of the severity of pain in endometriosis [27]. Additionally, the downregulation of CD73 has been described in poorly differentiated and advanced-stage endometrial carcinoma. Adenosine generated by the activity of CD73 located in the areas of cell-cell contacts regulates cell-cell adhesions by the regulation of the primary component of filopodia (F-actin). In fact, cell migration and invasion in high-grade and advanced-stage endometrial carcinomas is dependent on the loss of the adenosine generated by CD73 [28]. According to Sampson's theory of retrograde menstruation, endometrial tissue detached during menses has to travel through the fallopian tubes to the ectopic site of implantation, such as the ovarian surface or the peritoneal wall, and must then invade and adhere to the self-tissue of the new localization, proliferating and evading the immune response to form the endometriotic lesion [29]. For this reason, the loss of CD73 in the two most severe entities of endometriosis, ovarian and deep endometriosis, as well as its implication in the inflammatory state of endometriosis, might also play a role in the migration and invasive properties of ectopic cells needed to generate the lesion.

An important finding is the identification of NPP3 label as a new histopathological marker of the disease since we have demonstrated its expression and activity in the stroma only in endometriosis, in both eutopic and ectopic tissues. NPP3 has already been identified in endometrial epithelial cells, a fact that is also confirmed in the case of endometriosis without any variation. A previous study by our group also demonstrated the presence of NPP3 in the contents of endometriomas although the levels did not differ from those of the simple ovarian cysts used as controls and therefore its presence was not exclusive of endometriosis [16]. The relevance of the study reported here is its presence in eutopic endometria which discriminates between endometriosis and non-endometriosis conditions, which might allow its use as a histopathological diagnostic tool. To our knowledge, NPP3 has been identified in epithelial cell types, in cells of the immune system, mainly mast cells, and in tumor cells with an epithelial or myeloid origin [8,30–34]. The specific detection of NPP3 in the endometrial stromal cells of eutopic endometria and in all three entities of endometriosis can be used as a histopathologic marker of endometriosis disease. In addition to its role in the control of extracellular ATP levels, NPP3 might well play a role in the invasive capacity of the stromal endometrial cells in endometriosis since it is known that overexpression of NPP3 in murine fibroblasts stimulates the motility and the

invasiveness of these cells [35]. Our finding of de novo NPP3 in stromal cells, with greater expression in the functional layer which is shed during menses, and the relation of NPP3 with the cell motility and invasion, suggest involvement of NPP3 in the formation and progression of endometriotic lesions based on the retrograde menstruation theory [29]. Besides the importance of NPP3 as histopathological marker, additional studies are needed to determine the precise role of NPP3 in the pathogenesis and progression of endometriosis. It might well be a new target for pharmacological therapy of endometriosis. Indeed, targeting NPP3 is feasible since phase 1 trials using an antibody drug conjugate targeting this protein have been completed in patients with advanced metastatic renal cell carcinoma with promising antitumor results [36].

We found NTPDase2 expression in the same cell types and structures as in the non-endometriosis condition. Moreover, NTPDase2 was expressed by perivascular cells in some lesions with colocalization with the eMSCs marker SUSD2. Functional studies are needed to determinate whether NTPDase2+ SUSD2+ cells are eMSCs as in the eutopic endometrium. Retrograde shedding of stem cells into the pelvic cavity without immune clearance is thought to be lesion-initiating. Therefore, it would be of interest to compare lesions containing the NTPDase2+ SUSD2+ cell population with lesions without it.

NTPDase3 was described in epithelial cells and spiral arteries in healthy endometria. In fact, NTPDase3 has been considered a spiral artery marker [8]. But we did not find NTPDase3 labeling in spiral arteries of women with endometriosis. Spiral artery remodeling plays a central role in establishing and maintaining a normal pregnancy, and impaired remodeling is involved in common pregnancy disorders. This might be also one of the mechanisms underlying the decreased pregnancy rates in women with endometriosis. It is important to highlight the loss of NTPDase3 in the epithelial cells of deep infiltrating lesions. Although NTPDase3 has been little explored in pathological conditions, a decrease in *ntpdase3* expression has been described during the induction of mouse bladder cancer, suggesting its participation in cancer establishment and progression [37]. This result, together with the loss of NTPDase3 in the epithelial cells of the most severe form of endometriosis, provides further evidence of the need to study its role in the pathophysiology of endometriosis and cancer.

CD26 or dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) is a membrane glycoprotein that binds, among other peptides, the ectoenzyme ADA in humans. It is involved in the protection of the tissue against local inflammation and in intracellular signaling. CD26 has been described as a cancer stem cell marker and tumor suppressor protein in certain types of cancer. By contrast, CD26 overexpression promotes cell proliferation, invasion, and tumorigenesis in endometrial carcinoma cells [38]. In endometriosis, Tan et al. [39] described the increase of endometrial stromal cell migration and invasion in part by reduced expression of CD26 under hypoxia conditions and also by CD26 inhibition. Other studies performed in tissue, including ours, have not matched these in vitro results with cell culture since we were not able to detect CD26 in endometrial stroma, but only in epithelial glandular cells. This might be due to the differing behavior of cells in vitro or even to technical reasons. Here, we show high expression of CD26 in the epithelial cells of eutopic endometrium and in ectopic tissue. The difference with the endometrial expression in women without endometriosis is that CD26 expression in endometriosis is constant throughout the cycle. It would be interesting to see whether the high expression of CD26 in ectopic epithelial cells has a similar effect to that of endometrial carcinoma cells on cell migration and invasion ability. In relation to the ATP metabolism, knowing the levels of ADA, the soluble enzyme that hydrolyses the extracellular adenosine to control the immunosuppressive milieu, is key to understanding what is happening in endometriosis. In a previous study, high levels of ADA were found in the contents of ovarian endometriomas [16]. We were, however, unable to detect ADA by immunostaining due to the technical limitations of the antibodies available, and we cannot be certain whether high levels of CD26 in tissue is related to an increase in ADA activity.

The changes in the expression of the ectonucleotidases described here in eutopic and ectopic endometrium argue for extracellular ATP accumulation. The greatest loss of ectonucleotidase expression was found in the deep infiltrating endometriosis, the most severe endometriosis subtype [40,41]. Our results, together with the role of ATP in pain [25,42], lend support to the involvement of



ectonucleotidase expression changes with the severity of endometriosis. Moreover, our results reinforce the relevance of the stroma and tissue microenvironment in the etiopathology and progression of endometriosis disease. Future studies on the role of purinergic signaling in endometriosis are needed to identify biomarkers of the disease and to develop new therapeutic strategies that would allow for earlier detection and respect for the reproductive wishes of women with endometriosis. However, unlike in cancer, where ectonucleotidase blockade is a therapeutic tool, in endometriosis the use of inhibitors of ectonucleotidases does not seem to represent an appropriate strategy. On the contrary, increasing the ATPase activity would combat the eventual ATP accumulation of endometrial microenvironment. In line with this, the use of A-317491, an antagonist of the ATP receptor P2X3, relieves pain in endometriosis [26]. Administration of soluble CD39 is known to be safe and is well studied in the context of cardiovascular diseases where it is known to prevent thrombus formation (reviewed in [43]).

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Samples

The ethical principles of this study adhere to the Helsinki Declaration, and all the procedures were approved by the ethics committee for clinical investigation of Bellvitge Hospital (project identification code PR090/15, Acta 21/16, 12/2016). All the patients included gave written informed consent. Fifty-seven patients with endometriotic lesions (ectopic endometrial tissue) were recruited for the study by the Gynecology Service of Bellvitge Hospital (Barcelona, Spain) between March 2016 and July 2019, and by the Gynecology Service of Dexeus Institute (Barcelona, Spain) between October 2016 and March 2018. Thirty-four endometrium samples were obtained by the Gynecology Service of Bellvitge Hospital from women without endometriosis or endometrial malignancy as a control group (including 10 proliferative, 4 secretory, and 20 atrophic endometria; age mean of patients = 55.03 years, standard derivation = 11.83).

Human endometrial samples from women with endometriosis ( $n = 25$ ) were obtained from hysterectomy specimens without endometrial malignancy at the pathology services of Bellvitge Hospital and Dexeus Hospital. Peritoneal endometriosis ( $n = 7$ ), ovarian endometriosis ( $n = 27$ ), and/or deep endometriosis ( $n = 28$ ) were surgically removed in the gynecology services of the same hospitals. Demographic description of the samples from the women with endometriosis are summarized in Table 3. Endometrial dating was carried out by the pathology services.

**Table 3.** Demographics of patients with endometriosis.

Type of Endometrium	Number of Cases	Age (years) $\pm$ Standard Deviation	Average (Range)
Proliferative	12	44.33 $\pm$ 3.11	39–51
Secretory	10	45.00 $\pm$ 5.21	38–53
Atrophic	3	43.00 $\pm$ 4.00	39–47
<b>Type of Lesion</b>			
Peritoneal	7	40.29 $\pm$ 4.96	35–46
Ovarian	27	43.42 $\pm$ 8.36	23–57
Deep	21	38.00 $\pm$ 5.73	27–47

Excised tissue samples were fixed with 4% paraformaldehyde, cryoprotected by introducing them into a 30% (*w/v*) sucrose solution at 4 °C for 24 h, and then embedded in O.C.T freezing media (Tissue-Tek®; Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands). Fifteen  $\mu$ m sections were obtained using a Cryostat Leica CM1950 (Leica, Wetzlar, Germany). Sections were put onto poly-L-lysine coated glass slides and stored at  $-20$  °C until use. Routine haematoxylin and eosin staining was performed.

#### 4.2. Antibodies

Primary antibodies used in this study are listed in Table 4. Secondary antibodies used for immunohistochemistry were horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse (EnVision™ + System; DAKO, Carpinteria, CA, USA) and HRP-conjugated goat anti-rabbit (EnVision™ + System).

**Table 4.** List of primary antibodies used for immunolabeling experiments.

Antibody Specificity	Name/Clone	Source	Supplier	Dilution
NTPDase1 (CD39)	BU-61	Mouse	Ancell (188-820)	1:500
NTPDase2	-	Rabbit	Enzo (ALX-215-045)	1:100
NTPDase2	H9s	Mouse	<a href="http://ectonucleotidases-ab.com">http://ectonucleotidases-ab.com</a>	1:400
NTPDase3	B <sub>3</sub> S <sub>10</sub>	Mouse	<a href="http://ectonucleotidases-ab.com">http://ectonucleotidases-ab.com</a>	1:500
NPP3	NP4D6	Mouse	Abcam (ab90754)	1:100
5'-nucleotidase (CD73)	4G4	Mouse	Abcam (ab81720)	1:50
CD26	202-36	Mouse	Abcam (ab3154)	1:100
CD26	202-36	Mouse	NovusBio (NBP2-44571)	1:100
SUSD2	-	Rabbit	Abcam (ab121214)	1:400

Secondary antibodies used for immunofluorescence assays were Alexa Fluor 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA). Secondary antibodies were used at 1:500 and dilutions were made in PBS.

#### 4.3. Immunolabeling Experiments

Slices were washed twice with PBS to remove the O.C.T freezing media and then pre-incubated for 1 h at room temperature (RT) with PBS containing 20% normal goat serum (NGS, Gibco, Paisley, UK), 0.2% Triton and 0.2% gelatin (Merck, Darmstadt, Germany). For immunohistochemistry experiments a previous blocking of endogenous peroxidase activity was performed with 10% methanol (*v/v*) and 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*v/v*) in PBS for 30 min. Slices were then incubated overnight (O/N) at 4 °C with the primary antibodies (listed in Table 2) diluted in PBS. After three washes in PBS, tissue sections were incubated with the appropriate secondary antibodies for 1 h at RT, except HRP-goat anti-mouse and HRP-goat anti-rabbit, which were incubated for 30 min at RT. Secondary antibodies alone were routinely included as controls for the experiments.

For immunohistochemistry, the peroxidase reaction was performed in a solution containing 0.6 mg/mL 3, 3'-diaminobenzidine substrate (DAB; D-5637, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and 0.5 µL/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 10 min, and stopped with PBS. Nuclei were counterstained with haematoxylin and slides were then dehydrated and mounted with DPX mounting medium. Samples were observed under light Nikon Eclipse E200 and photographed under a light Leica DMD 108 microscope. In fluorescence assays, for nuclei labeling, slides were mounted with aqueous mounting medium with DAPI (ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI, Life Technologies, Paisley, UK). Samples were then observed and photographed under a Zeiss LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope. Fluorescence images were processed with the software ZEN 2.3 SP1 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Immunohistochemical staining was independently evaluated by two observers. Staining distribution was recorded. Label intensity was scored as negative (-), weak (+), intermediate (++), or strongly positive (+++).

#### 4.4. In situ ATPase, ADPase, AMPase, and TPPase Activity Experiments

A protocol based on the Wachstein/Meisel lead phosphate method was used [8,11,44,45]. The sections were washed twice with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 and pre-incubated for 30 min at RT with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 containing 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.25 mM sucrose. The enzymatic reaction was carried out by incubating tissue sections for 1 h at 37 °C with 50 mM

Tris-maleate buffer pH 7.4 supplemented with 0.25 mM sucrose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 3 % Dextran, 2 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and 2 mM CaCl<sub>2</sub>. All experiments were performed in the presence of 2.5 mM levamisole, as an inhibitor of alkaline phosphatase (AP) activity, and in the presence of 1 mM AMP, ADP, ATP, or TPP as a substrate. TPP is a false substrate, which can be cleaved by the pyrophosphatase activity of E-NPPs. Control assays were performed in the absence of nucleotide. For E-NTPDase inhibition experiments, 1 mM POM 1 was added to pre-incubation and enzymatic reaction buffers. For CD73 inhibition experiments, 1 mM  $\alpha$ ,  $\beta$ -meADP was added to pre-incubation and enzymatic reaction buffers. The reaction was revealed by incubation with 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S (*v/v*) for exactly 1 min. Nuclei were counterstained with haematoxylin. Samples were mounted with aqueous mounting medium (Fluoromount™, Sigma-Aldrich), observed under a light Nikon Eclipse E200 microscope, and photographed under a light Leica DMD 108 microscope.

#### 4.5. Statistical Analysis

The predictive analytics software IBM SPSS Statistics v22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the creation of frequency tables with the distribution of ectonucleotidases in each endometrial component as well as the label intensity score in each case.

## 5. Conclusions

In the present study, we examined the presence of ectonucleotidases in eutopic and ectopic endometrial tissue in endometriosis. The main changes in expression and activity were found in the stromal compartment. We observed loss of the main route of ATP hydrolysis, the CD39-CD73 axis, in deep infiltrating endometriosis, the most severe endometriosis subtype. These findings point to ATP accumulation in the endometrial tissue microenvironment in endometriosis as possibly contributing to the two main symptoms of the disease: pain and infertility. Remarkably, we noted that immunodetection of NPP3 in endometrial stroma is exclusive to the endometriosis condition, and therefore it may well be a histological marker of the disease. Future studies on the role of purinergic signaling in endometriosis are needed to elucidate the underlying cellular and molecular mechanisms and to identify new diagnostic and therapeutic targets.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5532/s1>. Figure S1. Immunolocalization of CD39 (A), NTPDase2 (B), NTPDase3 (C), NPP3 (D), CD73 (E), and CD26 (F) in atrophic endometria from women with endometriosis. Scale bars are 100  $\mu$ m (A,C–F) and 200  $\mu$ m (B). Figure S2. Immunolocalization of NTPDase2 in peritoneal (A), ovarian (B), and deep endometriosis lesions (C). There is NTPDase2 labelling in the connective tissue limiting the lesions (*arrows*). Scale bars are 100  $\mu$ m (A,C) and 300  $\mu$ m (B). Figure S3. Confocal fluorescence images of a proliferative endometrium (A–D) of a woman with endometriosis and an ovarian endometrioma (E–H) labeled with the antibodies against NTPDase2 (A,E) and the eMSC marker SUSD2 (B,F). Nuclei were labeled with DAPI (C,G). Merge images (D,H) show the co-localization of NTPDase2 and SUSD2 in perivascular cells in the eutopic and ectopic endometrial tissue. Scale bars are 50  $\mu$ m (D,H).

**Author Contributions:** C.T. contributed to the design and execution of the experiments, and contributed to the writing of the paper. A.V., F.T., and X.M.-G. performed the histopathologic diagnostic. I.G.d.A. contributed to conducting the experiments. J.S. generated the antibodies against *ENTPD2* and *ENTPD3*. M.E.F.-M., P.B., B.C., and J.P. visited the women included in the study, made the clinical diagnoses, and performed the surgery to obtain the samples. M.M.-S. conceived the study and contributed to conducting the experiments and to the writing of the paper.

**Funding:** This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (grant numbers: FIS PI15/00036, PI18/00541), co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)–“a Way to Build Europe”–/FONDOS FEDER “una manera de hacer Europa”, and a grant from the Fundación Merck Salud (Ayuda Merck de Investigación 2016-Fertilidad). JS received support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and was the recipient of a “Chercheur National” research award from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS).

**Acknowledgments:** We dedicate this work to the memory of our beloved colleague and friend Lluís de Jover Armengol. We thank CERCA Programme (Generalitat de Catalunya) for institutional support, Tom Yohannan for language editing, and Serveis Científics i Tecnològics (Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona) for technical support. We are grateful to the women who donated their samples for the study and to the endometriosis association Endo&Cat for supporting the project.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## Abbreviations

ATP	Adenosine triphosphate
E-NPP	Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase
E-NTPDase	Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase
ADP	Adenosine diphosphate
AMP	Adenosine monophosphate
5'-NT	5'-nucleotidase
ADA	Adenosine deaminase
eMSC	Endometrial mesenchymal stem cell
SUSD2	Sushi domain containing 2
SMA	Smooth muscle actin
TPP	Thiamine pyrophosphate
$\alpha$ , $\beta$ -meADP	$\alpha$ , $\beta$ -methylene-ADP
ATP1B4	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> Transporting Family Member Beta 4
DPPIV	Dipeptidyl peptidase IV
HRP	Horseradish peroxidase
DAB	3, 3'-diaminobenzidine substrate
AP	Alkaline phosphatase

## Appendix A

**Table A1.** Summary of the number and proportion of tissues labeled with different antibodies.

Samples Stained	NTPDase1 (CD39)	NTPDase2	NTPDase3	NPP3	5'-NT (CD73)	CD26
	Positive Cases/Total of Samples (% of Tissues Stained)					
<i>Eutopic endometrium</i>						
Surface epithelium	1/14 (7.1%)	14/14 (100%)	7/13 (53.8%)	12/13 (92.3%)	9/12 (75%)	7/14 (50%)
Glandular epithelium	1/20 (5%)	20/20 (100%)	16/20 (80%)	18/19 (94.7%)	20/20 (100%)	15/20 (75%)
Endometrial stromal cells	7/20 (35%)	20/20 (100%)	0/20 (0%)	15/19 (78.9%)	12/20 (60%)	0/20 (0%)
Spiral arteries	19/20 (95%)	3/20 (15%)	5/20 (25%)	16/18 (88.9%)	3/20 (15%)	3/19 (15.8%)
<i>Peritoneal endometriosis</i>						
Endometrial epithelial cells	1/7 (14.3%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	5/7 (71.4%)	4/7 (57.1%)
Endometrial stromal cells	6/7 (85.7%)	7/7 (100%)	0/7 (0%)	7/7 (100%)	5/7 (71.4%)	2/7 (28.6%)
Vessels of the lesion	5/7 (71.4%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/7 (14.28%)	0/7 (0%)
<i>Ovarian endometriosis</i>						
Endometrial epithelial cells	8/28 (28.6%)	20/28 (71.4%)	16/28 (57.1%)	24/28 (85.7%)	24/28 (85.7%)	19/28 (67.9%)
Endometrial stromal cells	16/27 (59.3%)	10/27 (37%)	3/27 (11.1%)	16/27 (59.3%)	13/27 (48.1%)	2/27 (7.4%)
Vessels of the lesion	23/28 (82.1%)	1/28 (3.6%)	2/28 (7.1%)	8/28 (28.6%)	3/28 (10.7%)	3/28 (10.7%)
<i>Deep endometriosis</i>						
Endometrial epithelial cells	6/28 (21.4%)	23/26 (88.5%)	12/27 (44.4%)	24/28 (85.7%)	17/28 (60.7%)	15/28 (53.6%)
Endometrial stromal cells	9/25 (36%)	17/26 (65.4%)	1/27 (3.7%)	18/27 (66.7%)	6/27 (22.2%)	1/27 (3.7%)
Vessels of the lesion	11/24 (45.8%)	5/25 (20%)	1/27 (3.7%)	7/27 (25.9%)	7/27 (25.9%)	0/27 (0%)

## References

- Ponandai-Srinivasan, S.; Andersson, K.L.; Nister, M.; Saare, M.; Hassan, H.A.; Varghese, S.J.; Peters, M.; Salumets, A.; Gemzell-Danielsson, K.; Lalitkumar, P.G.L. Aberrant expression of genes associated with stemness and cancer in endometria and endometrioma in a subset of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* **2018**, *33*, 1924–1938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grandi, G.; Mueller, M.D.; Papadia, A.; Kocbek, V.; Bersinger, N.A.; Petraglia, F.; Cagnacci, A.; McKinnon, B. Inflammation influences steroid hormone receptors targeted by progestins in endometrial stromal cells from women with endometriosis. *J. Reprod. Immunol.* **2016**, *117*, 30–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Nothnick, W.; Alali, Z. Recent advances in the understanding of endometriosis: The role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. *F1000Research* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ahn, S.H.; Khalaj, K.; Young, S.L.; Lessey, B.A.; Koti, M.; Tayade, C. Immune-inflammation gene signatures in endometriosis patients. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 1420–1431. [[CrossRef](#)]
5. Zhang, T.; De Carolis, C.; Man, G.C.W.; Wang, C.C. The link between immunity, autoimmunity and endometriosis: A literature update. *Autoimmun. Rev.* **2018**, *17*, 945–955. [[CrossRef](#)]
6. Yegutkin, G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 473–497. [[CrossRef](#)]
7. Ziganshin, A.U.; Zaitcev, A.P.; Khasanov, A.A.; Shamsutdinov, A.F.; Burnstock, G. Term-dependency of P2 receptor-mediated contractile responses of isolated human pregnant uterus. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2006**, *129*, 128–134. [[CrossRef](#)]
8. Aliagas, E.; Vidal, A.; Torrejon-Escribano, B.; Taco Mdel, R.; Ponce, J.; de Aranda, I.G.; Sevigny, J.; Condom, E.; Martin-Satue, M. Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 227–237. [[CrossRef](#)]
9. Burnstock, G. Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. *Purinergic Signal.* **2014**, *10*, 157–187. [[CrossRef](#)]
10. Bellezza, I.; Minelli, A. Adenosine in sperm physiology. *Mol. Asp. Med.* **2017**, *55*, 102–109. [[CrossRef](#)]
11. Villamonte, M.L.; Torrejon-Escribano, B.; Rodriguez-Martinez, A.; Trapero, C.; Vidal, A.; Gomez de Aranda, I.; Sevigny, J.; Matias-Guiu, X.; Martin-Satue, M. Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity. *Histochem. Cell Biol.* **2018**, *149*, 269–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Barrera, N.P.; Morales, B.; Villalon, M. Plasma and intracellular membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate the Ca(2+) increase associated with the ATP-induced increase in ciliary beat frequency. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *287*, C1114–C1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Yegutkin, G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1783*, 673–694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Trapero, C.; Vidal, A.; Rodriguez-Martinez, A.; Sevigny, J.; Ponce, J.; Coroleu, B.; Matias-Guiu, X.; Martin-Satue, M. The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: A novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells. *Purinergic Signal.* **2019**, *15*, 225–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Texido, L.; Romero, C.; Vidal, A.; Garcia-Valero, J.; Fernandez Montoli, M.E.; Baixeras, N.; Condom, E.; Ponce, J.; Garcia-Tejedor, A.; Martin-Satue, M. Ecto-nucleotidases activities in the contents of ovarian endometriomas: Potential biomarkers of endometriosis. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 120673. [[CrossRef](#)]
16. Trapero, C.; Jover, L.; Fernandez-Montoli, M.E.; Garcia-Tejedor, A.; Vidal, A.; Gomez de Aranda, I.; Ponce, J.; Matias-Guiu, X.; Martin-Satue, M. Analysis of the ectoenzymes ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3, in the contents of ovarian endometriomas as candidate biomarkers of endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2018**, *79*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bono, M.R.; Fernandez, D.; Flores-Santibanez, F.; Roseblatt, M.; Sauma, D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 3454–3460. [[CrossRef](#)]
18. Aliagas, E.; Torrejon-Escribano, B.; Lavoie, E.G.; de Aranda, I.G.; Sevigny, J.; Solsona, C.; Martin-Satue, M. Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidase/CD73 along the mouse female estrous cycle. *Acta Physiol.* **2010**, *199*, 191–197. [[CrossRef](#)]
19. Mate, G.; Bernstein, L.R.; Torok, A.L. Endometriosis is a cause of infertility. Does reactive oxygen damage to gametes and embryos play a key role in the pathogenesis of infertility caused by endometriosis? *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 725. [[CrossRef](#)]
20. Ahn, S.H.; Monsanto, S.P.; Miller, C.; Singh, S.S.; Thomas, R.; Tayade, C. Pathophysiology and immune dysfunction in endometriosis. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 795976. [[CrossRef](#)]
21. Faas, M.M.; Saez, T.; de Vos, P. Extracellular ATP and adenosine: The yin and yang in immune responses? *Mol. Asp. Med.* **2017**, *55*, 9–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhang, C.; Gao, L.; Yi, Y.; Han, H.; Cheng, H.; Ye, X.; Ma, R.; Sun, K.; Cui, H.; Chang, X. Adenosine triphosphate regresses endometrial explants in a rat model of endometriosis. *Reprod. Sci.* **2016**, *23*, 924–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



23. Zhang, H.; Niu, Y.; Feng, J.; Guo, H.; Ye, X.; Cui, H. Use of proteomic analysis of endometriosis to identify different protein expression in patients with endometriosis versus normal controls. *Fertil. Steril.* **2006**, *86*, 274–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zhao, Y.; Liu, Y.N.; Li, Y.; Tian, L.; Ye, X.; Cui, H.; Chang, X.H. Identification of biomarkers for endometriosis using clinical proteomics. *Chin. Med. J.* **2015**, *128*, 520–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ding, S.; Zhu, L.; Tian, Y.; Zhu, T.; Huang, X.; Zhang, X. P2X3 receptor involvement in endometriosis pain via ERK signaling pathway. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184647. [[CrossRef](#)]
26. Yuan, M.; Ding, S.; Meng, T.; Lu, B.; Shao, S.; Zhang, X.; Yuan, H.; Hu, F. Effect of A-317491 delivered by glycolipid-like polymer micelles on endometriosis pain. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 8171–8183. [[CrossRef](#)]
27. Alimi, Y.; Iwanaga, J.; Loukas, M.; Tubbs, R.S. The clinical anatomy of endometriosis: A review. *Cureus* **2018**, *10*, e3361. [[CrossRef](#)]
28. Bowser, J.L.; Blackburn, M.R.; Shipley, G.L.; Molina, J.G.; Dunner, K., Jr.; Broaddus, R.R. Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 220–238. [[CrossRef](#)]
29. Sampson, J. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1927**, *14*, 422–469. [[CrossRef](#)]
30. Hood, B.L.; Liu, B.; Alkhas, A.; Shoji, Y.; Challa, R.; Wang, G.; Ferguson, S.; Oliver, J.; Mitchell, D.; Bateman, N.W.; et al. Proteomics of the human endometrial glandular epithelium and stroma from the proliferative and secretory phases of the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* **2015**, *92*, 106. [[CrossRef](#)]
31. Boggavarapu, N.R.; Lalitkumar, S.; Joshua, V.; Kasvandik, S.; Salumets, A.; Lalitkumar, P.G.; Gemzell-Danielsson, K. Compartmentalized gene expression profiling of receptive endometrium reveals progesterone regulated ENPP3 is differentially expressed and secreted in glycosylated form. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Donate, F.; Raitano, A.; Morrison, K.; An, Z.; Capo, L.; Avina, H.; Karki, S.; Yang, P.; Ou, J.; Moriya, R.; et al. AGS16F is a novel antibody drug conjugate directed against ENPP3 for the treatment of renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1989–1999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tsai, S.H.; Takeda, K. Regulation of allergic inflammation by the ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) on basophils and mast cells. *Semin. Immunopathol.* **2016**, *38*, 571–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chen, Q.; Xin, A.; Qu, R.; Zhang, W.; Li, L.; Chen, J.; Lu, X.; Gu, Y.; Li, J.; Sun, X. Expression of ENPP3 in human cyclic endometrium: A novel molecule involved in embryo implantation. *Reprod. Fertil. Dev.* **2018**, *30*, 1277–1285. [[CrossRef](#)]
35. Deissler, H.; Blass-Kampmann, S.; Bruyneel, E.; Mareel, M.; Rajewsky, M.F. Neural cell surface differentiation antigen gp130(RB13-6) induces fibroblasts and glioma cells to express astroglial proteins and invasive properties. *FASEB J.* **1999**, *13*, 657–666. [[CrossRef](#)]
36. Thompson, J.A.; Motzer, R.J.; Molina, A.M.; Choueiri, T.K.; Heath, E.I.; Redman, B.G.; Sangha, R.S.; Ernst, D.S.; Pili, R.; Kim, S.K.; et al. Phase I Trials of Anti-ENPP3 Antibody-drug conjugates in advanced refractory renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 4399–4406. [[CrossRef](#)]
37. Rockenbach, L.; Braganhol, E.; Dietrich, F.; Figueiro, F.; Pugliese, M.; Edelweiss, M.I.; Morrone, F.B.; Seigny, J.; Battastini, A.M. NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. *Purinergic Signal.* **2014**, *10*, 421–430. [[CrossRef](#)]
38. Yang, X.; Zhang, X.; Wu, R.; Huang, Q.; Jiang, Y.; Qin, J.; Yao, F.; Jin, G.; Zhang, Y. DPPIV promotes endometrial carcinoma cell proliferation, invasion and tumorigenesis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 8679–8692. [[CrossRef](#)]
39. Tan, C.W.; Lee, Y.H.; Tan, H.H.; Lau, M.S.; Choolani, M.; Griffith, L.; Chan, J.K. CD26/DPPIV down-regulation in endometrial stromal cell migration in endometriosis. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 167–177. [[CrossRef](#)]
40. Busacca, M.; Chiaffarino, F.; Candiani, M.; Vignali, M.; Bertulesi, C.; Oggioni, G.; Parazzini, F. Determinants of long-term clinically detected recurrence rates of deep, ovarian, and pelvic endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2006**, *195*, 426–432. [[CrossRef](#)]
41. Koninckx, P.R.; Meuleman, C.; Demeyere, S.; Lesaffre, E.; Cornillie, F.J. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil. Steril.* **1991**, *55*, 759–765. [[CrossRef](#)]
42. Burnstock, G. Purinergic mechanisms and pain. *Adv. Pharmacol.* **2016**, *75*, 91–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fung, C.Y.; Marcus, A.J.; Broekman, M.J.; Mahaut-Smith, M.P. P2X(1) receptor inhibition and soluble CD39 administration as novel approaches to widen the cardiovascular therapeutic window. *Trends Cardiovasc. Med.* **2009**, *19*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

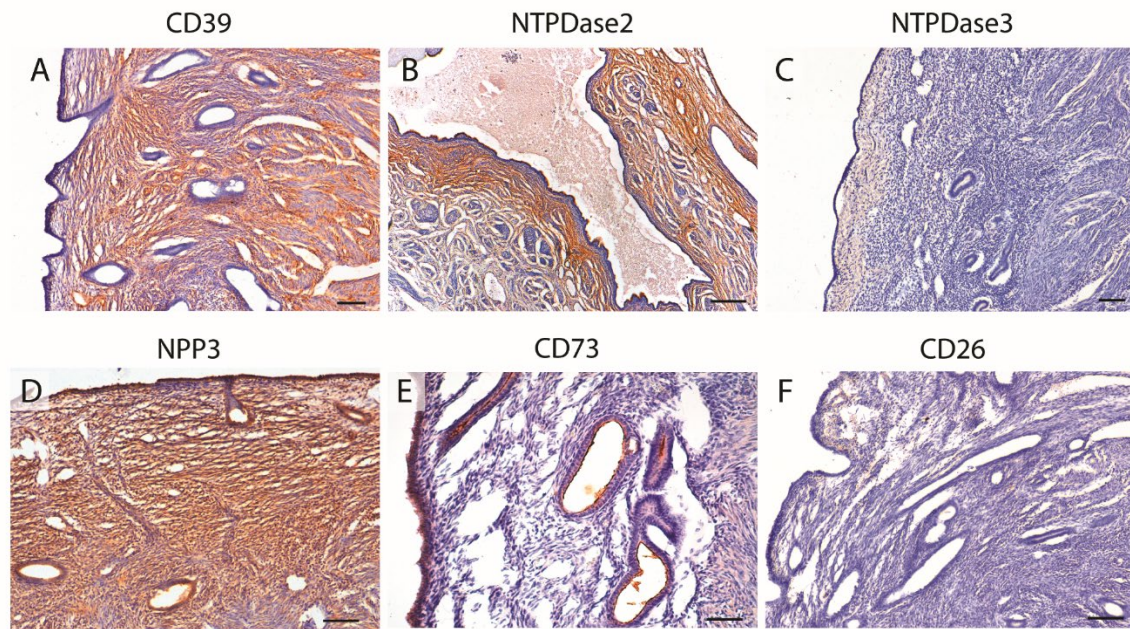


44. Wachstein, M.; Meisel, E. Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH; with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* **1957**, *27*, 13–23. [[CrossRef](#)]
45. Martín-Satué, M.; Rodríguez-Martínez, A.; Trapero, C. In situ identification of ectoenzymes involved in the hydrolysis of extracellular nucleotides. In *Immunohistochemistry*; IntechOpen: London, UK, 2019.



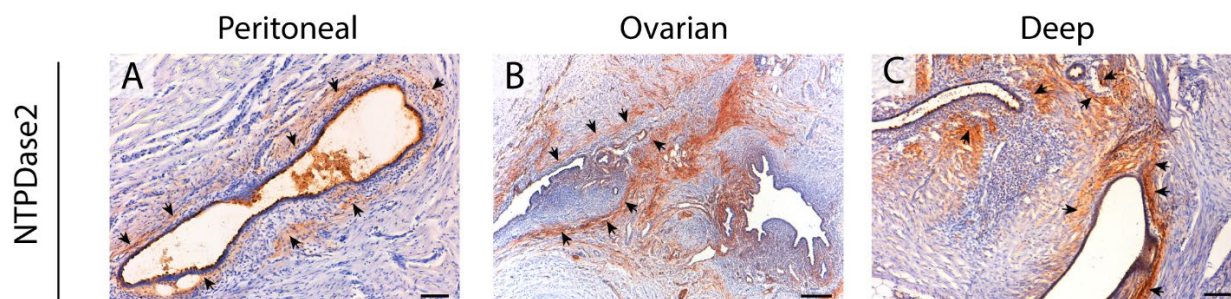
© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Material suplementari 1



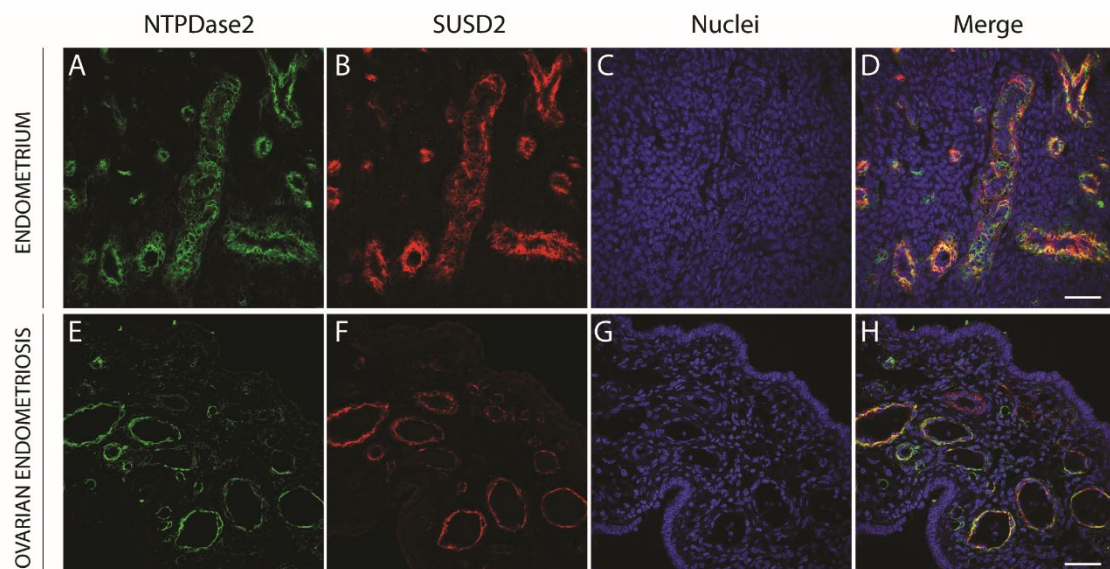
**Figure S1.** Immunolocalization of CD39 (A), NTPDase2 (B), NTPDase3 (C), NPP3 (D), CD73 (E), and CD26 (F) in atrophic endometria from women with endometriosis. Scale bars are 100  $\mu\text{m}$  (A, C-F) and 200  $\mu\text{m}$  (B).

Material suplementari 2



**Figure S2.** Immunolocalization of NTPDase2 in peritoneal (A), ovarian (B), and deep endometriosis lesions (C). There is NTPDase2 labelling in the connective tissue limiting the lesions (arrows). Scale bars are 100  $\mu\text{m}$  (A,C) and 300  $\mu\text{m}$  (B).

## Material suplementari 3



**Figure S3.** Confocal fluorescence images of a proliferative endometrium (A–D) of a woman with endometriosis and an ovarian endometrioma (E–H) labeled with the antibodies against NTPDase2 (A,E) and the eMSC marker SUSD2 (B,F). Nuclei were labeled with DAPI (C,G). Merge images (D,H) show the co-localization of NTPDase2 and SUSD2 in perivascular cells in the eutopic and ectopic endometrial tissue. Scale bars are 50  $\mu\text{m}$  (D,H).



## **CAPÍTOL 5**

**Els cultius cel·lulars primaris d'estroma endometrial  
com a eina d'estudi del paper de la senyalització  
purinèrgica en l'endometriosis**





## 1. INTRODUCCIÓ

L'endometriosis és una malaltia ginecològica complexa que encara presenta molts interrogants que calen ser resolts. És per això, que es va formar una associació per establir les prioritats en la recerca de l'endometriosis [Endometriosis Priority Setting Partnership (PSP)]. La PSP va recollir un llistat amb les deu preguntes clau sobre l'endometriosis formulades per professionals de la salut i per pacients amb la malaltia [235]. La llista reflecteix la urgència d'identificar l'etiologia de la malaltia, desenvolupar eines de diagnòstic no invasives, reduir el temps necessari per obtenir un diagnòstic definitiu, elucidar les vies implicades en la progressió, i de desenvolupar noves eines terapèutiques que frenin o curin la malaltia [235]. Per poder assolir aquestes fites, es requereixen estudis integrats, que combinin l'estudi de teixit i fluids derivats de pacients junt amb la utilització de models *in vitro* i *in vivo* [236].

En aquest sentit, en el primer capítol de la present tesi doctoral ens hem centrat en l'estudi de candidats a biomarcadors en fluids d'endometriomes que permetin un diagnòstic primerenc i no invasiu de la malaltia. En els capítols 2, 3 i 4, la recerca s'ha focalitzat en la caracterització de les ectonucleotidases en les trompes i en el teixit endometrial humà, amb la descripció de l'expressió diferencial de les ectonucleotidases en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis. En aquest cinquè capítol, l'esforç s'ha orientat en l'establiment d'un model *in vitro* que permeti l'estudi dels diferents elements de la senyalització purinèrgica, entre ells les ectonucleotidases, per poder investigar els mecanismes moleculars relacionats amb aquesta senyalització cel·lular i l'endometriosis, i definir noves dianes terapèutiques per aquesta malaltia majoritàriament crònica.

En els darrers anys, s'han utilitzat diferents tipus cel·lulars, de manera individual o en cocultiu, com a models *in vitro* per l'estudi de l'endometriosis, incloent cèl·lules endometriòmiques immortalitzades [237,238], cultius primaris de cèl·lules endometrials epitelials i estromals [239-241], cèl·lules mare endometrials [242,243] i cèl·lules immunitàries [244,245] (revisat en [236] i [246]). L'ús del model adequat per cada línia d'investigació permet investigar en detall un o diversos aspectes dels processos associats amb l'endometriosis.

L'ús de cultius primaris de cèl·lules endometrials epitelials i/o estromals humanes com a model d'estudi presenta un principal avantatge respecte les línies cel·lulars, una major homologia amb la situació real *in vivo* [246]. Com s'ha esmentat prèviament, la teoria de la menstruació retrògrada de Sampson és la més acceptada per explicar l'origen de les lesions endometriòmiques [30]. Segons aquesta teoria, l'origen de les lesions resideix en les cèl·lules endometrials eutòpiques que es desprenen durant la menstruació. Per aquest motiu, juntament amb el poc nombre de cèl·lules endometrials que es poden obtenir de les lesions endometriòmiques [236], converteixen l'endometri eutòpic de les pacients amb endometriosis com a la principal font per l'obtenció de cultius primaris de cèl·lules endometrials per l'estudi de l'endometriosis [246].

## 2. OBJECTIUS

Els estudis realitzats en el teixit endometrial de dones amb endometriosis (veure **capítol 4**), van mostrar diferències principalment en el component estromal. Donada la implicació de les cèl·lules estromals en la regeneració cíclica de l'endometri i en la formació de les lesions, és necessari **l'estudi del paper de la senyalització purinèrgica en cultius primaris de cèl·lules endometrials estromals** de dones amb i sense endometriosis per definir el mecanisme cel·lular que succeeix en la formació i progressió de l'endometriosis, així com per aïllar noves dianes terapèutiques.

Per tant, l'objectiu que es planteja és el de **conèixer el paper de l'estroma en el context de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis**. Donada la gran dimensió d'aquest objectiu, ens hem proposat el següent objectiu específic:

1. **Establir el mètode d'obtenció i manteniment dels cultius primaris d'estroma endometrial i validar-ne el seu ús per a l'estudi de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis.**

S'han descrit diferents mètodes d'obtenció de cultius primaris d'estroma endometrial. El nostre objectiu és establir un mètode simple i eficaç que ens permeti disposar d'un bon model d'estudi *in vitro* de la senyalització purinèrgica a l'endometri.

Amb aquest objectiu metodològic pretenem aportar eines per aconseguir un estudi complet de l'estroma endometrial, que pot aportar informació útil per augmentar el coneixement de la malaltia de l'endometriosis, però també sobre el funcionament fisiològic de l'endometri no patològic o la implicació de l'estroma en altres patologies endometrials, com és el càncer d'endometri.

## 3. MATERIALS I MÈTODES

### 3.1. Mètode d'obtenció i manteniment dels cultius primaris d'estroma endometrial

#### 3.1.1. Mostres

Els principis ètics d'aquest estudi s'adhereixen a la Declaració de Helsinki, i tots els procediments han sigut aprovats per el comitè ètic per investigació clínica de l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB) (codi PR090/15, Acta 21/16, 12/2016). Totes les pacients incloses han donat el consentiment informat per escrit.

Tretze pacients sense patologia endometrial van ser incloses en l'estudi entre el gener de 2018 i el juliol de 2019. També 3 pacients amb un diagnòstic definitiu d'endometriosis pel Servei de Ginecologia de l'HUB van participar entre l'abril de 2018 i l'octubre de 2020. Dues pacients van

presentar lesions endometriòtiques profundes i infiltrants, una d'elles amb la coexistència d'endometriomes, i la tercera va ser diagnosticada només d'endometriomes ovàrics.

Adicionalment, una pacient amb un diagnòstic de càncer d'endometri de tipus endometriòide de grau 1 pel Servei de Ginecologia de l'HUB va ser inclosa el març de 2018. En la **Taula M1** s'ha recollit la descripció demogràfica de les pacients incloses en l'estudi.

Petits fragments d'endometri (en fresc i fixats amb paraformaldehid (PFA) al 4 %) de les pacients participants es van obtenir de peces quirúrgiques d'histerectomies realitzades al Servei de Ginecologia de l'HUB. Les peces van ser diagnosticades al Servei d'Anatomia Patològica de l'HUB. Excepte la mostra de càncer d'endometri, les mostres fixades es van incloure en l'estudi del **capítol 4**. Aquestes mostres, es van crioprotegir introduint-les en una solució de sucrosa al 30 % (pes/volum) a 4 °C durant 24 hores, per la seva posterior inclusió en medi de congelació O.C.T (Tissue-Tek®; Sakura Finetk, Zoeterwoude, Països Baixos). Seccions de 15 µm de gruix es van obtenir utilitzant el criòstat Leica CM1950 (Leica, Wetzlar, Alemanya). Les seccions es van col·locar en un portaobjectes poli-l-lisinat i es van mantenir a 20 °C fins el seu ús. Posteriorment es van realitzar els estudis d'immunohistoquímica (materials i mètodes detallats en Traperó et al. 2019 [247], veure **capítol 4**).

**Taula M1.** Demografia de les pacients de l'estudi

	Fase del cicle uterí	Número de casos (n)	Edat (anys ± desviació estàndard)
<b>Pacients sense patologia endometrial</b>	Proliferativa	3	46 ± 3.46
	Secretora	2	45 ± 4.24
	Estat atròfic	7	53.86 ± 10.17
<b>Pacients amb endometriosis</b>	Proliferativa	1	44 ± 0.00
	Secretora	2	46 ± 0.00
<b>Pacient amb càncer d'endometri</b>	Secretora	1	46

### 3.1.2. Procés d'obtenció del cultiu primari d'estroma endometrial

Al Servei d'Anatomia Patològica, immediatament després de la recepció de la peça quirúrgica obtinguda per histerectomia, es va recollir un petit fragment (de 1.5-2 cm<sup>3</sup>) en condicions estèrils. Posteriorment, es va rentar el fragment amb tampó de fosfat salí (PBS, de l'anglès *phosphate buffer saline*) i es va procedir a l'aïllament de l'endometri, eliminant la capa muscular subjacent (miometri). La mostra de teixit en fresc es va conservar en medi *Hank's Balanced Salt Solution*

(HBSS) lliure de  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  a temperatura ambient (TA) fins a ser recollit minuts després per ser processat en el nostre laboratori.

Sempre treballant en la campana de la sala de cultius cel·lulars per mantenir les condicions d'esterilitat, es va realitzar un parell de rentats amb HBSS. A continuació, es va disseccionar la mostra amb l'ajut d'un bisturí per aconseguir fragments cúbics d'aproximadament d' $1\text{mm}^3$ . Aquests, es van introduir en un tub amb 10 ml de la solució comercial Accumax™ (A7089; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya), formada per enzims proteolítics i col·lagenolítics, i es van incubar durant 1 hora a TA en un agitador amb moviment suau de balanceig per aconseguir dissociar les cèl·lules del teixit.

Amb l'ajut d'un filtre de niló amb porus de  $70\ \mu\text{m}$  de diàmetre (BD Falcon™, Durham, Carolina del Nord, USA), es van aïllar de la solució les cèl·lules estromals de la resta de cèl·lules. El filtre va retenir els agregats de les cèl·lules endometrials epitelials, permetent el pas de les estromals i de les del sistema immunitari. La solució amb les cèl·lules filtrades es va centrifugar a TA durant 5 minuts a  $800 \times g$ . El pèl·let de cèl·lules es va resuspendre amb medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) / F12 (HAM) relació 1:1 (31330-095; Life Technologies, Paisley, Regne Unit), suplementat amb L-glutamina, 15 mM HEPES, 10 % de sèrum fetal boví (FBS; de l'anglès *Fetal Bovine Serum*) (04-007-1A; Biological Industries, Beit-Haemek, Israel), 100 U/ml de penicil·lina i 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'estreptomicina (Sigma-Aldrich). Finalment es va plantar les cèl·lules en aquest mateix medi en un pou d'una placa estèril de 6 pous (àrea de creixement de  $9.2\ \text{cm}^2$ ). El medi utilitzat no és favorable pel creixement de les cèl·lules del sistema immunitari, per això va ser important realitzar el canvi del medi a les 24 hores per aconseguir eliminar les cèl·lules residuals del sistema immunitari, els eritròcits, i el detrit cel·lular.

Les cèl·lules es van incubar a  $37\ ^\circ\text{C}$  a una atmosfera humida de 5 % de  $\text{CO}_2$  i es va realitzar el seu seguiment gràcies a la seva observació mitjançant un microscopi òptic invertit (model Olympus CK-40).

### 3.1.3. Manteniment del cultiu primari d'estroma endometrial

Quan les cèl·lules del cultiu primari van assolir el 80-90 % de confluència es va realitzar el pas d'aquestes en un nou flascó de  $25\ \text{cm}^2$  amb medi de cultiu nou. En els posterior passes, les cèl·lules es van mantenir en flascons de  $25\ \text{cm}^2$ , transferint la meitat o un terç del total de les cèl·lules del flascó confluent.

Per fer el pas de les cèl·lules, aquestes es van netejar amb PBS i es van incubar a  $37\ ^\circ\text{C}$ , durant 6 minuts amb l'enzima proteasa tripsina (Life Technologies) per eliminar la seva adhesió a la superfície del flascó. La seva acció es va neutralitzar amb l'adició de medi de cultiu.

Durant els primers passes de cèl·lules, una part d'elles es van criopreservar en nitrogen líquid, amb el seu medi de cultiu i 10 % de dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma-Aldrich), per tenir una font de reserva de cada cultiu primari generat pels diferents experiments.

Es va realitzar un seguiment fotogràfic dels cultius primaris d'estroma endometrial durant els primers 4 passes de cèl·lules amb el microscopi Leica DIMRB. Excepcionalment, per observar els canvis morfològics i el límit de passes del nostre model es van mantenir fins el pas cel·lular número 12.

Un cop establerts els cultius de cèl·lules estromals, aquests es van utilitzar per estudis d'expressió proteica, d'expressió gènica, d'activitat nucleotidasa *in situ* i per estudis funcionals. En la literatura, la majoria d'assajos realitzats en cultius primaris de cèl·lules estromals endometrials s'han dut a terme en els passes 3-5 [248,249]. Tots els nostres experiments s'han realitzat amb les cèl·lules estromals endometrials en passe 4 (P4), si no s'especifica el contrari.

## **3.2. Estudi de les ectonucleotidases en el cultiu primari d'estroma endometrial**

### **3.2.1. Processament de les cèl·lules per als estudis d'immunofluorescència i d'activitat enzimàtica *in situ***

Pels estudis d'immunofluorescència i d'activitat nucleotidasa *in situ*, es va realitzar el pas de les cèl·lules en P4 a plaques de 24 pous en una concentració de  $5 \times 10^4$  cèl·lules per pou amb el seu medi de cultiu sobre cobreobjectes rodons de 12 mm de diàmetre (VWR, Radnor, Filadèlfia, USA) tractats, prèviament, amb poli-L-lisina al 0.05 % (*Poly-L-Lysine solution*; Sigma-Aldrich). En arribar a la confluència, les cèl·lules es van rentar dos cops amb PBS. Posteriorment, es van fixar amb PFA al 4 % durant 5 minuts, seguit de tres rentats de PBS. Les cèl·lules es van conservar amb PBS a 4 °C fins al seu ús, durant un màxim de tres setmanes per evitar risc de contaminacions.

### **3.2.2. Experiments d'immunofluorescència**

Per confirmar el fenotip de cèl·lules estromals i caracteritzar l'expressió proteica de les ectonucleotidases de membrana en els cultius primaris d'estroma endometrial, es van realitzar estudis d'immunofluorescència.

Les cèl·lules, ja fixades sobre el cobreobjectes, es van temperar i rentar un parell de vegades amb PBS. Per bloquejar les unions inespecífiques dels anticossos, es va realitzar una pre-incubació amb una solució de PBS amb sèrum normal de cabra al 20 % (NGS; Gibco, Paisley, Regne Unit) i gelatina al 0.2 % (Merck, Darmstadt, Alemanya) durant 1 hora a TA en agitació suau i balancejada.

A continuació, es va realitzar la incubació de les cèl·lules amb l'anticòs primari en la dilució òptima en PBS durant tota la nit a 4 °C i en agitació (veure **Taula M2**). Posteriorment, es van realitzar 3 rentats amb PBS i es va incubar amb l'anticòs secundari adient, contra immunoglobulines de ratolí o conill, conjugat amb el fluorocrom Alexa fluor 488 (verd) (A11029 i A11034, respectivament; Invitrogen, Paisley, Regne Unit) diluït 1:500 en PBS, durant 1 hora, a TA, en



agitació i protegit de la llum. Com a control dels experiments, es van afegir de rutina mostres incubades amb l'anticòs secundari, sense la incubació prèvia amb l'anticòs primari.

Després de rentar 3 vegades amb PBS per a l'eliminació de l'anticòs secundari no unit, es van incubar les cèl·lules 7 minuts a TA amb el marcador de nuclis To-Pro®-3 (T3605; Molecular Probes, Leiden, Països Baixos). Es van rentar 3 vegades amb PBS i seguidament, es van muntar els cobreobjectes amb medi de muntatge aquós (*Fluoromount*; Sigma-Aldrich). Els resultats es van

poder visualitzar i fotografiar en el microscopi d'espectre confocal Leica TCS-SL (Leica) en els Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB; Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Campus Bellvitge). Les imatges es van processar amb el programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Per canvis en l'equipament del CCiTUB durant el transcurs de la tesi doctoral, el protocol es va modificar i, alternativament, després de rentar l'anticòs secundari amb PBS, es va realitzar el muntatge del cobreobjectes amb medi de muntatge aquós amb DAPI per marcar els nuclis (*ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI*; Life Technologies, Paisley, Regne Unit). Les cèl·lules es van observar per determinar la presència (+) o absència (-) de les proteïnes i es van fotografiar en el microscopi d'espectre confocal Carl Zeiss LSM 880 (Zeiss, Oberkochen, Alemanya) en el mateix CCiTUB. Les imatges de fluorescència es van processar amb el programa ZEN 2.3 SP1 (Zeiss).

**Taula M2.** Llistat d'anticòsos primaris utilitzats en els experiments d'immunofluorescència

Anticòs primari	Clon	Origen	Dilució/ Concentració òptima	Font
Anti-CD10	SP67	Conill	4.5 µg/mL	Ventana (790-4506)
Anti-CD73	4G4	Ratolí	1:50	Abcam (ab81720)
Anti-CD39	BU-61	Ratolí	1:500	Ancell (188-820)
Anti-NTPDasa2	H9s	Ratolí	1 µg/mL	<a href="http://ectonucleotidases-ab.com">http://ectonucleotidases-ab.com</a>
Anti-NPP3	NP4D6	Ratolí	1:100	Abcam (ab90754)

### 3.2.3. Experiments d'activitat enzimàtica *in situ*

Per la detecció de l'activitat ATPasa, ADPasa i AMPasa *in situ* en les cèl·lules endometrials estromals, es va seguir un protocol optimitzat en el laboratori, basat en el mètode de la detecció de fosfats de Wachstein/Meisel [250]. Aquest mètode es basa en la formació de precipitats de fosfat de plom en les localitzacions on es genera fosfat lliure després d'afegir nucleòtids com a substrat (ATP, ADP o AMP). Aquest fosfat es combina amb el nitrat de plom afegit a la reacció

d'incubació i gràcies a l'addició de sulfur d'amoni es pot detectar de color marró els precipitats formats, permetent detectar l'activitat ATPasa, ADPasa o AMPasa en funció del substrat utilitzat.

Breument, les cèl·lules fixades en els cobreobjectes es van rentar dues vegades amb la solució tris-maleat a 50mM pH 7.4. Seguidament es van incubar durant 30 minuts a TA amb una solució de preincubació formada per tris-maleat a 50 mM pH 7.4 amb MgCl<sub>2</sub> a 2 mM i sucrosa a 0.25 M. A continuació es va portar a terme la reacció enzimàtica a l'incubar les cèl·lules durant 1 hora a 37 °C amb tris-maleat a 50 mM pH 7.4 suplementat amb sucrosa al 0.25 M, MgCl<sub>2</sub> a 2 mM, MnCl<sub>2</sub> a 5 mM, Dextran al 3 %, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> a 2 mM, i CaCl<sub>2</sub> a 2 mM. Els experiments es van realitzar en presència de levamisol al 2.5 mM, per a inhibir l'activitat de les fosfatases alcalines, i en presència d'ATP, ADP o AMP 1 mM com a substrat de la reacció. La reacció es va aturar traient la solució d'incubació i afegint aigua Milli-Q. Es van afegir en tots els experiments mostres de control on es va ometre l'addició del substrat.

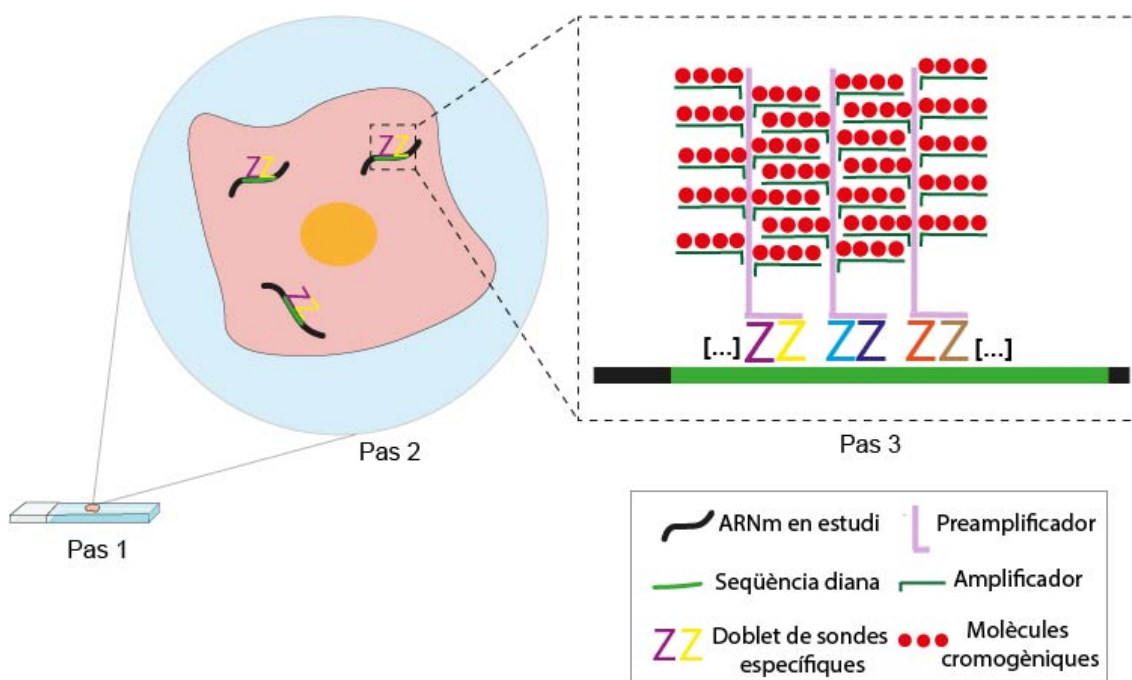
Per a la detecció de la formació dels precipitats, la reacció es va revelar amb la incubació de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S al 1 % (volum/volum) a TA durant exactament 1 minut. El revelat es va aturar traient la solució de revelat i afegint aigua Milli-Q. A continuació, els nuclis de les cèl·lules es van contratenyir amb hematoxilina diluïda 1/10 (volum/volum). Els cobreobjectes es van muntar amb medi de muntatge aquós (*Fluoromount*; Sigma-Aldrich) i es van observar les cèl·lules sota el microscopi Nikon Eclipse E200 (Nikon) per determinar la presència (+) o l'absència (-) de l'activitat nucleotidasa. Posteriorment es van fotografiar les preparacions amb el microscopi Leica DMD 108 (Leica).

En la **Figura 2 de l'Annex 1** es pot consultar una representació gràfica del protocol [165].

#### **3.2.4. Mètode de detecció de l'expressió de l'ARN *in situ*: RNAscope®**

Per la determinació de l'expressió gènica de les ectonucleotidases en els cultius primaris, es van realitzar assajos d'hibridació *in situ* (ISH; de l'anglès *in situ hybridation*) mitjançant la nova tecnologia RNAscope® (Advanced Cell Diagnostics [ACD], Newark, CA, USA) [251].

Aquesta tecnologia permet la detecció de molècules d'ARNm amb una alta especificitat i sensibilitat. A més, es produeix una amplificació de la senyal que permet fer visible cada molècula d'ARNm com una senyal puntejada sota el microscopi. Això és possible gràcies al disseny de sondes específiques per cada molècula d'ARNm que es vol detectar. Cada sonda estàndard dissenyada consisteix en 20 sondes dirigides que tenen una estructura en forma de Z. Es requereix de la hibridació de dues sondes Z independents adjacents amb la seqüència diana específica per aconseguir la seva unió amb la molècula preamplificadora, que és on s'uneix el component amplificador conjugat amb les molècules fluorescents o cromogèniques que emetran una senyal amplificada i totalment específica (**Figura M1**).



**Figura M1.** Representació esquemàtica de la tècnica d'hibridació *in situ* RNAscope (ACD) emprada en l'estudi de les ectonucleotidases en els cultius primaris d'estroma endometrial. En el pas 1, les cèl·lules estromals endometrials incloses en parafina s'han permeabilitzat per permetre l'entrada de les sondes dins les cèl·lules. En el pas 2, les sondes específiques (Z) hibriden per parelles (ZZ) en diverses regions de la seqüència diana de l'ARNm de l'ectonucleotidasa en estudi. En el pas 3, s'uneixen les molècules amplificadores conjugades amb les molècules cromogèniques a l'estructura preamplificadora unida de manera específica a les parelles de sondes, generant una senyal amplificada que permetrà veure la localització de la hibridació en forma de punts vermells a través d'un microscopi òptic. Imatge d'elaboració pròpia.

### Processament de les cèl·lules per l'ISH

Per poder realitzar el protocol de l'ISH com especifica el fabricant, vam establir un protocol de processament de les cèl·lules. Primerament, vam obtenir un pèl·let de  $10^6$  cèl·lules estromals endometrials (P4) en un tub de 50 mL. Vam resuspendre les cèl·lules en PBS i es van centrifugar a  $900 \times g$  durant 3 minuts. Seguidament, es va retirar el PBS i es va procedir a fixar les cèl·lules incubant el pèl·let cel·lular amb 10 mL de PFA al 4 % durant 24 hores a TA i en agitació continuada. Després, les cèl·lules es van centrifugar i es va eliminar el PFA sense alterar el pèl·let. Es van fer un parell de rentats amb PBS i es van transferir les cèl·lules a un tub cònic de 15 mL per aconseguir un pèl·let de morfologia cònica. Per aconseguir un pèl·let amb una rigidesa adequada per poder treballar-hi, es van incloure les cèl·lules en el medi HistoGel™ (HG-4000-12; Thermo Scientific; Waltham, Massachusetts, USA). Per a la inclusió va ser necessari escalfar el es HistoGel™ i tot el material a utilitzar a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  per aconseguir treballar amb el medi en estat líquid. Les cèl·lules es van resuspendre i centrifugar a  $250 \times g$  durant 5 minuts amb el medi HistoGel™. Finalment vam deixar el pèl·let durant 10 minuts a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  per aconseguir la seva solidificació. Es va eliminar el sobrant ja sòlid d'HistoGel™ i es va submergir en PBS per rentar-lo. Finalment el pèl·let de cèl·lules sòlid es va deshidratar i es va incloure en parafina.

Posteriorment es van tallar i muntar seccions de 4 µm de gruix en portaobjectes Starfrost® (Knittel Glass, Braunschweig, Alemanya).

### Experiment d'ISH

Per a la detecció de les molècules d'ARNm de *NT5E*, *ENTPD1*, *ENTPD2*, *ENTPD3*, *ENPP3* i *ADA*, es van utilitzar les següents sondes d'ARN específiques: RNAscope® Probe-Hs-NT5E (437931; ACD), RNAscope® Probe-Hs-ENTPD1 (474181; ACD), RNAscope® Probe-Hs-ENTPD2 (507941; ACD), RNAscope® Probe-Hs-ENTPD3 (529271; ACD), i RNAscope® Probe-Hs-ADA (490141; ACD), i els reactius presents en el kit de detecció RNAscope® 2.5HD Red Detection Kit (322372; ACD) seguint les indicacions del fabricant.

Les seccions es van escalfar a 60 °C durant 1 hora i es van desparafinar. A continuació, es va realitzar el pretractament de les mostres incubant-les 10 minuts amb el reactiu RNAscope® *Hydrogen Peroxide*, per bloquejar l'activitat de les peroxidases, es va realitzar un parell de rentats amb aigua destil·lada, i es van permeabilitzar les cèl·lules escalfant les mostres a 121 °C durant 15 minuts en l'olla a pressió *Antigen Retriever 2100* (Aptum Bio, Kassel, Alemanya) amb el reactiu RNAscope® *Target Retrieval Reagent*. Al finalitzar el cicle d'escalfament es van introduir ràpidament en alcohol absolut durant 3 minuts. Així mateix, es van incubar les seccions amb el reactiu RNAscope® *Protease Plus* durant 15 minuts a 40 °C per la digestió de les proteïnes. Tot seguit, es van rentar les mostres i es van hibridar les sondes amb les mostres a 40 °C durant 2 hores. Un cop les mostres es van netejar amb la solució de rentat es van realitzar un seguit d'incubacions amb els reactius del kit AMP1-6 a 40 °C, excepte els dos últims a TA. Finalment es van incubar les mostres amb els reactius Fast Red-A i -B durant 10 minuts a TA. Aquests reactius permeten visualitzar les molècules d'ARN presents com a punts vermells en les cèl·lules. Es va realitzar la contratinció dels nuclis de les cèl·lules amb hematoxilina diluïda al 50 % (Sigma-Aldrich) durant 2 minuts. Es van muntar les mostres amb el medi de muntatge permanent VectaMount® (H-5000; Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). Es van observar els resultats sota el microscopi òptic Nikon Eclipse E200 (Nikon) i fotografiar en el microscopi Leica DMD 108 (Leica).

Per les hibridacions i incubacions a 40 °C es va utilitzar el forn HybEZ™ II Hybridization System (ACD). Es van afegir als experiments controls positius amb la sonda específica per l'ARNm de la ubiquïtina C (RNAscope® Positive Control Probe-Hs-UBC; 310041; ACD) i controls negatius amb la sonda pel gen bacterià dihidrodipicolinat reductasa (*dapB*) del *Bacillus subtilis* (RNAscope® Negative Control Probe-Hs-DapB; 310043; ACD).

Es va determinar la presència o absència de molècules d'ARN estudiades en els diferents cultius primaris, així com es va utilitzar un sistema de puntuació utilitzant el nombre estimat de punts aïllats (1 punt= 1 molècula d'ARN) presents dins de cada cèl·lula i així obtenir una mesura semi-quantitativa. El criteri de puntuació observat es representa en la **Taula M3**.

**Taula M3.** Criteris de puntuació per l'anàlisi semi-quantitatiu dels resultats de la hibridació *in situ*

Puntuació	Observació microscòpica
-	Sense presència o menys d'un punt per cada 10 cèl·lules
+	1-9 punts per cèl·lula
++	10 punts o més punts per cèl·lula. Molt poques agrupacions de punts
+++	Més de 10 punts per cèl·lula. Una gran quantitat de les cèl·lules positives presenten agrupacions de punts

### 3.3. Estudis funcionals dels cultius primaris d'estroma endometrial

#### 3.3.1. Estudis de citotoxicitat

Per poder definir la citotoxicitat dels nucleòtids (ATP i UTP) i nucleòsids (adenosina) sobre els nostres cultius primaris, així com per establir els paràmetres òptims per treballar amb aquestes cèl·lules sense comprometre la seva viabilitat, es van realitzar experiments de citotoxicitat amb l'ús del reactiu *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (G3581; Promega, Madison, Michigan, USA). Aquest reactiu conté un compost de les sals de tetrazoli [4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazoli (MTS)] de color groc que quan es redueix es converteix en un compost soluble de la família dels formazans de color marró. Aquesta conversió és possible gràcies a l'activitat metabòlica de les cèl·lules viables i el converteix en un mètode colorimètric que permet quantificar-les, ja que la quantitat de compost de tipus formazan mesurada a una absorbància de 490 nm és proporcional al número de cèl·lules vives en el cultiu cel·lular.

Per l'experiment, es van plantar plaques estèrils de 96 pous  $5 \times 10^3$  cèl·lules per pou de cada cultiu cel·lular primari (P4). A les 24 hores, es va canviar el medi per medi de cultiu tractat amb diferents concentracions d'ATP, d'UTP o d'adenosina (0 (control), 100  $\mu$ M, 1 mM i 5 mM). Es van fer diferents experiments amb diferents durades del tractament (24, 48 o 72 hores). Es van fer quadruplicats de cada condició en cada experiment i es va fer cada experiment un total de dues vegades per cada cultiu primari d'estroma endometrial. Per determinar la viabilitat de les cèl·lules es va afegir 20  $\mu$ L del reactiu *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega) en cada pou i es va incubar durant 2 hores a 37 °C amb una atmosfera humida al 5 % de CO<sub>2</sub>. Finalment es va llegir la densitat òptica de cada pou a 490 nm amb el lector de plaques ASYS UVM340 (ASYS; Cambridge, Regne Unit).

Es va realitzar una ràtio logarítmica de les densitats òptiques obtingudes i normalitzades en base al resultat del control de cada experiment. Per l'anàlisi estadístic es va utilitzar el mètode de comparacions múltiples de *Dunnett's* integrat en el test *one-way ANOVA* per crear intervals de confiança per les diferències entre les mitjanes de les diferents condicions i la mitjana del grup

control. Utilitzar aquest mètode ens permet descartar com a diferències significatives entre les mitjanes que es comparen, a aquells intervals que contenen el 0. Valors de probabilitat ( $p$ -valors) menors a 0.05 van ser considerats com a una representació de diferències estadísticament significatives. L'anàlisi estadístic i la representació gràfica dels resultats es va realitzar mitjançant el programa GraphPad v.8.0.2 (GraphPad Software).

### 3.3.2. Estudis de proliferació cel·lular

Per determinar la influència de l'ATP sobre la capacitat proliferativa de les cèl·lules estromals endometrials provinents d'endometris de dones amb endometriosi (ESCsi) i de les cèl·lules de l'estroma endometrial provinents d'endometris cíclics no patològics (ESC-P i ESC-S) es van realitzar estudis de proliferació cel·lular utilitzant el kit *iClick™ EdU Andy Fluor 488 Imaging* (A003; ABP Biosciences, Rockville, Maryland, USA). Aquest assaig es basa en la incorporació del 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU), un anàleg modificat de la timidina conjugat amb un fluoròfor, durant la nova síntesi d'ADN.

Es van plantar  $3 \times 10^4$  cèl·lules en plaques de 24 pous sobre cobreobjectes rodons de 12 mm de diàmetre (VWR) tractats amb poli-L-lisina al 0.05 % (Sigma-Aldrich). A les 24 hores, es va canviar el medi de cultiu per medi fresc tractat amb diferents concentracions d'ATP (0 (control), 100  $\mu$ M o 1 mM). El tractament va durar 24 hores. Posteriorment es va iniciar l'assaig de proliferació seguint les instruccions del fabricant.

Breument, es van incubar les cèl·lules amb una solució amb EdU durant 2 hores a 37 °C amb una atmosfera humida al 5 % de CO<sub>2</sub>. Seguidament es van fixar les cèl·lules amb PFA al 3,7 % durant 15 minuts a TA i en agitació. Es van realitzar un parell de rentats amb albúmina sèrica bovina (BSA; de l'anglès *bovine serum albumin*) al 3 % en PBS. Per permeabilitzar les cèl·lules es van incubar durant 20 minuts a TA amb una solució de Tritò-X-100 al 0.5 % en PBS. Es van realitzar un parell de rentats de nou. Les cèl·lules es van incubar, protegides de la llum, amb la solució *iClick reaction Cocktail* durant 30 minuts a TA. Es van realitzar de nou dos rentats. Pel marcatge de tots els nuclis, es van incubar els cobreobjectes amb una solució 1:1000 de Hoechst 30342 (reactiu inclòs en el kit) en PBS durant 15 minuts a TA. Es van realitzar dos rentats amb PBS i es va muntar amb medi de muntatge aquós (*Fluoromount*; Sigma-Aldrich). Es van realitzar tots els experiments dues vegades.

Es van observar i fotografiar els nuclis amb el microscopi Nikon Eclipse E800 (Nikon). Es van obtenir imatges utilitzant l'objectiu 20x de 6 camps representatius d'un mateix cobreobjectes. Es va generar una *Macro* amb el programa Fiji/ ImageJ (Wayne Rasband) pel recompte automàtic del número de nuclis totals (nuclis tenyits amb Hoeschst- fluorescència blava). Manualment es va fer el recompte dels nuclis de les cèl·lules proliferants (tenyits amb Andy Fluor 488 azide-fluorescència verda) i es va calcular el percentatge de cèl·lules en proliferació. Per l'estudi estadístic es va realitzar un test *one-way ANOVA* per comparar els percentatges de les diferents condicions amb el propi control i també es va comparar la proliferació basal dels diferents cultius primaris.  $p$ -valors menors a 0.05 van ser considerats com a una representació de diferències



estadísticament significatives. Per l'anàlisi estadístic i la representació gràfica dels resultats es va treballar amb el programa GraphPad Prism v.8.0.2 (GraphPad Software).

### 3.3.3. Assajos de migració cel·lular

Per l'estudi de la influència de l'ATP sobre la migració cel·lular en les cèl·lules estromals endometrials, es van realitzar dos tipus diferents d'assajos: els de tancament de la ferida (*wound healing assay*) i els de tipus cambra de Boyden.

Els assajos de tancament de la ferida es van realitzar amb la finalitat de comprovar la capacitat migrativa de les cèl·lules i per definir les condicions experimentals pels assajos tipus cambra de Boyden, una tècnica més ràpida i acurada, però amb un cost econòmic més elevat.

#### Assajos de tancament de la ferida (*wound healing assay*)

Els experiments de tancament de la ferida consisteixen en determinar el temps que triguen unes cèl·lules en cobrir tota una àrea concreta (tancament de la bretxa).

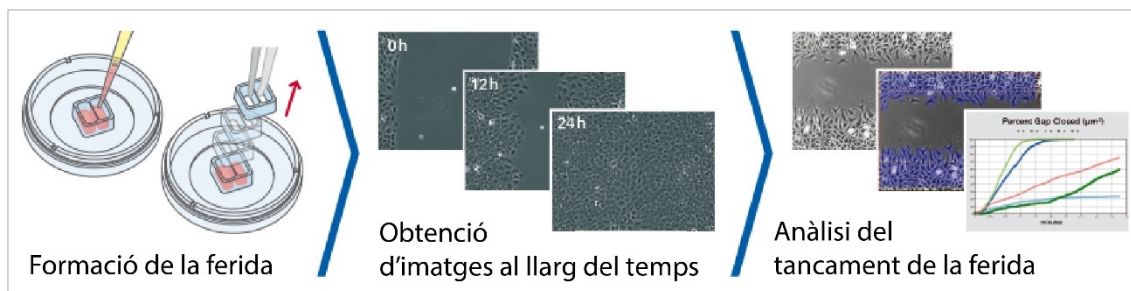
Per aquests experiments es van utilitzar les cèl·lules d'un cultiu primari de cèl·lules estromals endometrials (P2) provinents d'un endometri secretor (ESC-S). Es van plantar  $1.5 \times 10^4$  cèl·lules a cada càmera separades per una peça central de silicona adherida al vidre (*Culture-Insert 2 well in  $\mu$ -Dish<sup>35mm,low</sup>*; 80206; Ibidi, Gräfelfing, Alemanya). Es van deixar créixer les cèl·lules durant 24 hores per crear una monocapa confluent. A continuació, es va canviar el medi de cultiu per medi de cultiu fresc (DMEM-F12 + 1 % penicil·lina/estreptomicina + 10 % de FBS) o per medi de cultiu fresc amb baixa concentració de sèrum (DMEM-F12 + 1 % penicil·lina/estreptomicina + 0.5 % de FBS) i es va deixar incubar 2 hores a 37 °C amb una atmosfera humida al 5 % de CO<sub>2</sub>.

Idealment, pels assajos de migració cal eliminar l'FBS del medi de cultiu per evitar que la proliferació de les cèl·lules emmascarin la migració si aquesta és baixa. En el nostre cas, al ser cultius primaris, vam determinar que ometre l'adició del sèrum en el medi no era una condició viable per les cèl·lules i vam decidir reduir-ne, de manera important, la seva quantitat del medi.

Seguidament, es va eliminar la peça de silicona adherida a la placa per crear la bretxa/ferida en la monocapa de cèl·lules i es va realitzar la fotografia a temps 0 hores (T0). Immediatament es va canviar el medi per un medi tractat amb diferents concentracions d'ATP (0 (control), 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M i 1 mM) i la concentració pertinent d'FBS. Es va realitzar tot l'experiment dues vegades.

Es va fotografiar la bretxa en el microscopi Leica DIRMB (Leica) en diferents punts en el temps des de l'inici del tractament amb l'ATP (T0, T5, T10, T15, T24, T29, T34, T48 i T53) per monitoritzar el procés de migració de les cèl·lules. Es va analitzar manualment el percentatge de l'àrea tancada al llarg del temps mitjançant el programa Fiji/ImageJ (Wayne Rasband). Es va representar gràficament el tancament de la ferida al llarg del temps en cada condició per determinar la linealitat del procés de migració. Es va calcular la línia de tendència i definir la seva equació. Les equacions obtingudes es van emprar per determinar el temps que van trigar les

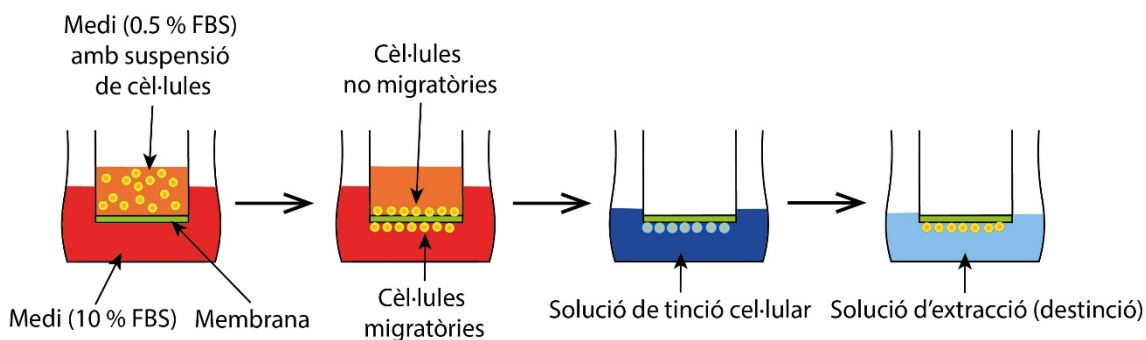
cèl·lules per assolir el 50 % de tancament de la ferida. En la **figura M2** es troba representat de manera esquemàtica l'assaig.



**Figura M2.** Representació de l'assaig de tancament de ferida (*wound healing assay*). Imatge adaptada obtinguda de la pàgina web comercial d'Ibidi (<https://rb.gy/r71zfp>; consultada el 3 de febrer de 2021).

### Assajos de migració per la tècnica modificada de la cambra de Boyden

Els experiments de migració de tipus cambra de Boyden o *Transwell* consisteixen en dues cambres separades per una membrana amb porus que serveixen per discriminar les cèl·lules migratòries de les no migratòries. En la **figura M3** es pot observar de manera esquematitzada en què consisteix l'assaig. Les cèl·lules es troben en la cambra superior. Les cèl·lules amb capacitat migratòria pateixen una reorganització del citoesquelet d'actina i creuen la membrana a través del porus fins adherir-se a la superfície de la membrana en la cambra inferior. Les cèl·lules que han migrat es tenyiran i quantificaran per conèixer el percentatge de migració. Per aquest experiment, es va utilitzar el kit *CytoSelect™ Cell Migration Assay* (CBA-100; Cell Biolabs, San Diego, California, USA). Es van seguir les instruccions del fabricant per realitzar els assajos.



**Figura M3.** Representació esquemàtica de l'assaig de migració amb cambres de Boyden. Els experiments es van repetir afegint un tractament d'ATP 300  $\mu\text{M}$  en i) la cambra superior amb la suspensió cel·lular, ii) la cambra inferior amb el medi amb 10% de FBS, iii) en les dues cambres, o iv) sense tractament (control). Es va llegir la densitat òptica de la solució d'extracció amb les restes de colorant a 560 nm. Imatge d'elaboració pròpia.

Sota condicions estèrils, es va afegir medi de cultiu (DMEM-F12 + 1 % penicil·lina/estreptomicina + 10 % de FBS) en la cambra inferior. En la cambra superior, es va plantar una suspensió cel·lular de  $3 \times 10^5$  cèl·lules (P4) en medi de cultiu amb baixa concentració de sèrum (DMEM-F12 + 1 % penicil·lina/estreptomicina + 0.5 % de FBS). Nosaltres vam testar diferents condicions en el tractament amb 300  $\mu\text{M}$  d'ATP: (i) afegir el tractament a la suspensió cel·lular (cambra superior), (ii) afegir l'ATP al medi de cultiu (cambra inferior), i (iii) afegir l'ATP a ambdues (cambra superior

i inferior). També es van incloure per cada línia cel·lular casos sense tractament d'ATP (control). Les cèl·lules es van incubar durant 24 hores a 37 °C a una atmosfera humida al 5 % de CO<sub>2</sub>. Es va eliminar el medi de la cambra superior i es va netejar amb hisops amb la punta de cotó per eliminar les cèl·lules que no han migrat. Es van tenyir i fixar les cèl·lules unides a la superfície de la membrana en la cambra inferior (cèl·lules que han migrat) amb la solució de tinció cel·lular del kit durant 10 minuts. Es van rentar per extreure l'excés de tinció i es van deixar assecar les membranes. A continuació, es va col·locar l'estructura amb la membrana sobre un portaobjectes per poder obtenir imatges amb el microscopi Leica DMD 108 (Leica) per veure la migració cel·lular qualitativament. Per la quantificació, es van destenyir les cèl·lules durant 10 minuts amb la solució d'extracció del kit amb una forta agitació orbital. Es van transferir 100 µL de la solució d'extracció amb les restes de colorant a una placa de 96 pous per mesurar la seva densitat òptica a 560 nm en el lector de plaques (ASYS). Es van calcular i representar els percentatges de migració en cada cas relativitzant-los amb els resultats dels propis controls.

## **4. RESULTATS**

### **4.1. Els cultius primaris d'estroma endometrial**

El principal objectiu d'aquest capítol ha sigut establir un mètode d'obtenció i manteniment de cèl·lules estromals d'endometri humà.

En l'estudi es van incloure un total de 5 mostres en fresc d'endometris cíclics no patològics, dels quals es van poder obtenir cultius primaris de tots casos, mostrant que el mètode d'obtenció de cultius primaris d'estroma endometrial provinents d'endometris cíclics presenta una eficàcia del cent per cent. En canvi, l'eficàcia de la tècnica disminueix a un 57.14 % quan les mostres provenen d'endometris atrofics, dels quals de 7 casos, es van poder establir cultius primaris de només 4 pacients. Els cultius que no vam poder obtenir provenien de mostres de pacients amb una mitjana d'edat més elevada que la de les pacients amb endometris atrofics dels quals sí vam obtenir amb èxit l'establiment del cultiu primari ( $62.33 \pm 10.0$  anys i  $47.5 \pm 3.8$  anys, respectivament). Aquesta disminució de l'eficàcia de la tècnica en aquests casos reflecteix una limitació en l'ús de mostres provinents de dones en una fase postmenopàusica avançada per a l'obtenció de cultius primaris d'estroma endometrial.

De les 3 pacients amb endometriosis incloses en l'estudi, una es trobava en la fase proliferativa del cicle menstrual i dues es trobaven en fase secretora en el moment de la histerectomia. Dels 3 casos, de tots ells es van poder establir cultius primaris, però el cultiu primari provinent d'un endometri en fase proliferativa es va haver d'eliminar per contaminació fúngica en el P3, obligant-ne la seva exclusió de l'estudi.

Per una altra banda, es va comprovar amb èxit que el mateix protocol definit en la present tesi era útil per l'obtenció de cultius primaris d'estroma endometrial amb altres patologies,

concretament es va obtenir un cultiu primari d'estroma endometrial tumoral d'una pacient amb càncer d'endometri. Es va incloure en els experiments d'activitat nucleotidasa *in situ*, de supervivència cel·lular i de migració per tancament de ferida (resultats no inclosos).

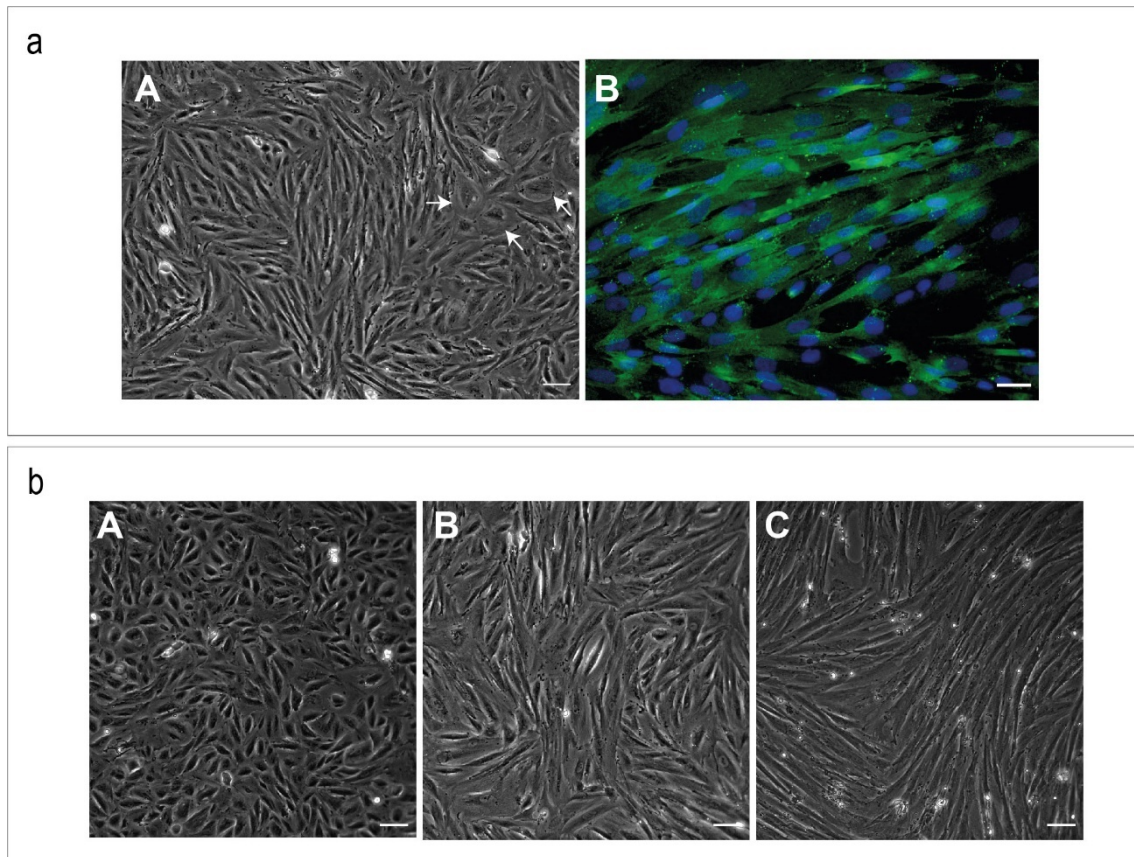
Es van poder congelar i descongelar vials per poder realitzar els diferents experiments sense alteracions en la viabilitat de les cèl·lules.

## 4.2. Canvis morfològics en els cultius primaris d'estroma endometrial

Un cop establert el protocol d'obtenció, es va voler estudiar les característiques morfològiques dels cultius primaris, els seus canvis al llarg del temps i definir-ne el passe cel·lular (P) per treballar-hi.

En l'inici del cultiu primari es van observar diferents poblacions de cèl·lules de diferent mida i morfologia. Principalment es van poder distingir 3 poblacions diferents pels trets morfològics: 1) cèl·lules de morfologia esfèrica, molt petites i en suspensió (cèl·lules de tipus sanguínies, principalment hematies); 2) cèl·lules de morfologia esfèrica, de mida gran amb un nucli circular en posició central (cèl·lules de tipus epitelial); i 3) cèl·lules petites de morfologia fusiforme o estrellada (fibroblasts de l'estroma endometrial). No es van observar diferències morfològiques entre els cultius primaris obtinguts d'endometris no patològics i els endometris provinents de les pacients amb endometriosis o càncer.

Amb els primers canvis de medi del cultiu, es van eliminar les cèl·lules sanguínies presents en el cultiu primari. No va ser fins el P4 que no vam obtenir un cultiu estromal pur sense la presència de cèl·lules epitelials. Tot i això, cal destacar que la població de cèl·lules predominant des de l'inici va ser la de tipus fibroblast. Es va confirmar la identitat de les cèl·lules del cultiu primari en P4 amb assajos d'immunofluorescència per a la immunodetecció del marcador d'estroma endometrial CD10. En la **Figura R1aA** es recull una micrografia de les cèl·lules endometrials obtingudes, prèvia al primer passe. En la **Figura R1aB** es pot observar la immunodetecció de CD10 en un cultiu estromal pur (P4). En la **Figura R1b** es pot observar com varia un mateix cultiu primari d'estroma endometrial al llarg dels diferents passes de cèl·lules. El canvi més notori va ser en la morfologia de les cèl·lules estromals, inicialment de mida reduïda i amb una morfologia fusiforme poc marcada, però que a mesura que s'incrementaven els passes, aquesta morfologia fusiforme es va anar fent més evident i les cèl·lules creixien en una monocapa més plana. A més, a passes superiors es va incrementar el temps necessari per assolir el 80-90 % de la confluència, passant de dos dies en els passes inicials fins a gairebé dues setmanes en el P12 (passe de cèl·lules a concentracions de 1/3).



**Figura R1.** (a) Micrografia d'un cultiu primari de cèl·lules estromals endometrials (A) i immunodetecció de CD10 (B). En la imatge A podem observar que les cèl·lules (P0) obtingudes mitjançant el nostre protocol van ser majoritàriament de morfologia fusiforme (tipus fibroblast) però també vam trobar-ne adherides, en menor quantitat, una població de cèl·lules de mida superior i de morfologia esfèrica, de tipus epitelial (fletxes). En canvi, ja en el P4, mitjançant assajos d'immunodetecció del marcador estromal CD10 vam observar que totes les cèl·lules expressaven el marcador i per tant que era un cultiu pur de cèl·lules estromals. La mida de les barres és de 150 (A) i 60  $\mu\text{m}$  (B). (b) Micrografies d'un cultiu primari de cèl·lules estromals endometrials en el P1 (A), P4 (B) i P12 (C). Com es pot observar en aquestes imatges, la morfologia fusiforme es fa més evident a major nombre de passes de cèl·lula i també s'incrementa la seva longitud màxima. La mida de les barres és de 150  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. Les ectonucleotidases en els cultius primaris d'estroma endometrial

Un cop establerts els cultius primaris i determinat el número de passe per realitzar els experiments, es va estudiar l'expressió de les ectonucleotidases i l'activitat nucleotidasa en els diferents cultius primaris d'estroma endometrial mitjançant experiments d'immunofluorescència, hibridació *in situ* i d'assaigs d'activitat enzimàtica *in situ*.

#### 4.3.1. L'expressió proteica i gènica de *NT5E*, *ENTPD1*, *ENTPD2* i l'*ENPP3*

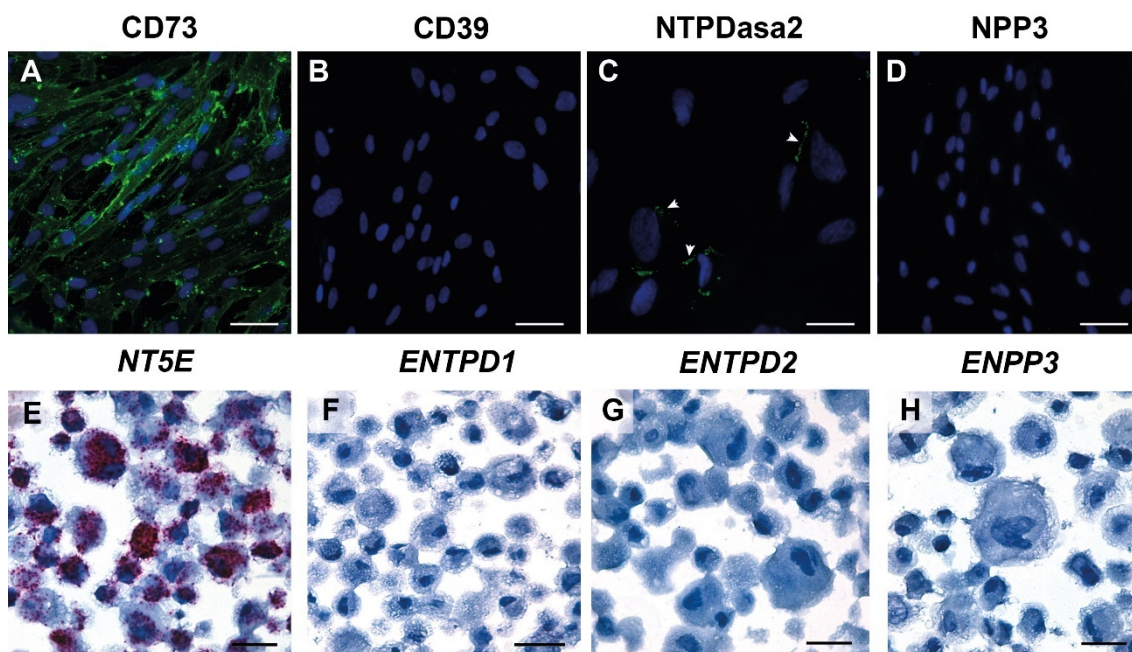
Els estudis realitzats en el teixit endometrial de dones sense patologia endometrial van determinar l'expressió proteica de les ectonucleotidases CD73, CD39 i l'*NTPDase2* en l'estroma. En canvi, en l'endometri eutòpic de dones amb endometriosis, l'expressió de CD73 i l'*NTPDase2* es mantenia, però es va detectar la pèrdua de CD39 i l'expressió *de novo* de l'*NPP3* en l'estroma



(veure **capítol 4**) [196,247,252]. Basats en aquests resultats, els estudis d'expressió de les ectonucleotidases en l'estroma es van centrar en CD73, CD39, l'NTPDasa2 i l'NPP3.

En els assajos d'immunofluorescència amb anticossos per les proteïnes CD73, CD39, l'NTPDasa2 i l'NPP3, no es van observar diferències entre els diferents cultius estromals (resultats no mostrats). De totes elles, en els cultius primaris d'estroma endometrial, només es va detectar l'expressió de la proteïna CD73. De manera excepcional, es va detectar el marcatge discret de la proteïna NTPDasa2 en alguna zona puntual de la membrana d'un nombre molt reduït de cèl·lules en els cultius primaris d'estroma endometrial provinents d'endometris en estat atròfic (**Figura R2**). Per una altra banda, l'estudi per immunohistoquímica d'aquestes proteïnes en les mostres de teixit endometrial de les mateixes pacients, sí van presentar marcatge de CD39 en l'estroma dels endometris de pacients sense patologia endometrial, l'NPP3 en l'estroma dels endometris de pacients amb endometriosi, i l'NTPDasa2 únicament en les cèl·lules de l'estroma basal i en la població perivascular (descrita en el **capítol 3** com eMSCs) dels endometris de totes les pacients (amb i sense endometriosi) (resultats inclosos en el **capítol 4**).

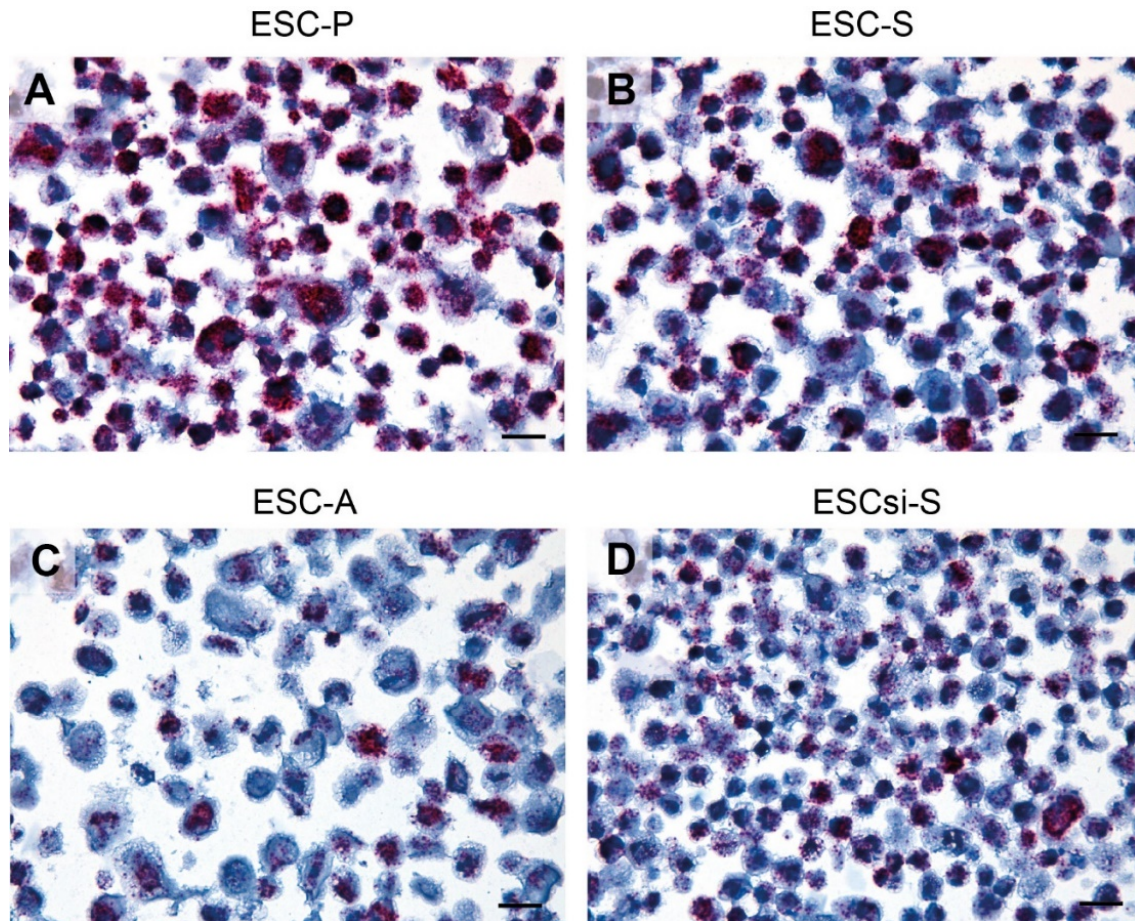
Els resultats obtinguts per immunofluorescència en els cultius primaris de cèl·lules estromals es van confirmar amb la detecció de molècules d'ARN per *NT5E* i amb l'absència d'expressió gènica de *ENTPD1* i *ENPP3* mitjançant els experiments d'hibridació *in situ* (**Figura R2**). No es van observar molècules d'ARN per l'*ENTPD2* en les cèl·lules (**Figura R2**). Al realitzar l'anàlisi semi-quantitatiu, es va detectar una major expressió gènica de *NT5E* en les cèl·lules estromals provinents d'endometris cíclics no patològics (proliferatius o secretors) que en els cultius primaris d'estroma d'origen en endometris atròfics o de pacients amb endometriosi (**Figura R3**).



**Figura R2.** Immunodetecció de les proteïnes CD73 (A), CD39 (B), NTPDasa2 (C) i NPP3 (D) i hidridació *in situ* de molècules d'ARN de l'*NT5E* (E), *ENTPD1* (F), *ENTPD2* (G) i *ENPP3* (H) en les cèl·lules d'estroma endometrial. Van detectar l'expressió proteica de CD73 (A) i del seu gen, l'*NT5E* (E), en tots els cultius primaris. En les ESC-A es van detectar un nombre molt reduït de cèl·lules amb expressió proteica d'NTPDasa2 en la membrana (caps de fletxa; C). No



es va detectar expressió proteica ni gènica de l'*ENTPD1* (B,F) i de l'*ENPP3* (D,H) en cap cultiu primari. La mida de les barres és de 100 (A,B,D), 50 (C) i 25  $\mu$ m (E-H).



**Figura R3.** Hibridació *in situ* de les molècules d'ARN de *NT5E* per la tècnica RNAscope® en les ESC-P (A), ESC-S (B), ESC-A (C) i ESCsi-S (D). Es va detectar una alta senyal de l'expressió gènica de *NT5E* en les ESC-P i ESC-S i una senyal destacable, tot i que menor, en les ESC-A i ESCsi-S. La mida de les barres és de 25  $\mu$ m.

Adicionalment, es va estudiar l'expressió gènica de l'*ENTPD3* i de l'ectoenzim *ADA*. Com esperàvem, no vam detectar cap molècula d'ARN codificant per l'*ENTPD3* en cap cultiu primari d'estroma endometrial. Tot i detectar un increment significatiu de l'*ADA* en el fluid contingut en endometriomes ovàrics (veure **capítol 1**), no es va detectar expressió gènica de l'*ADA* en les ESCsi-S ni tampoc en la resta d'ESCs (resultats no mostrats).

En la **Taula R1** es recullen tots els resultats d'expressió proteica i gènica de les ectonucleotidases estudiades en els diferents tipus de cèl·lules estromals endometrials provinents d'endometris no patològics (ESC) i amb endometriosis (ESCsi).

**Taula R1.** Expressió proteica i gènica de les ectonucleotidases mitjançant experiments d'immunofluorescència i d'hidridació *in situ* en les ESCs

Cultiu primari	Proteïna*				Expressió gènica**					
	CD73	CD39	NTPDasa2	NPP3	NT5E	ENTPD1	ENTPD2	ENTPD3	ENPP3	ADA
ESC-P	+	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
ESC-S	+	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
ESC-A	+	-	+ <sup>1</sup>	-	++	-	-	-	-	-
ESCSI-S	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-

\* Presència (+) o absència (-) de proteïna

\*\* Anàlisi semi-quantitatiu: - (absència); ++ (10 molècules o més per cèl·lula amb poques agrupacions de la senyal); +++ (10 molècules o més per cèl·lula amb gran nombre d'agrupacions de la senyal)

<sup>1</sup> Presència en un baix nombre de cèl·lules

#### 4.3.2. Activitat ectonucleotidasa *in situ* en les cèl·lules endometrials estromals

En els estudis d'activitat enzimàtica *in situ* es van estudiar les activitats AMPasa, ADPasa i ATPasa en les cèl·lules d'estroma endometrial fixades.

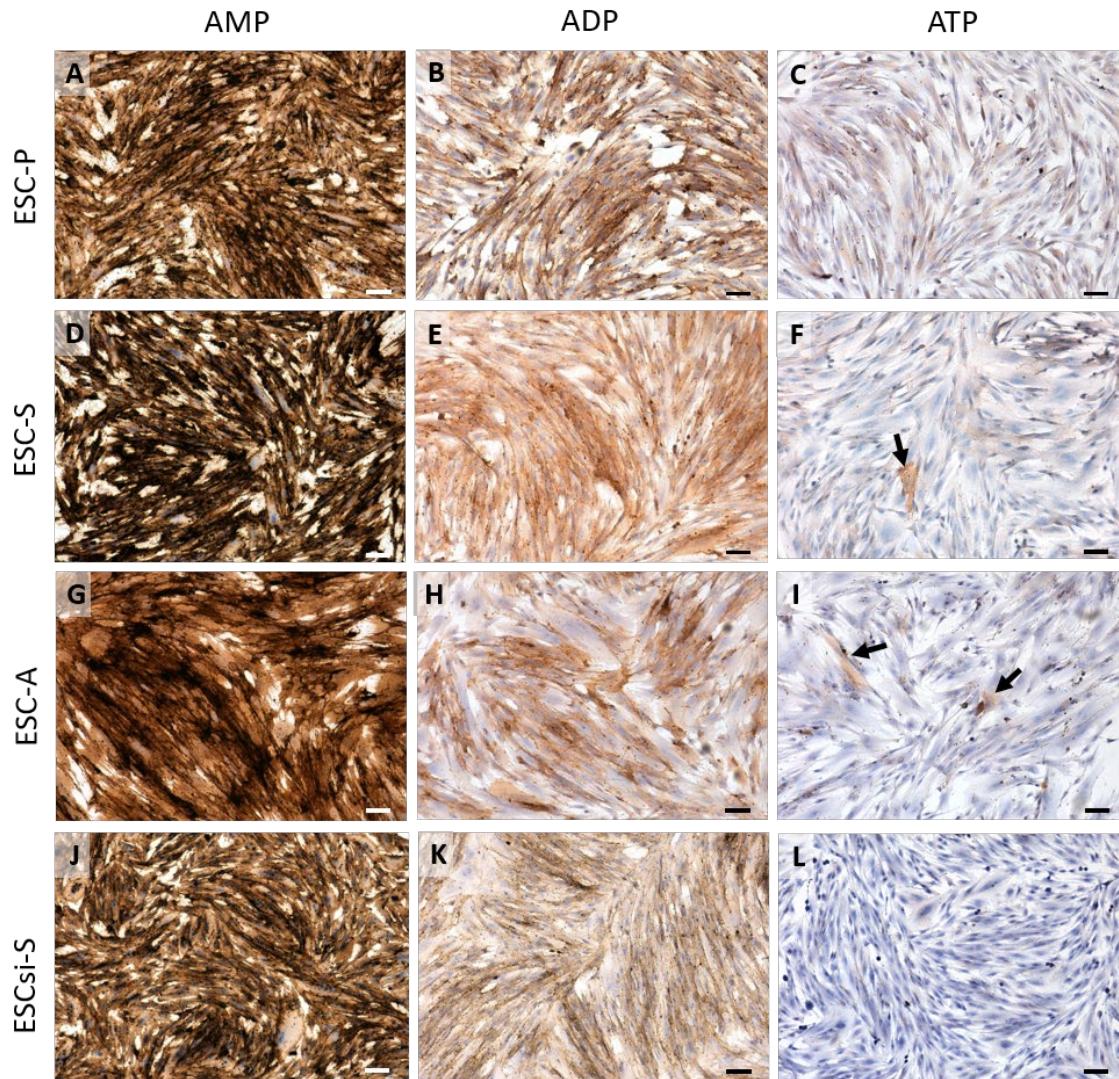
Es va detectar una alta activitat AMPasa i una moderada activitat ADPasa en tots els cultius primaris (**Figura R4**). En canvi, els resultats obtinguts per l'activitat ATPasa van ser més heterogenis. Dels tres cultius de cèl·lules d'estroma endometrial provinents d'endometris no patològics proliferatius (ESC-P), en dos es va detectar activitat ATPasa en les cèl·lules (**Figura R4C**) i en el tercer no es va observar aquesta activitat (resultats no mostrats). En canvi, en els dos cultius d'ESC-S es va detectar una marca dèbil generalitzada però en algunes cèl·lules amb una marca d'activitat ATPasa més notable (**Figura R4F**). En les cèl·lules d'estroma endometrial provinents d'endometris no patològics atròfics (ESC-A), es va observar una situació similar a les ESC-S, marca dèbil en les cèl·lules excepte algunes amb una major activitat (**Figura R4I**). En les ESCsi pràcticament cap cèl·lula va presentar activitat ATPasa (**Figura R4L**).

#### 4.4. Viabilitat cel·lular envers tractaments amb ATP, UTP i adenosina

Es van realitzar assajos de citotoxicitat cel·lular per determinar les concentracions de treball i la durada òptima de tractament amb nucleòtids (ATP, UTP) i nucleòsids (adenosina) per l'estudi del paper d'aquestes molècules en les nostres cèl·lules sense comprometre'n la seva viabilitat.

En la **Figura R5** es mostren les relacions de supervivència cel·lular de les ESC-P, ESC-S, ESC-A i ESCsi-S sota la influència de diferents concentracions de nucleòtids o nucleòsids (0, 100, 1000 o 5000 µM) i a diferents durades de tractament (24, 48 i 72 hores).





**Figura R4.** Experiments d'activitat AMPasa (A,D,G,J), ADPasa (B,E,H,K) i ATPasa (C,F,I,L) *in situ* en els cultius primaris d'estroma endometrial de dones sense (A-I) i amb endometriosis (J-L). Les ESCs, independentment de la fase menstrual en el moment de l'obtenció del cultiu, presenten activitat AMPasa (A,D,G) i ADPasa (B,E,H). La mateixa activitat es pot observar en les ESCsis (J, K). Les ESC-P presenten activitat ATPasa de manera generalitzada (C), en canvi, les ESC-S i ESC-A presenten aquesta activitat de manera més elevada en un nombre aïllat de cèl·lules (fletxes; F,I). En les ESCsi pràcticament no s'observa activitat ATPasa en lloc (L). La mida de les barres és de 100  $\mu$ M.

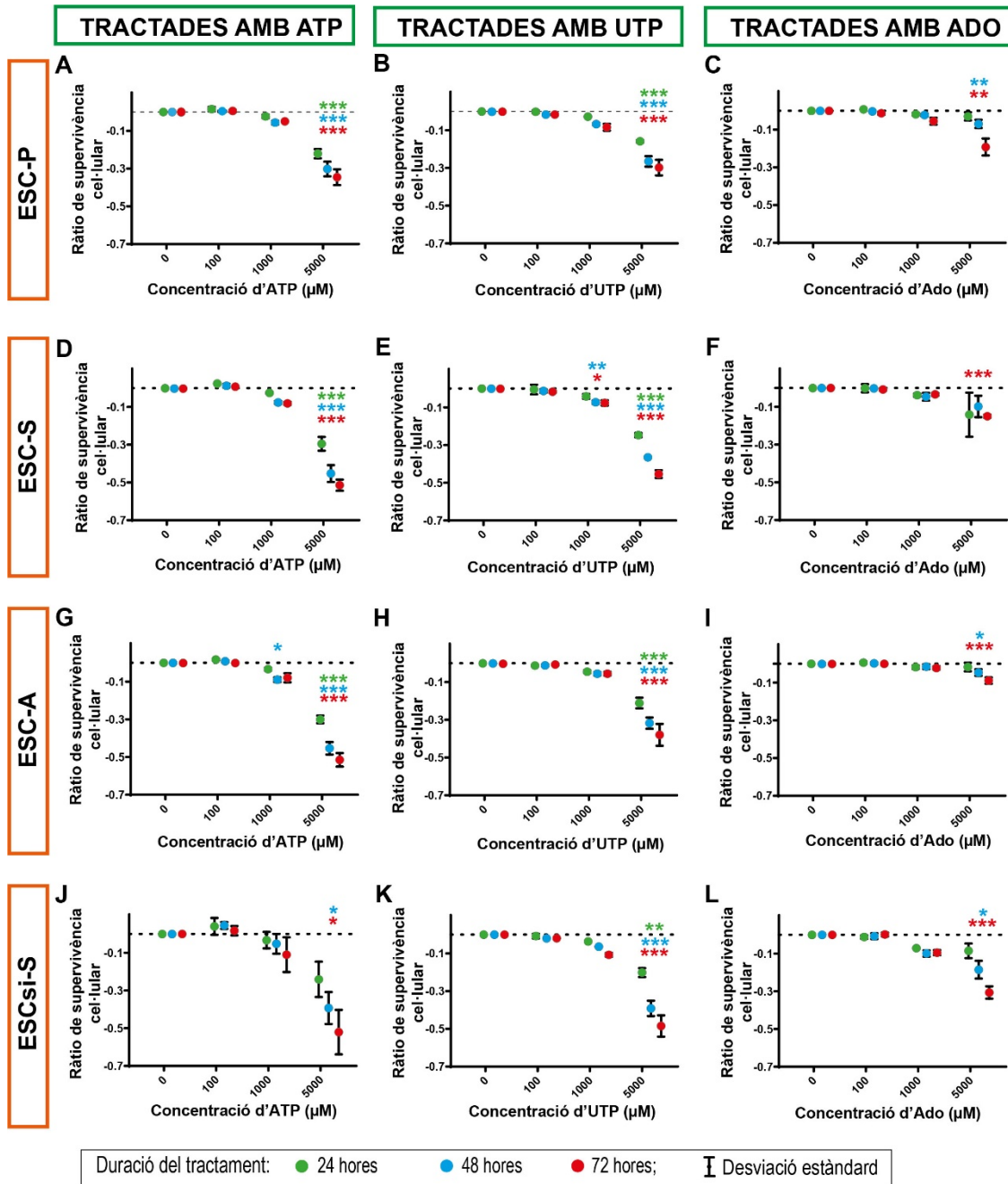
Les cèl·lules d'estroma endometrial provinents d'endometris no patològics cíclics (ESC-P i ESC-S) i atròfics (ESC-A) van presentar un comportament similar al ser tractades amb nucleòtids (ATP o UTP) a concentracions de 100  $\mu$ M i 1 mM en els diferents temps de tractament (**Figura R5, gràfiques A,B,D,E,G,H**). Cal destacar, que quan es van tractar amb una concentració d'ATP a 100  $\mu$ M durant 24 hores es va observar un petit augment, no significatiu [*p*-valor = 0.7951 (ESC-P), 0.7045 (ESC-S) i 0.5725 (ESC-A)], del valor de supervivència cel·lular en relació al seu propi control. Aquest resultat es podria relacionar amb una petita tendència de les cèl·lules de proliferar sota aquestes condicions. En canvi, aquesta mateixa concentració d'ATP però amb incubacions majors (48 i 72 hores) no es van observar diferències respecte al propi control.

A concentracions de nucleòtid (ATP i UTP) de 1 mM es va començar a observar una disminució de les ràtios de supervivència respecte al control. En les ESC-S tractades amb UTP 1 mM durant 48 i 72 hores la disminució de la ràtio de supervivència va ser estadísticament significativa ( $p$ -valor = 0.0038 i 0.0334, respectivament) (**Figura R5, gràfica E**). Les ESC-A van mostrar diferències significatives al ser tractades durant 48 hores amb ATP 1 mM ( $p$ -valor = 0.0117; **Figura R5, gràfica G**).

A altes concentracions de nucleòtid (5 mM) es va detectar una disminució estadísticament significativa ( $p$ -valor < 0.0001) de la supervivència cel·lular correlacionada amb la durada del tractament en tots aquests cultius primaris, a més durada, més mort cel·lular. De fet, sota aquesta alta concentració d'ATP o UTP durant 48 i 72 hores, els valors de supervivència cel·lular es van reduir entorn a la meitat en els cultius d'ESC-S i ESC-A. En canvi, en les ESC-P, tot i presentar una disminució significativa, es va observar una menor mort cel·lular que la detectada en les ESC-S i les ESC-A, indicatiu d'una major resistència per part de les ESC-P a aquests tractaments.

Amb els tractaments de 100  $\mu$ M i 1 mM d'adenosina en els diferents temps d'estudi, no es van detectar diferències significatives en la supervivència cel·lular dels cultius primaris respecte al propi control (**Figura R5, gràfiques C,F i I**).

Amb una alta concentració d'adenosina (5 mM) es va detectar una disminució significativa de la supervivència en ESC-P tractades durant 48 i 72 hores ( $p$ -valor = 0.0074 i 0.0017, respectivament). A les 48 hores la ràtio de la supervivència de les cèl·lules va disminuir  $0.07 \pm 0.03$  (**Figura R5, gràfica C**), en canvi, aquestes cèl·lules tractades amb les mateixes condicions però amb ATP o UTP van mostrar una disminució del ràtio de supervivència de  $0.30 \pm 0.08$  i  $0.25 \pm 0.04$ , respectivament (**Figura R5, gràfiques A i B**). En les ESC-S es van detectar valors dispars, amb una elevada desviació estàndard en els resultats de supervivència cel·lular en la incubació durant 24 hores (**Figura R5, gràfica F**). Es van detectar diferències significatives respecte el control a les 72 hores de tractament ( $p$ -valor = 0.0002), amb una disminució de la ràtio de supervivència de  $0.14 \pm 0.01$ . Per una altra banda, les ESC-A van mostrar una disminució significativa de la supervivència al ser tractades durant 48 ( $p$ -valor = 0.0343) i 72 hores ( $p$ -valor < 0.0001). Cal destacar que la disminució de la ràtio de supervivència cel·lular en ESC-S i ESC-A tractades durant 48 i 72 hores amb una alta concentració d'adenosina va ser inferior al 0.1, molt allunyada de la disminució detectada en aquests temps d'incubació amb altes concentracions d'ATP i d'UTP, on la disminució va ser pròxima al 0.5. Aquests resultats mostren una major sensibilitat dels cultius primaris (ESC-P, ESC-S i ESC-A) a una alta concentració d'ATP o UTP envers a l'altra concentració d'adenosina.

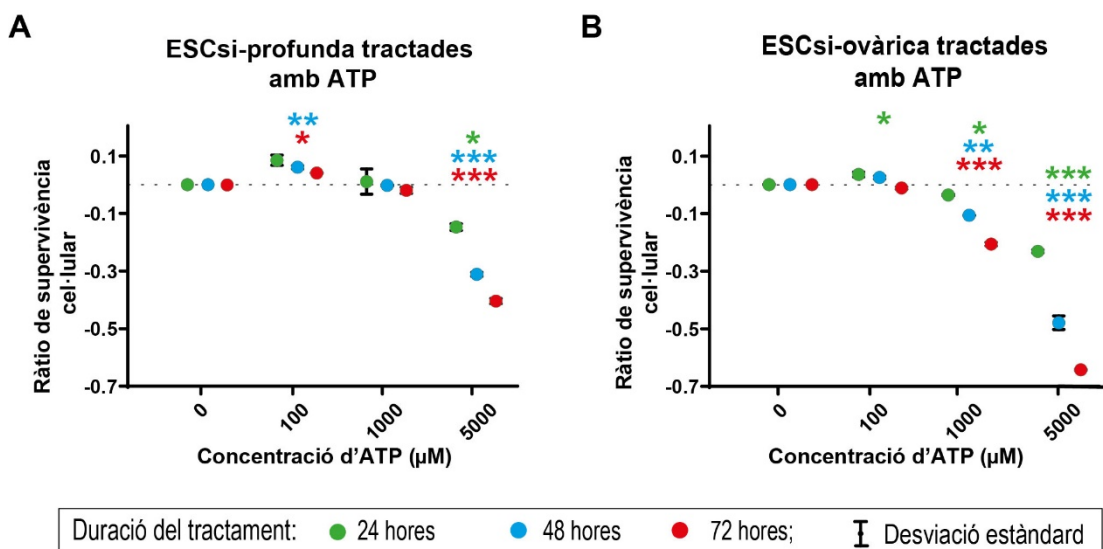


**Figura R5.** Supervivència cel·lular de les ESC-P, ESC-S, ESC-A i ESCsi-S envers a tractaments amb diferents concentracions d'ATP, UTP o adenosina (0, 100, 1000 i 5000 µM) durant 24, 48 i 72 h. \* *p*-valor < 0.05, \*\* *p*-valor < 0.01 i \*\*\* *p*-valor < 0.001 envers al propi control.

En les cèl·lules estromals provinents d'endometris eutòpics de dones amb endometriosis es van observar grans variacions entre els dos cultius en relació a la supervivència cel·lular sota el tractament amb ATP (**Figura R5, gràfica J**). Basant-nos en els nostres resultats [247] (veure **capítol 4**), on es suggeria diferències en els nivells d'ATP entre els tres subtipus diferents d'endometriosis, i tenint en compte que les dos pacients amb endometriosis participants en aquest estudi presentaven formes diferents de presentació de la malaltia (endometriosis ovàrica envers



endometriosi ovàrica i profunda) hem decidit representar i comentar els resultats d'aquests dos cultius primaris tractats amb ATP de manera individual (**Figura R6**).



**Figura R6.** Supervivència cel·lular de les cèl·lules estromals provinents d'un endometri d'una pacient amb endometriosi profunda i ovàrica (ESCSI-profunda; A) i d'una pacient amb endometriosi únicament ovàrica (ESCSI-ovàrica; B) tractades amb ATP (0, 100, 1000 i 5000 µM) durant 24, 48 i 72 h. \*  $p$ -valor < 0.05, \*\*  $p$ -valor < 0.01 i \*\*\*  $p$ -valor < 0.001 envers al propi control.

Les ESCSi-S provinents d'una pacient amb endometriosi profunda i amb coexistència de lesions ovàriques (ESCSI-profunda) van presentar un increment del ràtio de supervivència cel·lular al tractar-les amb ATP 100 µM en els tres intervals de temps. Amb el tractament d'ATP durant 24 hores, es va detectar un increment de la ràtio de supervivència de  $0.08 \pm 0.02$  respecte al seu control. Aquest increment però, no va ser estadísticament significatiu. Aquest fet ho atribuïm a la desviació estàndard obtinguda. A les 48 hores de tractament, es va observar un increment significatiu de  $0.07 \pm 0.01$  ( $p$ -valor = 0.001). Finalment, a les 72 hores d'incubació amb ATP, es va detectar una ràtio de 0.04, un valor significativament superior al propi control ( $p$ -valor = 0.03). En les ESCSi-S provinents d'una pacient amb endometriosi ovàrica (ESCSI-ovàrica) es van determinar també valors superiors de la ràtio amb el tractament d'ATP 100 µM durant 24 i 48 hores, però només van ser diferències significatives els resultats obtinguts en les 24 hores d'incubació ( $p$ -valor = 0.021). Aquests resultats mostren la necessitat d'estudiar la influència de l'ATP en la proliferació de les ESCSi a través d'assajos específics.

Diferències en la viabilitat de les cèl·lules entre les ESCSi-profunda i ESCSi-ovàrica es van detectar al tractar-les amb ATP a 1 mM. A aquesta concentració, les ESCSi-profunda no van mostrar gairebé cap diferència en la supervivència en relació al seu control, en canvi, una disminució significativa de la viabilitat de les ESCSi-ovàrica es va detectar en les tres durades de tractament (24, 48 i 72 hores) fent-se més pronunciada a durades superiors.

Les ESCSi tractades amb una concentració molt elevada d'ATP (5 mM) van presentar un increment significatiu de la mort cel·lular respecte al seu control. En les ESCSi-ovàriques la



disminució de la supervivència va ser molt més elevada, disminuint un 0.64 a les 72 hores de tractament. Aquesta extensa mort cel·lular en les ESCsi-ovàriques sota condicions de 1 i 5 mM d'ATP mostra diferències pronunciades respecte la resta de cultius (ESC-P, -S, -A i ESCsi-profunda) indicant una major acció citotòxica de l'ATP sobre aquestes cèl·lules.

En relació a la mort cel·lular de les ESCsi tractades amb UTP i adenosina, es va detectar una tendència d'aquestes cèl·lules en morir sota als tractaments a concentracions d'1 mM, però sense diferències estadísticament significatives respecte al control (**Figura R5, gràfica K i L**). És interessant observar en la **gràfica K de la Figura R5**, la marcada correlació de la disminució de la supervivència de les ESCsi amb la duració de la incubació amb UTP 1 mM.

A 5 mM d'UTP, les ESCsi-S van presentar una disminució significativa de la supervivència cel·lular en les tres durades del tractament, amb resultats equiparables a les cèl·lules ESC-S (**Figura R5**). En canvi, el tractament 5 mM d'adenosina en les ESCsi-S va desencadenar el doble de mort cel·lular en aquestes cèl·lules tractades durant 48 i 72 hores ( $0.19 \pm 0.07$  i  $0.30 \pm 0.05$ , respectivament) respecte a la mort detectada en les ESC-S sota les mateixes condicions ( $0.09 \pm 0.08$  i  $0.15 \pm 0.01$ ). Aquests resultats mostren una major sensibilitat de les cèl·lules provinents d'endometris amb endometriosis a tractaments prolongats amb una molt alta concentració d'adenosina (5 mM) respecte les mateixes cèl·lules de pacients sense la patologia.

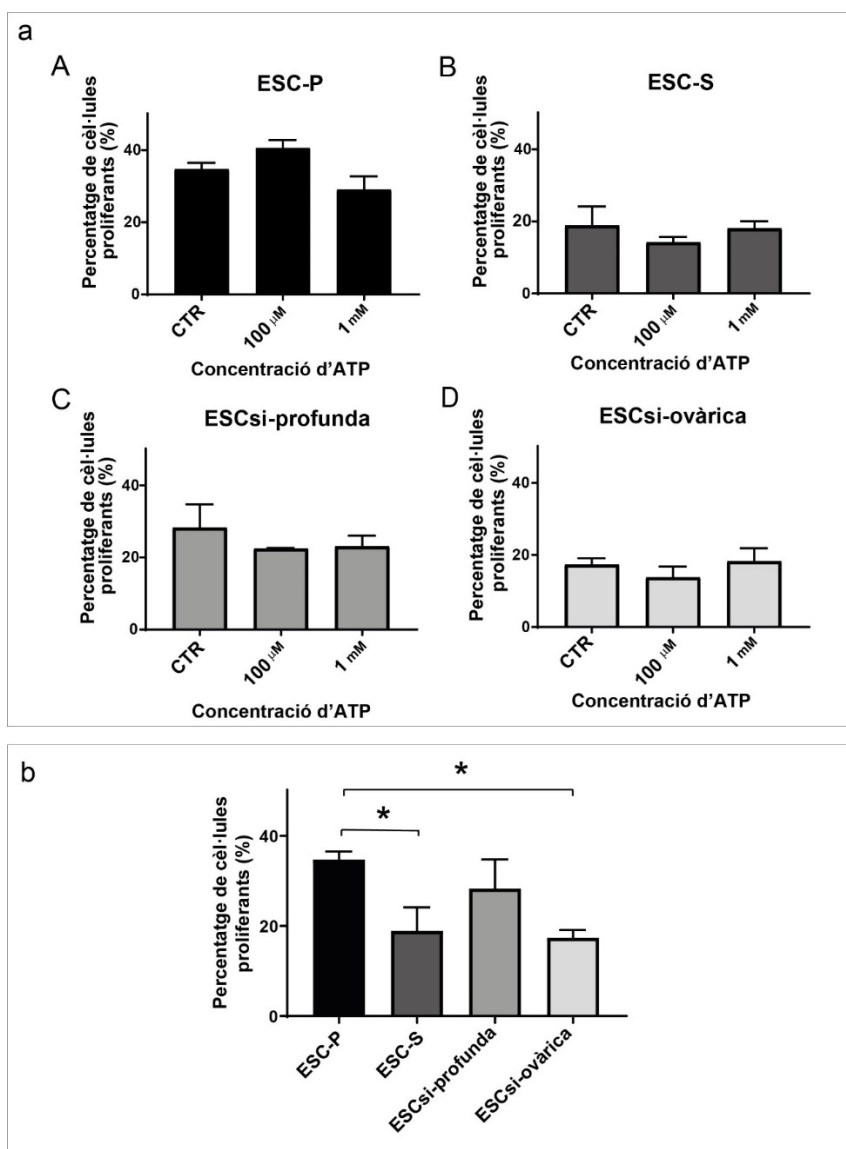
#### 4.5. Capacitat proliferativa de les ESC i les ESCsi

Els resultats dels assajos de viabilitat cel·lular van posar en manifest la necessitat de realitzar experiments de proliferació cel·lular sota la influència de l'ATP en les cèl·lules ESCsi. Es van estudiar també els cultius primaris obtinguts d'endometris cíclics no patològics (ESC-P i ESC-S) per poder avaluar si havia diferències en la capacitat proliferativa entre els diferents grups.

No es van detectar diferències significatives en la capacitat proliferativa de les cèl·lules estromals respecte al seu propi control al tractar-les 24 hores amb ATP 100  $\mu$ M o 1 mM (**Figura R7a**).

Al determinar la proliferació dels cultius durant 2 hores en el seu estat basal, sense addició d'ATP, vam observar que el 34.78 % de les cèl·lules ESC-P eren proliferants, un valor significativament superior al 18.91 % detectades en les ESC-S i el 17.36 % de les ESCsi-ovàriques ( $p$ -valor = 0.04 i 0.03, respectivament) (**Figura R7b**). En canvi, no es van observar diferències entre la proliferació de les ESC-P i les ESCsi-profundes ( $p$ -valor = 0.41).

Les cèl·lules ESCsi-profundes van presentar un 28.32 % de cèl·lules en proliferació, un valor notablement superior al obtingut en les ESC-S i en les ESCsi-ovàriques. Tot i aquesta marcada tendència en les ESCsi-profundes no es van detectar diferències significatives, afavorit per la gran desviació en els resultats obtinguda entre les replicues de l'experiment (**Figura R7b**).



**Figura R7.** Capacitat proliferativa dels cultius primaris de cèl·lules estromals endometrials, provinents d'endometris cíclics no patològics (ESC-P i ESC-S) i d'endometris de pacients amb endometriosi profunda (ESCsi-profunda) o ovàrica (ESCsi-ovàrica), sense i amb tractament d'ATP (100 µM o 1 mM) durant 24 hores. (a) No es van observar diferències significatives en el percentatge de cèl·lules proliferants en cap dels diferents cultius primaris respecte al seu propi control. (b) La comparativa de la proliferació basal, sense tractament, entre els cultius primaris va mostrar una major capacitat de les ESC-P respecte a les ESC-S i les ESCsi-ovàriques. Les ESCsi-profundes van mostrar una tendència major de proliferar respecte a les ESC-S i a les ESCsi-ovàrica. \*  $p$ -valor < 0.05

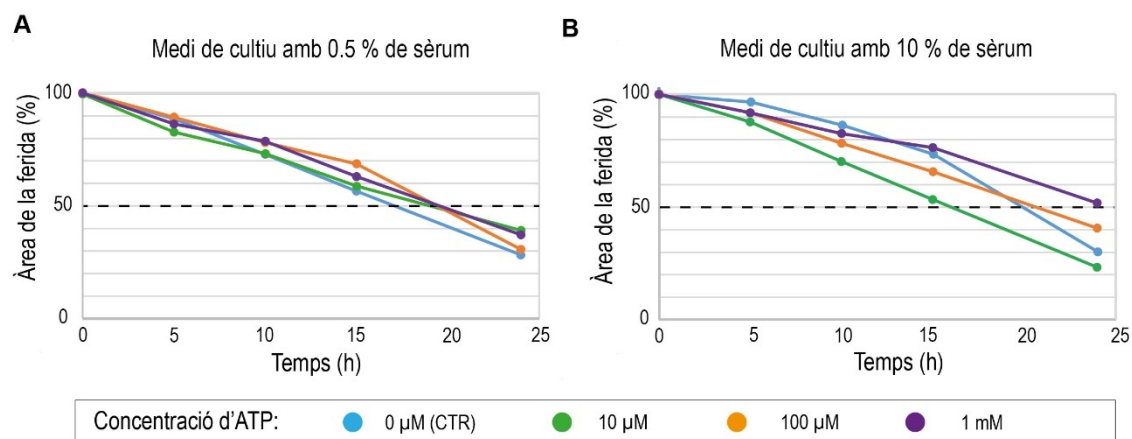
## 4.6. Migració de les cèl·lules estromals endometrials

### 4.6.1. Migració de les ESC-S (*wound healing assay*)

Per determinar les condicions per realitzar els assajos de migració de tipus cambra de Boyden es van realitzar assajos de tancament de ferida amb les ESC-S. Es va decidir tractar-les amb 0 µM, 10 µM, 100 µM o 1 mM d'ATP. Davant els resultats dels assajos de viabilitat cel·lular (apartat 4.4.) es va rebutjar treballar amb concentracions superiors.

Les condicions ideals per l'estudi serien sense la presència de sèrum en el medi de cultiu per evitar emmascaraments d'una baixa migració per la proliferació cel·lular. Per comprovar si era viable l'ús de baixes concentracions de sèrum en les nostres cèl·lules per realitzar assajos de migració, es van realitzar els experiments en paral·lel amb diferents condicions de sèrum (al 0.5 % i 10 %) en el medi cel·lular. En les dues condicions, es va realitzar un seguiment del tancament de la ferida durant 53 hores.

Es va detectar migració de les ESC-S en totes les condicions experimentals emprades. Es van obtenir diferents resultats de migració entre els experiments realitzats a diferents concentracions de sèrum. La migració de les cèl·lules va ser lineal durant les primeres 24 hores (**Figura R8**). En els assajos realitzats amb un medi de cultiu cel·lular amb baixa concentració de FBS (0.5 %) no es van detectar grans diferències en el temps transcorregut per un tancament del 50 % de la ferida entre els diferents tractaments d'ATP ( $19.30 \text{ h} \pm 0.33$ ; **Figura R8A**). En canvi, sí que es va detectar una reducció de 2 hores en el temps necessari per tancar el 50 % de la ferida per part del control en relació a les cèl·lules tractades (**Figura R8A**).



**Figura R8.** Assajos de migració cel·lular de tipus tancament de la ferida amb les ESC-S tractades amb diferents concentracions d'ATP en medi de cultiu amb 0.5 % (A) o 10 % de sèrum (B). (A) Les ESC-S en baixes condicions de sèrum en el medi i tractades amb diferents concentracions d'ATP presenten uns resultats similars entre elles, amb la necessitat de major temps pel tancament del 50 % de la ferida respecte al control. (B) Les ESC-S amb la presència de 10 % de sèrum en el medi i tractades amb diferents concentracions d'ATP presenten resultats més dispersos. Les cèl·lules tractades amb baixes concentracions d'ATP (10 µM) presenten un menor temps pel tancament del 50 % de la ferida respecte al control. En canvi, les cèl·lules tractades amb concentracions més altes d'ATP requereixen més hores que el control per assolir aquest mateix tancament.

Les ESC-S en medi amb 10 % de FBS van presentar resultats més dispersos entre les diferents concentracions d'ATP (**Figura R8B**). A baixes concentracions d'ATP (10 µM), la migració de les cèl·lules va augmentar, presentant el tancament del 50 % de la ferida més de 4 hores abans que sense ATP. Les mateixes cèl·lules tractades amb ATP 100 µM pràcticament no presenten diferències en el temps de tancament del 50 % de la ferida respecte al control (**Figura R8B**). Amb un tractament d'ATP a 1 mM, la migració cel·lular va disminuir molt, requerint gairebé 6 hores més que el control per aconseguir el tancament de la bretxa.

En la **Taula R2** es recullen els diferents temps de tancament del 50 % de la ferida sota les diferents condicions de sèrum i d'ATP estudiades.

Observant els resultats en les dues condicions de sèrum en el medi, es van determinar diferències associades a la presència d'una major concentració de FBS. Al comprovar que en baixes condicions de FBS es podia realitzar els assajos de migració, es va procedir a realitzar els assajos de migració de tipus cambra de Boyden a una concentració de 300  $\mu\text{M}$  d'ATP durant 24 hores [concentració i durada que no compromet la supervivència cel·lular (resultats determinats en l'apartat 4.4)].

**Taula R2.** Migració de les ESC-S tractades amb ATP en diferents condicions de sèrum

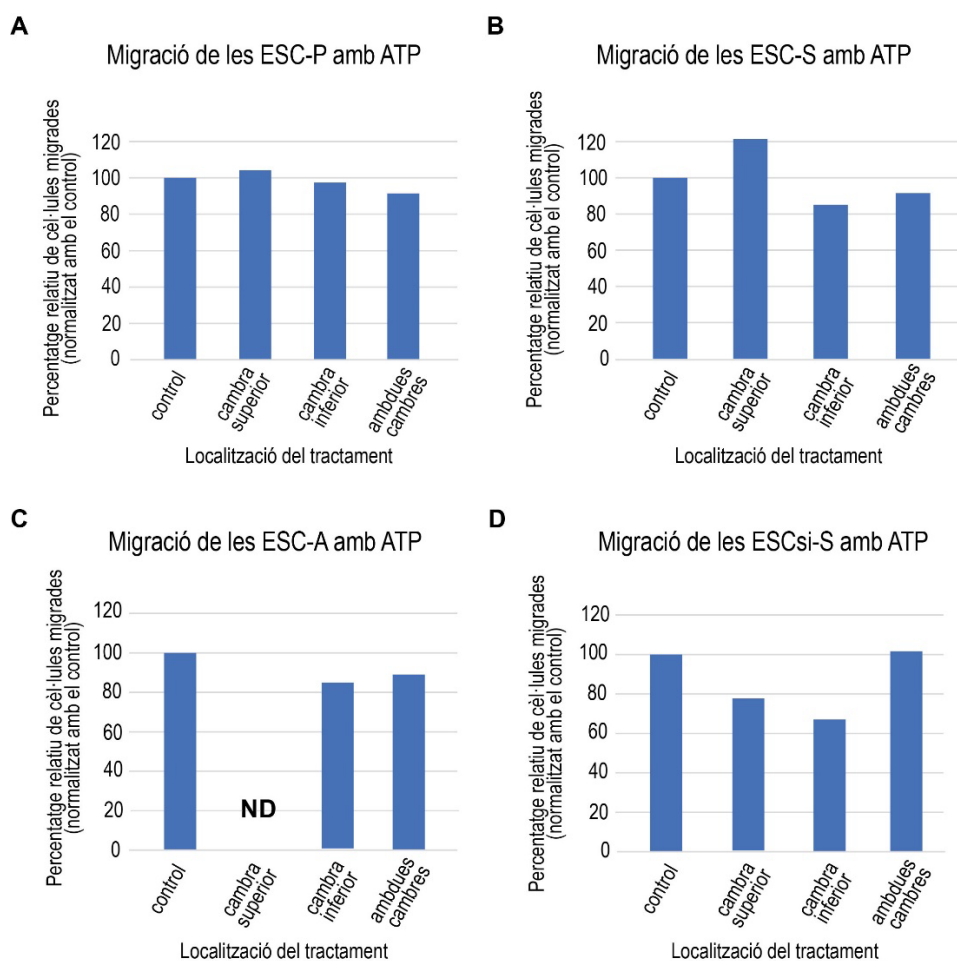
Concentracions d'ATP ( $\mu\text{M}$ )	Temps de tancament del 50 % de la ferida (h)	
	0.5 % FBS en el medi	10 % FBS en el medi
0	17.15	20.50
10	19.29	16
100	18.97	20.71
1000	19.64	26.32

#### 4.6.2. Migració de les cèl·lules estromals endometrials (assaig amb cambres de Boyden)

Es va observar migració en tots els cultius primaris d'ESC en els assajos de migració cel·lular tipus cambra de Boyden. Les cèl·lules es van tractar durant 24 hores amb 300  $\mu\text{M}$  d'ATP en la cambra superior, en la cambra inferior o en ambdues. En la **Figura R9** s'han recollit els percentatges de migració relativitzats amb la migració dels propis controls.

Les ESC-P no van presentar grans canvis en el percentatge de migració de les cèl·lules tractades respecte al control. Tot i això, en la **gràfica A de la Figura R9** podem observar una petita tendència de les cèl·lules en migrar més, un 4.13 %, quan vam afegir ATP a la cambra superior, amb la suspensió cel·lular, i una disminució del 8.57 % del valor relatiu de cèl·lules migrades quan l'ATP va ser present en les dues cambres.

En els assajos de migració de les ESC-S vam observar un increment del 21.32 % en el nombre relatiu de cèl·lules migrades quan es va incubar la suspensió cel·lular amb ATP (cambra superior). En canvi, es va detectar una disminució del 14.96 % del nombre relatiu de cèl·lules migrades quan el tractament el vam afegir a la cambra inferior. Quan el el tractament d'ATP el vam afegir en les dues cambres, es van observar uns valors de migració del 8.46 % inferior al control (**Figura R9B**).



**Figura R9.** Assajos de migració de tipus cambra de Boyden de les ESCs (A-C) i les ESCsi (D) amb 300 µm d'ATP i sense ATP (control). La presència d'ATP en la cambra superior va provocar un augment del percentatge relatiu de cèl·lules migrades en les cèl·lules provinents d'endometris cíclics (A i B) i una disminució en les ESCsi (D). El tractament d'ATP en les cambres inferiors va significar una disminució de la migració de les ESC-S (B), ESC-A (C) i sobretot en les ESCsi (D). La presència d'ATP en les dues cambres simultàniament va significar una petita disminució de la migració en les cèl·lules provinents d'endometris no patològics (A,B i C). Per una altra banda, no van produir canvis en la migració de les ESCsi. ND: no determinat.

La presència d'ATP en la cambra inferior i en les dues cambres simultàniament en les ESC-A va presentar una disminució del percentatge relatiu de les cèl·lules migrades del 15.96 i del 10.94 %, respectivament (**Figura R9C**). El percentatge relatiu de les cèl·lules ESC-A migrades a l'afegir l'ATP a la cambra superior no es va poder determinar.

Cuirosament, la presència d'ATP en la cambra superior o en la cambra inferior en les ESCsi va provocar una important disminució del percentatge relatiu de cèl·lules migrades d'un 22.95 i d'un 33.01 %, respectivament (**Figura R9D**). En canvi, a l'afegir l'ATP en les dues cambres de manera simultània les ESCsi van presentar una capacitat migratoria similar al control.

## 5. DISCUSSIÓ

L'establiment de cultius primaris de cèl·lules endometrials és un bon model *in vitro* per l'estudi de l'endometri fisiològic i patològic. Davant les nombroses evidències de canvis en el propi endometri eutòpic de dones amb endometriosi, i que l'origen més acceptat de les lesions endometriòtiques són restes de cèl·lules de l'endometri eutòpic, hi ha un gran interès en l'estudi d'aquestes cèl·lules endometrials eutòpiques en cultiu per elucidar els mecanismes cel·lulars i moleculars que participen en l'endometriosi.

Els canvis prèviament descrits en el **capítol 4** de la present tesi doctoral apunten a que la senyalització purinèrgica està involucrada, de manera destacable, en el paper de les cèl·lules estromals endometrials en l'endometriosi. En aquest capítol, s'ha definit un protocol per l'obtenció de cèl·lules estromals endometrials de pacients amb endometriosi i sense patologia endometrial, així com un cas de càncer d'endometri, per a poder realitzar futurs estudis que permetin determinar el paper de la senyalització purinèrgica en aquestes cèl·lules. El protocol definit en aquest capítol ha demostrat una total eficàcia per l'obtenció d'aquests cultius primaris estromals endometrials i només es veu limitat pels casos d'elevada edat, on no s'han pogut establir cultius primaris d'endometris en fase postmenopàusica avançada. Aquesta limitació és atribuïble al tipus de mostra i no a la tècnica, ja que s'ha descrit que els endometris atròfics són majoritàriament inactius i no presenten activitat proliferativa, o en els casos que s'ha detectat certa activitat proliferativa aquesta és molt escassa [253]. Aquesta limitació però, no hauria d'alterar l'obtenció i l'ús d'aquestes cèl·lules com a model *in vitro* de l'endometriosi, ja que aquesta és una malaltia depenent d'estrògens, i que per tant es produeix durant l'edat fèrtil de les pacients, quan l'endometri és premenopàusic.

Els resultats obtinguts en aquest capítol posen en evidència la importància del coneixement de la fase del cicle menstrual de l'endometri per l'obtenció del cultiu primari d'estroma endometrial, ja que tot i que les cèl·lules s'obtenen i es mantenen en les mateixes condicions, independentment del seu origen, es comporten i responen diferent. En diferents estudis realitzats en ESCs, aquest fet no es té en compte o no s'especifica, i això pot comprometre la reproductibilitat d'un assaig i/o alterar la interpretació dels resultats obtinguts [254,255]. Així mateix, també és molt important realitzar els experiments sempre en el mateix passe cel·lular per evitar variacions en els resultats associades als canvis que es produeixen en les cèl·lules al llarg dels passes cel·lulars. En el nostre model, hem obtingut un cultiu pur de cèl·lules estromals endometrials en el P4 i és el que hem utilitzat per realitzar tots els assajos experimentals.

Tot i que el principal avantatge de l'ús de cultius primaris és que reflecteix bastant bé la situació que es troba *in vivo*, l'estudi de l'expressió de les ectonucleotidases CD73, CD39, NTPDasa2 i NPP3 en les cèl·lules ens ha mostrat algunes diferències respecte a la seva expressió en el teixit endometrial (representat en **Figura D1**) [196,247,252]. Concretament, les ESCs han mostrat la pèrdua d'expressió gènica i proteica de CD39 en relació als resultats obtinguts en el teixit [196]. Les ESCs tampoc expressen CD39, coincidint amb els resultats obtinguts en el teixit (**capítol 4**)



[247]. En canvi, a l'estudiar la principal activitat d'aquesta ectonucleotidasa, l'activitat ADPasa, en aquests cultius, sí s'observa aquesta activitat. Per una altra banda, el marcador histològic NPP3 d'estroma endometrial en pacients d'endometriosis descrit en el **capítol 4**, no es va detectar en les cèl·lules estromals provinents d'endometris de dones amb endometriosis. Davant la importància d'estudiar el paper de CD39 i l'NPP3 en l'endometriosis per les diferències detectades entre el teixit endometrial eutòpic de dones amb la patologia i sense la malaltia, la manca d'expressió d'aquests dos ectoenzims pot semblar inicialment un inconvenient pel seu estudi. La generació, però, de vectors virals pot revertir aquesta situació, aconseguint la sobreexpressió específica de CD39 i de l'NPP3 en aquestes cèl·lules i permetent elucidar el seu paper en l'estroma endometrial i en l'endometriosis.

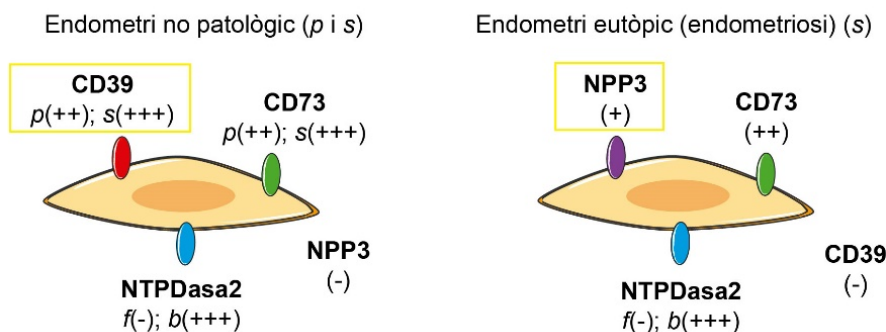
L'expressió proteica de CD73 s'ha detectat en tots els cultius primaris estromals, sense diferències entre les ESCs i les ESCsi. En el **capítol 4**, hem demostrat la seva disminució en els endometris eutòpics de dones amb la patologia, així com la seva pèrdua en les lesions ovàriques i profundes. És per això, que per conèixer la implicació d'aquesta pèrdua o disminució seria necessari l'estudi de les cèl·lules amb la presència d'inhibidors específics per CD73 que no comprometin la viabilitat de les cèl·lules, com és l'alfa, beta-metilen adenosina difosfat ( $\alpha,\beta$ -meADP), o eines moleculars per silenciar la seva expressió, com són l'ús d'ARNs d'interferència [256,257].

En el cas de l'NTPDasa2, on la seva expressió estromal en teixit es troba només en les cèl·lules presents en la capa basal, en els cultius primaris s'han detectat principalment cèl·lules NTPDasa2<sup>+</sup>. Aquest fenotip pot indicar que les cèl·lules estromals que han generat el cultiu siguin les de la capa funcional, tot i que esperariem cèl·lules estromals de la capa basal, NTPDasa2<sup>+</sup>, per les seves característiques progenitores. Tot i això, cal tenir en compte dues situacions; la primera, que és important a l'obtenir la mostra endometrial evitar la contaminació per part de cèl·lules del miometri i per això és preferible sacrificar teixit endometrial de la capa basal; i la segona, com ocorre amb l'expressió d'altres proteïnes, l'expressió de les cèl·lules en cultiu, i sobretot en els cultius en 2 dimensions, no reflecteixen completament la situació tissular. La detecció proteica de l'NTPDasa2 en algunes cèl·lules estromals provinents d'endometris atrofics ens podria indicar la presència de com a mínim dues subpoblacions diferents en un mateix cultiu primari. Tenint en compte els resultats mostrats en el **capítol 3**, no es descarta la possibilitat de que les cèl·lules NTPDasa2<sup>+</sup> que puguin ser eMSCs. L'excepcionalitat de trobar cèl·lules NTPDasa2 positives probablement reflecteixi la baixa quantitat de cèl·lules amb aquest fenotip en el cultiu primari, i per això no descartem que també puguin estar presents en els altres cultius però que no s'hagin detectat.

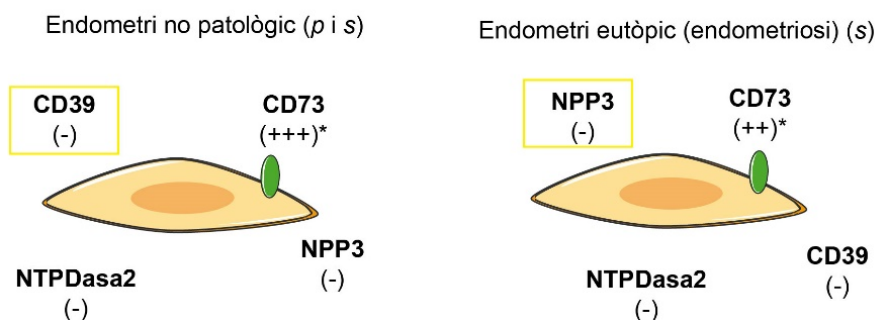
Estudis de viabilitat cel·lular en els diferents cultius primaris obtinguts amb la presència de diferents concentracions d'ATP, UTP i adenosina han mostrat que aquests tenen accions citotòxiques a concentracions molt elevades. Aquests resultats indiquen que és possible realitzar estudis en presència d'aquests nucleòtids i d'adenosina sense alteracions en els resultats per

l'afectació de la viabilitat de les cèl·lules. Per una altra banda, encara que a concentracions elevades, els canvis en la supervivència cel·lular mostren que les cèl·lules són sensibles a aquestes molècules i que per tant, ha d'haver la presència de purinoreceptors en la seva superfície.

#### A. TEIXIT ESTROMAL ENDOMETRIAL



#### B. CÈL·LULA ESTROMAL ENDOMETRIAL (cultiu primari)



**Figura D1.** Caracterització de CD73, CD39, l'NTPDasa2 i l'NPP3 en l'estroma endometrial en teixit (A) i en el cultiu primari (B) en dones amb i sense endometriosi. Canvis d'expressió s'han detectat en les cèl·lules estromals endometrials en cultiu respecte al teixit (quadres grocs) [196,247,252]. En els cultius primaris, hem detectat la pèrdua d'expressió de CD39 en les cèl·lules d'endometris no patològics, i d'NPP3 en els cultius primaris de cèl·lules provinents d'endometris eutòpics de dones amb endometriosi. *p*: endometri proliferatiu; *s*: endometri secretor. *f*: capa funcional; *b*: capa basal. La intensitat de l'expressió proteica s'ha representat: (-) sense immunomarcatge, + marcatge escàs, ++ marcatge moderat, +++ alt marcatge. \* L'asterisc en CD73 (B) indica que la intensitat de marcatge detectat fa referència a l'expressió gènica i no a la proteica.

De manera general, s'ha observat una major resistència de les cèl·lules estromals endometrials a l'adenosina i sensibilitat per l'ATP i l'UTP. Tot i aquesta tendència general en els diferents cultius cel·lulars, els nostres resultats mostren una resposta diferent entre les ESCs i les ESCsi, però també entre els dos cultius d'ESCsi (ESCsi-profunda i ESCsi-ovàrica). Els estudis realitzats en les ESCsi són preliminars ja que tenim la limitació d'haver aconseguit només dos cultius primaris. Per arribar a uns resultats definitius serà necessari una mostra més representativa, amb la inclusió de més casos d'endometriosi i tenint en compte la presència de casos que presentin les tres formes bàsiques de la malaltia (peritoneal, ovàrica i profunda). Segons els resultats obtinguts en aquest capítol, les ESCsi provinents d'una pacient amb endometriosi ovàrica van presentar més sensibilitat a l'ATP, exercint una acció citotòxica en concentracions menors d'ATP que en les ESCsi-profunda.

Per una altra banda, els estudis de viabilitat van suggerir que la incubació de les ESCsi-profundes amb concentracions moderades d'ATP conduïa a un augment de la capacitat proliferativa d'aquestes cèl·lules. Però al realitzar estudis específics de proliferació en les ESCs provinents d'endometris cíclics i en les ESCsi no es van observar diferències en la proliferació de les cèl·lules amb la presència d'ATP. Aquests resultats encaixen amb un estudi previ realitzat per Zhang *et al.*, en el qual el tractament amb diferents concentracions d'ATP (de 10 ng/ml a 10mg/ml) durant 24, 48 i 72 hores en una línia cel·lular establerta de cèl·lules endometrials estromals eutòpiques de diferents dones amb endometriomes (hEM15A), no van mostrar diferències significatives en la proliferació respecte a les mateixes cèl·lules no tractades [258]. On sí es van poder determinar diferències va ser en la capacitat proliferativa basal dels nostres cultius primaris en funció de la fase menstrual de l'endometri d'origen. Les ESCs provinents d'endometris en fase proliferativa van presentar més proliferació que els cultius, tant no patològics com d'endometriosis, provinents d'endometris en fase secretora. Aquest resultat evidència la homologia que presenten aquests cultius primaris amb la funcionalitat/comportament *in vivo*, fent èmfasi en el principal avantatge d'utilitzar aquest model *in vitro* per l'estudi de l'endometriosis. Curiosament, els resultats de proliferació obtinguts en les ESCsi mostren una certa tendència per part del cultiu primari obtingut d'una dona amb endometriosis profunda i ovàrica de presentar una major capacitat proliferativa basal que l'altre cultiu provinent d'una dona amb endometriosis únicament ovàrica. Tot i que són resultats preliminars i es necessiten més mostres per poder extreure resultats concloents, aquests resultats suggereixen una major capacitat proliferativa de les cèl·lules estromals endometrials eutòpiques en els casos més severos d'endometriosis. En la mateixa línia que els nostres resultats, nombrosos estudis presenten diferències entre els endometris de les pacients amb endometriosis de les pacients sense la patologia [259], però també diferències entre els endometris eutòpics de les pacients diagnosticades en diferents estadis de la malaltia (model ASRM, estadis I-IV) [260].

L'expressió de gens involucrats en la migració cel·lular en les cèl·lules endometrials de pacients amb endometriosis també s'ha descrit en l'endometriosis [260]. Els estudis de migració realitzats en aquest capítol han mostrat la capacitat migratòria d'aquest model cel·lular i poden ser una bona eina per poder estudiar els mecanismes moleculars involucrats en la migració d'aquestes cèl·lules, necessària per la formació de les lesions en les localitzacions ectòpiques. L'ATP s'ha estudiat com a una molècula inductora de la migració cel·lular. Principalment, la seva acció s'ha estudiat en la quimioatracció exercida sobre les cèl·lules inflamatòries requerida per aconseguir la seva presència en els focus on s'ha produït un dany cel·lular o tissular [170]. Els nostres assajos, de manera general, han mostrat una situació oposada, on l'addició d'ATP desencadena una disminució de la migració cel·lular en els cultius primaris d'estroma endometrials, fet més marcat en les cèl·lules provinents de pacients amb endometriosis. Davant aquesta situació és fàcil pensar que l'ATP a través de l'activació d'algun o alguns receptors P2 presents en la membrana cel·lular d'aquestes cèl·lules produeixen aquesta resposta, però amb el coneixement actual i només amb aquests experiments no es pot confirmar. De fet, l'activitat ATPasa, ADPasa i, sobretot, AMPasa detectada en aquestes cèl·lules proposa que l'acció podria ser produïda per

l'adenosina, generada gràcies a la hidròlisi d'ATP per part de les ectonucleotidases. Un exemple paradigmàtic d'aquesta situació és la regulació diferencial que exerceix l'ATP i l'adenosina en la motilitat de la micròglia (revisat en [261]). En la micròglia, s'ha descrit l'ATP com un potent quimioatraient actuant principalment a través dels nombrosos receptors P2Y<sub>12</sub> [262,263]. En

canvi, l'activació de la micròglia indueix la regulació a la baixa d'aquest receptor i paral·lelament s'incrementen els nivells del receptor d'adenosina A<sub>2A</sub> i s'observa que l'acció de l'ATP és la contrària, es produeix una migració quimiorrepulsiva, atribuïble a l'acció de l'adenosina generada a partir d'aquest ATP [264]. En les eMSCs també s'ha descrit una disminució de la capacitat migratòria en presència de l'ATP. Els esforços per identificar el mecanisme involucrat en aquesta modulació de la capacitat migratòria només han permès descartar la implicació del receptor P2X<sub>7</sub> [195]. Està clar, doncs, que és essencial la caracterització completa del purinoma en aquests cultius primaris, especialment dels purinoreceptors, i realitzar estudis farmacodinàmics que permetin clarificar el paper de la senyalització purinèrgica en aquestes cèl·lules i estudiar els mecanismes moleculars implicats en l'endometriosi.

En aquest capítol, per tant, hem definit un mètode eficaç d'obtenció i establiment de cultius primaris d'estroma endometrial provinents d'endometris no patològics i de pacients amb endometriosi. Hem comprovat que aquest mètode pot ser útil per l'obtenció de models *in vitro* d'altres patologies, concretament del càncer d'endometri. A més, hem comprovat que els nostres cultius primaris d'estroma endometrial són una eina útil per l'estudi *in vitro* del paper de la senyalització purinèrgica en el comportament de les cèl·lules estromals de l'endometri no patològic, però també per determinar la seva implicació en la patologia de l'endometriosi.



# DISCUSSIÓ

*"Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought."*

Albert Szent-Györgyi





## DISCUSSIÓ

L'endometriosis és una malaltia ginecològica que altera significativament la qualitat de vida de les dones que la pateixen. El seu diagnòstic tardà, fomentat pel **desconeixement de l'etiologia** de la malaltia i la **manca de biomarcadors**, és un problema important que dificulta el maneig clínic de les pacients i afavoreix la progressió de la malaltia. Davant la necessitat urgent de la detecció de nous biomarcadors, nombrosos grups de recerca han dedicat els seus esforços en aquest camp, però cap biomarcador, individual o en combinació, s'ha validat per un test diagnòstic no invasiu amb suficient sensibilitat i especificitat que substitueixi la tècnica de diagnòstic de referència, la laparoscòpia (revisat en [265]). La present tesi s'ha orientat en determinar **nous candidats a biomarcadors** de l'endometriosis i en elucidar alguns dels **mecanismes cel·lulars i moleculars implicats en el desenvolupament i progressió de la malaltia**.

L'ATP i l'adenosina extracel·lular, els principals mediadors de la senyalització purinèrgica, estan involucrats en nombrosos processos fisiològics i fisiopatològics, incloent la reproducció i la resposta immunològica [147,170]. Estudis previs del nostre grup van detectar un increment significatiu de l'activitat ectonucleotidasa en el fluid contingut en els endometriomes ovàrics en comparació amb els quists simples [234], mostrant un primer indicatiu de les diferències en la metabolització de l'ATP i la generació d'adenosina en l'endometriosis. Es per això, que **el primer objectiu** de la tesi ha estat determinar nous candidats a biomarcadors de l'endometriosis estudiant aquest fluid contingut en els endometriomes, un fluid actualment de rebuig. Concretament, s'han estudiat alguns dels enzims involucrats en el control dels nivells extracel·lulars d'ATP i d'adenosina, les ectonucleotidases.

La detecció i quantificació dels ectoenzims ADA, ALP, NPP1 i NPP3 en el fluid aspirat dels quists ovàrics han mostrat un increment significatiu de **l'ADA i de l'NPP1** en el fluid contingut en els endometriomes en comparació amb els quists ovàrics simples de dones sense la patologia.

De fet, el resultat més destacable ha sigut el gran increment dels nivells d'ADA detectat en els endometriomes. Diversos estudis han presentat la determinació dels nivells o l'activitat d'ADA com a un biomarcador diagnòstic o pronòstic de diferents neoplàsies, infeccions o malalties inflamatòries cròniques [266-269], totes elles amb un important quadre inflamatori associat. Tot i les nombroses malalties que mostren un increment en els nivells d'ADA, els alts nivells locals detectats en els fluids continguts en els endometriomes, un fluid derivat de la sang, suggereixen que podrien trobar-se també altament incrementats en la sang perifèrica, amb nivells superiors als detectats en les altres patologies, convertint-se en un bon marcador no invasiu per l'endometriosis. En un estudi contemporani al nostre, es va realitzar la seqüenciació de l'ARNm de mostres d'endometri eutòpic de dones amb endometriosis moderada o greu (estadis III-IV) amb la finalitat d'identificar biomarcadors potencials per a l'endometriosis. Es va determinar una reducció significativa de l'expressió de l'**ADA2**, gen que codifica per a una de les dues isoformes de l'ADA detectades en humans, concretament per la principal forma detectada en sang. Tot i

aquests resultats, no es va realitzar la seva validació [270]. Futurs estudis en sang, doncs, són necessaris per determinar els nivells i l'activitat de l'ADA en els sèrums de pacients amb endometriosis i avaluar-ne el seu valor diagnòstic en la patologia.

Per una altra banda, també s'ha detectat un increment de l'NPP1 en el contingut dels endometriomes. L'ectonucleotidasa NPP1 té una forma soluble i detectable en el sèrum humà [153], i per tant, també podria ser estudiada en sang com a biomarcador d'endometriosis. Tot i això, aquest enzim és principalment una glicoproteïna transmembrana [153]. Durant dècades, l'activitat enzimàtica principal de l'NPP1 es considerava la hidròlisi de nucleòtids [de l'ATP i de la guanosina trifosfat (GTP)], però recentment, s'ha determinat el seu paper crític en la resposta immunològica a través de la inactivació de la via dels gens d'interferó (STING) [271]. Durant el dany cel·lular, s'alliberen DAMPs que activen el sistema immunitari innat a través de la via STING [272]. Concretament, la presència d'ADN en el citoplasma activa la sintetasa GMP-AMP cíclica (cGAS) que converteix el GTP i l'ATP en GMP-AMP cíclic (cGAMP), lligand estimulador de la via STING (de l'anglès *stimulator of interferon genes*), involucrada en l'inici de la resposta inflamatòria a través de la producció d'interferons de tipus 1 i altres citocines [271]. L'NPP1 hidrolitza el cGAMP, regulant negativament la resposta immunitària. En les cèl·lules tumorals, s'ha descrit la sobreexpressió de l'NPP1 com a un mecanisme d'evasió del sistema immunitari a través de la inhibició de la via STING [271,273]. A més, aquest mecanisme d'inhibició també s'ha descrit en les infeccions per *Mycobacterium tuberculosis* per evitar la resposta immunitària de l'hoste contra el microorganisme [274]. En l'endometriosis, però, s'ha detectat un escenari completament oposat en quant a l'activació de la via STING [275].

En l'endometri, el nostre grup va caracteritzar la presència de l'NPP1 en l'epiteli glandular dels endometris de dones sense patologia endometrial en fase proliferativa [196]. Un estudi en les cèl·lules epitelials endometrials de les lesions endometriòtiques va mostrar un increment significatiu de l'activació de la via STING en comparació de les cèl·lules epitelials endometrials eutòpiques [275]. Aquest increment va estar correlacionat amb l'increment dels limfòcits intraepitelials, fent èmfasi en l'estat inflamatori crònic que es presenta en l'endometriosis [275]. Aquests resultats suggereixen que l'increment de la forma soluble de l'NPP1 en les lesions ovàriques no es correlaciona amb un increment de l'expressió de la forma de membrana en les cèl·lules endometrials ectòpiques. Així doncs, es posa en manifest la necessitat de l'estudi de la senyalització purinèrgica, concretament de les ectonucleotidases en l'endometriosis per incrementar el coneixement dels mecanismes implicats en la patologia, amb la possibilitat d'identificar noves dianes terapèutiques, com podria ser l'NPP1, per regular la resposta inflamatòria de les pacients.

Davant tots els indicis que apunten a la senyalització purinèrgica com a una via clarament involucrada en la patologia de l'endometriosis, un dels principals objectius de la tesi doctoral ha estat caracteritzar l'expressió i la distribució de les ectonucleotidases en l'endometri eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis i comparar-ho amb els endometris no patològics.

Prèviament, el nostre grup havia caracteritzat les ectonucleotidases CD73, CD39, NTPDasa3, NPP1, NPP3, PLAP, TNAP i l'enzim CD26 en endometris humans no patològics cíclics i atròfics [196]. Una limitació en l'estudi de les ectonucleotidases és la disponibilitat d'anticossos per a la immunodetecció de les diferents proteïnes, dificultant la caracterització completa dels ectoenzims en el teixit endometrial. Durant la tesi, hem testat dos nous anticossos per l'NTPDasa2 que ens han permès la caracterització de la proteïna en l'endometri no patològic i en el teixit endometrial de pacients amb endometriosis. Per millorar la tècnica d'estudi de les ectonucleotidases i comprovar l'especificitat de diferents anticossos comercials en les nostres mostres en congelació, hem optimitzat **un protocol per detectar simultàniament l'expressió proteica i la seva activitat nucleotidasa (objectiu 2)**. Aquesta tècnica l'hem descrit junt amb la caracterització de CD73, CD39, NTPDasa2 i la fosfatasa alcalina placentària (PLAP; de l'anglès *placental alkaline phosphatase*) en les trompes uterines. La presència de l'eix CD39-CD73 en les cèl·lules de múscul llis de les trompes uterines, així com de l'NTPDasa2, l'NTPDasa3 i CD73 en les cèl·lules epitelials ciliades reafirma la importància de la senyalització extracel·lular de l'ATP-adenosina en la funcionalitat de les trompes, i per tant, en el correcte transport de gàmetes i de l'embrió.

La tècnica de detecció simultània de l'expressió proteica amb l'activitat nucleotidasa, ha permès **la caracterització de l'NTPDasa2 en els endometris cíclics i atròfics de dones sense patologia endometrial (objectiu 3)**.

A diferència de l'expressió fluctuant de la resta d'ectonucleotidases descrites en l'endometri anteriorment [196], l'NTPDasa2 no ha presentat un patró d'expressió influenciat per les hormones sexuals femenines al llarg del cicle menstrual, és a dir, la seva expressió s'ha mantingut constant en els endometris cíclics i els atròfics. L'expressió de l'NTPDasa2 s'ha observat al llarg dels cilis de les cèl·lules epitelials ciliades superficials i glandulars, una localització similar a la detectada en les trompes uterines. L'NTPDasa2 també és present en les cèl·lules estromals que conformen la capa basal de l'endometri. Aquest resultat, doncs, presenta a **l'NTPDasa2 com un nou marcador histològic d'estroma de la capa basal**, eina essencial per l'estudi d'aquestes cèl·lules, a les que se li atribueix la capacitat regeneradora de la capa funcional de l'endometri, després en cada cicle menstrual. A més a més, com hem comprovat, aquest marcatge basal de l'NTPDasa2 és útil per traçar patologies amb origen en la capa basal endometrial, com succeeix amb l'adenomiosi. Estudis posteriors del nostre grup mostren que aquest marcatge basal de l'NTPDasa2 també pot ser útil en el càncer d'endometri, ja que hem observat la pèrdua del marcatge d'NTPDasa2 en les cèl·lules estromals localitzades en la zona de la unió tumoral-miometrial, exclusivament en els càncers d'endometri amb un fenotip invasiu. En canvi, les cèl·lules estromals NTPDasa2<sup>+</sup> "*basals*" es mantenen en els casos de càncer d'endometri no infiltrants. Això converteix l'NTPDasa2 en un marcador útil per diferenciar els casos de càncer d'endometri no invasius, amb un estroma NTPDasa2<sup>+</sup>, dels invasius, amb un estroma desmoplàstic NTPDasa2<sup>-</sup> (veure **Annex 3**) [276].

La presència de l'NTPDasa2 únicament en les cèl·lules estromals de la capa basal, amb una marcada expressió al voltant de les glàndules basals on s'han descrit les cèl·lules epitelials progenitores [277], fa pensar que l'NTPDasa2 podria estar relacionada amb el manteniment d'aquestes cèl·lules progenitores. De fet, l'NTPDasa2, coneguda també com l'ecto-ATPasa, s'ha descrit com el principal ectoenzim regulador dels nivells de nucleòtids del microambient de les cèl·lules neurals progenitores en rates i ratolins, involucrada en el control de la proliferació i de l'expansió d'aquestes cèl·lules mitjançant l'activació del receptor P2Y<sub>1</sub> [278-281]. A més, també s'ha descrit en els peixos zebra la necessitat de l'acció d'ecto-ATPases per l'activació del receptor P2Y<sub>1</sub> en les cèl·lules progenitores de la retina pel control de la seva proliferació [282]. A partir d'aquesta troballa caldrà incloure l'NTPDasa2 en els estudis de la capacitat regenerativa de l'endometri.

Per una altra banda, també hem identificat l'NTPDasa2 en una població de cèl·lules perivasculares en la capa funcional i basal dels endometris cíclics i atròfics de dones amb i sense endometriosis, així com en les lesions endometriòtiques. Estudis de colocalització de l'NTPDasa2 amb el marcador d'eMSCs *Sushi Domain Cointaning 2* (SUSD2) en aquestes cèl·lules, van concloure que **l'NTPDasa2 és un nou marcador de cèl·lules mare mesenquimals**, concretament de la població d'eMSCs SUSD2<sup>+</sup>, la més abundant descrita en l'endometri humà [283,284]. S'ha descrit l'alliberació d'ATP i nucleòsids per part de les MSCs i la presència de purinoreceptors en la seva membrana plasmàtica, regulant la capacitat immunomoduladora, d'expansió i de diferenciació de les MSCs [285-288]. És per això que és necessari el control fi dels nivells de nucleòtids i nucleòsids per part de les ectonucleotidases en el nínxol de les cèl·lules mare. La presència de l'NTPDasa2 en les eMSCs SUSD2<sup>+</sup> comporta la hidròlisi d'ATP i la generació sostinguda d'ADP en el nínxol perivascular de cèl·lules mare. A més, el nostre grup, anteriorment, va descriure la presència d'altres membres de la família de les ENTPDases en aquest microambient vascular que participarien en controlar els nivells d'ATP i dels seus derivats: CD39 en les cèl·lules endotelials i l'NTPDasa3 en els perícits de les arteries espirals de l'endometri [196]. Aquestes troballes mostren la necessitat d'estudiar la implicació de l'NTPDasa2 en les eMSCs i en el funcionament fisiològic de l'endometri que podrien permetre el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques en la medicina regenerativa.

El **quart objectiu** de la present tesi doctoral és la caracterització de les ectonucleotidases, entre elles l'NTPDasa2, en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis. En l'estudi de l'NTPDasa2 en el teixit endometrial eutòpic de dones amb endometriosis, no s'han detectat diferències d'expressió respecte l'endometri de dones sense la malaltia. L'estudi de les lesions peritoneals i profundes van mostrar **l'expressió de l'NTPDasa2 en l'estroma de les lesions**, similar a l'expressió detectada en la capa basal de l'endometri eutòpic. L'activitat peristàltica aberrant detectada en l'úter de dones amb endometriosis [230], afavoreix la presència de més fragments de la capa basal en la menstruació retrògrada i amb capacitat de formar l'estroma de les lesions [51]. En aquest sentit, s'ha observat que l'estroma de les lesions mostra un patró d'expressió cíclic com l'estroma de la capa basal de l'endometri eutòpic, suggerint que les lesions

provenen d'aquests fragments de la capa basal despresos en la menstruació retrògrada [51]. La troballa del marcador d'estroma basal NTPDasa2 en les lesions endometriòtiques donen suport a aquesta premissa. La formació de les lesions ovàriques sovint s'atribueix a un mecanisme diferent que el postulat en la teoria de d'implantació de Sampson. Concretament, molts estudis suggereixen una metaplàsia de les cèl·lules mesotelials que recobreixen la superfície de l'ovari, teoria de la metaplàsia celomàtica [42,45]. De ser així, podria explicar les diferències d'expressió en l'estroma de l'NTPDasa2 entre els diferents tipus de lesions.

Un dels canvis més destacables en l'estudi de les ectonucleotidases en els endometris eutòpics va ser els **canvis en el patró d'expressió de l'eix CD39-adenosinèrgic**, el principal responsable del metabolisme de l'ATP extracel·lular, caracteritzat pel treball seqüencial de CD39 i CD73 aconseguint la hidròlisi de l'ATP fins adenosina [289]. En condicions fisiològiques, l'expressió de CD39 en l'endometri es manté constant i, en canvi, els nivells de CD73 fluctuen [196,290], produint variacions dels nivells d'adenosina en microambient endometrial al llarg del cicle. En els endometris eutòpics de pacients amb endometriosis, vam observar un patró d'expressió de CD73 similar al fisiològic però amb la **pèrdua de CD39 en el component estromal**. Aquest escenari suggereix un desequilibri en la hidròlisi d'ATP que afavoreix una acumulació constant d'ATP extracel·lular. En el passat congrés científic de l'ASRM (2020), es van presentar els resultats preliminars d'un estudi realitzat en macacos amb endometriosi on es mostrava una disminució en la transcripció de CD73 en l'endometri eutòpic d'aquests animals en comparació amb macacos sense la patologia [291]. Aquests resultats van en la mateixa direcció que els nostres, amb la participació d'un eix CD39-CD73 aberrant i la consegüent alteració en la hidròlisi de l'ATP en la patologia de l'endometriosi. L'alteració de la hidròlisi de l'ATP en el propi endometri eutòpic, amb el consegüent increment dels seus nivells extracel·lulars, possiblement intervé en l'actuació alterada del sistema immunitari, afavorint l'increment de citocines, quimiocines i factors de creixement, així com en la creació d'un ambient oxidant nociu pels fenòmens de fecundació, implantació i desenvolupament de l'embrió [173,217,218]. Així doncs, les alteracions detectades en la metabolisme de l'ATP extracel·lular en l'endometri eutòpic poden estar implicades en la reducció o la impossibilitat de la gestació en les dones amb endometriosi.

**Alteracions en l'expressió de la via CD39-CD73 també es van detectar en les lesions endometriòtiques.** Concretament, l'expressió de CD39 i CD73 es perd completament en l'estroma de les lesions infiltrants profundes, el tipus amb un quadre clínic més sever i greu associat. En la teoria de la implantació del Dr. Sampson, es postula que les cèl·lules endometrials en la menstruació s'implanten en el peritoneu i, que posteriorment, algunes lesions tenen capacitat d'envair, suggerint que les lesions peritoneals, sovint anomenades lesions típiques, són precursoras de les lesions profundes [19]. De fet, sovint es considera l'endometriosi profunda com un estadi avançat de la malaltia i es creu que són canvis genètics i especialment epigenètics els que afavoreixen aquesta progressió de les lesions superficials a lesions infiltrants [292]. Aquesta hipòtesi podria coincidir amb els nostres resultats, on s'observa l'expressió de CD39-CD73 en el component estromal i de l'NTPDasa3 en les cèl·lules epitelials de les lesions



peritoneals, però es produeix la seva pèrdua en les lesions profundes. Aquests resultats suggereixen una correlació positiva entre **la pèrdua d'expressió de les ectonucleotidases, amb la conseqüent acumulació d'ATP extracel·lular en el microambient ectòpic, amb una major progressió o gravetat** de la patologia, que reafirmaria la implicació de l'ATP en el dolor i la infertilitat associada a l'endometriosis. A més, aquest desequilibri entre els nivells d'ATP i adenosina extracel·lular podrien estar promoguts per altres elements involucrats en el metabolisme d'aquestes molècules, a part de les ectonucleotidases, com és l'ADK. De fet, resultats preliminars mostren un increment en els nivells citoplasmàtics de l'ADK en el component epitelial i estromal de les lesions endometriòtiques en macacos amb endometriosis, en comparació amb els nivells en l'endometri eutòpic o en l'endometri de macacos sense la patologia, que conduiria a una major disminució dels nivells extracel·lulars d'adenosina [291].

Recentment, la pèrdua estromal de CD73 també s'ha descrit en un tipus poc comú d'endometriosis, coneguda com endometriosis poliploide, caracteritzada per lesions endometriòtiques que formen masses de teixit endometrial, sovint de grans dimensions, que es projecten des de la superfície d'un quist o d'una serosa o mucosa, similar a un pòlip [293]. Per una altra banda, els resultats preliminars de CD73 en macacos amb endometriosis han mostrat la pèrdua total de CD73 en les cèl·lules epitelials de les lesions endometriòtiques [291]. Aquestes troballes reforcen la implicació de CD73 en la patogènesi de la malaltia. En el càncer d'endometri, la reducció de CD73 s'ha descrit en els casos menys diferenciats i en estadis avançats, associant-ho amb l'increment de la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals [294,295]. La pèrdua de CD73 en les lesions ovàriques i les profundes, les quals requereixen l'adhesió i la invasió per part de les cèl·lules endometrials del teixit ectòpic, pot ser indicatiu de la seva implicació en les capacitats migratòries i invasives d'aquestes cèl·lules necessàries per originar les lesions.

La pèrdua d'expressió de les ectonucleotidases en les cèl·lules endometrials ectòpiques desencadenaran un increment dels nivells d'ATP extracel·lular i la reducció de l'adenosina, alterant el mecanisme de regulació de la senyalització purinèrgica i les respostes transitòries associades. Així doncs, aquesta situació comportarà una resposta immunitària exacerbada i persistent, i una senyalització del dolor incrementada i desproporcionada en les pacients amb endometriosis, principalment en aquelles amb lesions profundes, on es produeix major pèrdua d'expressió de les ectonucleotidases. L'activació del receptor P2X3 és clau per la senyalització del dolor i l'algèsia en l'endometriosis. En rates, la inducció d'endometriosis produeix una hiperalgèsia termal i mecànica concomitant a una elevació dels nivells endògens d'ATP, i l'expressió del receptor P2X3 en les lesions està associada amb la gravetat de la hiperalgèsia en aquests animals [208]. La implicació de l'ATP i del receptor P2X3 en el dolor associat a l'endometriosis s'ha confirmat amb l'atenuació del dolor associat a l'endometriosis en les rates a l'administrar un antagonista selectiu de P2X3, A-317491 [296]. Actualment, s'està avaluant l'eficàcia i la seguretat de l'ús d'un antagonista de P2X3, MK-7264/AF-219, conegut com gefapixant, en un assaig clínic en dones amb dolor associat a l'endometriosis (assaig clínic:

NCT03654326). Aquest assaig és un clar exemple de com l'estudi de la senyalització purinèrgica pot ser clau per desenvolupar noves estratègies terapèutiques per l'endometriosis.

En relació a l'ectoenzim NTPDasa3, el nostre grup l'havia identificat com un nou marcador de les arteries espirals de l'endometri humà [196]. L'estudi dels endometris eutòpics de dones amb endometriosis mostra la pèrdua d'aquesta expressió en les arteries espirals. En rates gestants, s'ha observat que un increment de l'ATP extracel·lular desencadena una reducció del remodelatge d'aquestes arteries, provocant complicacions en la gestació [297,298]. En l'endometriosis, s'ha detectat la presència d'un remodelatge defectuós de les arteries espirals amb un impacte important en la seva fertilitat [299]. L'estudi del paper de l'ATP i de la pèrdua de l'NTPDasa3 en les arteries espirals de l'endometri eutòpic de dones amb endometriosis podria ser útil per definir noves dianes terapèutiques per la millora de la fertilitat de les pacients.

Encara que en l'estudi del fluid contingut en endometriomes es van detectar baixos nivells de l'ectoenzim NPP3 sense diferències respecte als quists simples, un resultat destacable de l'estudi de les ectonucleotidases en el teixit endometrial és la identificació de **l'NPP3 com a un nou marcador histopatològic de l'endometriosis**. L'estudi de l'NPP3 en el teixit va permetre detectar la seva expressió i activitat només en les cèl·lules estromals endometrials, eutòpiques i ectòpiques, de dones amb endometriosis. Aquests resultats evidencien que la recerca en l'endometriosis requereix un estudi acurat de diferents tipus de mostra i que cal una bona selecció del tipus de mostra en funció de l'objectiu principal de l'estudi per evitar arribar a conclusions errònies. A més de la participació de l'NPP3 en el control dels nivells extracel·lulars d'ATP, un increment dels nivells de l'NPP3 en diferents cèl·lules tumorals o, fins i tot en línies cel·lulars de fibroblasts, s'han relacionat amb un increment en la capacitat invasiva i en la motilitat de les cèl·lules [300,301]. Determinar el paper d'aquesta nova expressió en les cèl·lules endometrials estromals en les pacients amb endometriosis pot ser clau per determinar un dels mecanismes cel·lulars implicats en el desenvolupament i progressió de les lesions.

Així doncs, les troballes presentades en el **capítol 4** confirmen alteracions en la senyalització purinèrgica, concretament en el metabolisme de l'ATP en l'endometri eutòpic i en les lesions endometriòtiques. Per poder determinar el paper concret de les diferents ectonucleotidases i dels canvis detectats, principalment en el component estromal de les pacients amb endometriosis, així com la implicació de la resta d'elements del purinoma, és necessari un model cel·lular que ens permeti un bon estudi dels diferents mecanismes cel·lulars implicats en l'endometriosis. És per això, que finalment, el **cinqué objectiu** de la tesi ha sigut determinar el protocol d'obtenció de cultius primaris d'estroma endometrial i valorar el seu ús com a model *in vitro* per l'estudi del paper de la senyalització purinèrgica en el teixit endometrial.

El protocol definit en la present tesi doctoral ha permès **establir cultius primaris estromals provinents d'endometris de dones sense patologies endometrials i d'endometris eutòpics de dones amb endometriosis**. S'ha realitzat la **validació d'aquests cultius primaris d'estroma endometrial** mitjançant tècniques immunològiques, moleculars i d'activitat enzimàtica *in situ*, així

com s'ha determinat la viabilitat de les cèl·lules sota la influència dels principals efectors de la senyalització purinèrgica per confirmar el seu ús per futurs estudis que permetin determinar el rol de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis, però també en el funcionament fisiològic de l'endometri o en altres patologies endometrials.

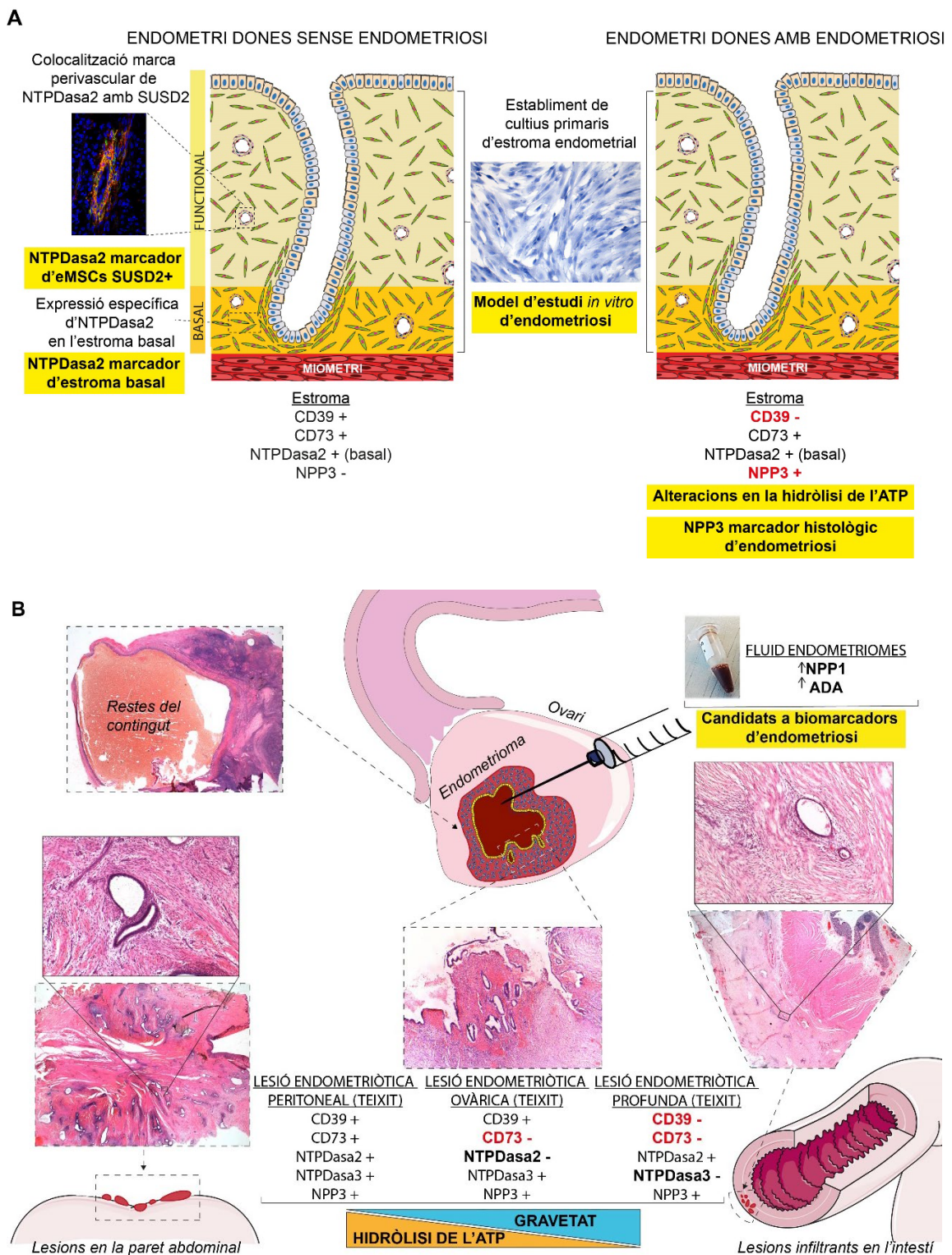
L'estudi de les ectonucleotidases CD73, CD39, l'NTPDasa2 i l'NPP3 en els nostres cultius primaris han determinat la presència de CD73 i l'absència de CD39, l'NTPDasa2 i l'NPP3. En l'estudi gènic de l'*NT5E* s'ha observat una major expressió gènica en els cultius primaris provinents d'endometris cíclics de dones sense patologia endometrial. Aquests resultats ja mostren diferències entre les cèl·lules obtingudes en diferents fases del cicle menstrual i reflecteix la importància de definir correctament la mostra d'estudi, tenint en compte la variable de la fase menstrual d'origen per evitar interpretacions errònies dels resultats. De fet, una clara implicació de l'estat dels endometris d'origen que marquen trets distintius entre els diferents cultius primaris establerts és la impossibilitat d'obtenir cultius primaris estromals d'endometris atròfics de dones d'elevada edat. Aquesta situació no és atribuïble al mètode d'obtenció, si no a la característica intrínseca de les cèl·lules que provenen d'un endometri inactiu i sense pràcticament capacitat regenerativa [253].

Estudis de supervivència cel·lular ens han permès comprovar que tractaments amb concentracions de fins 1 mM de nucleòtids (ATP o UTP) o d'adenosina durant 24 hores no presenten alteracions en la viabilitat cel·lular dels cultius primaris d'estroma endometrial, concloent la viabilitat del model per l'estudi del paper d'aquests efectors de la senyalització purinèrgica en l'estroma endometrial.

A més a més, aquests estudis de supervivència han mostrat resultats preliminars que mostren diferències en la resposta i la sensibilitat a l'ATP per part de les cèl·lules estromals obtingudes d'endometris eutòpics de pacients amb diferent afectació (ovàrica vs. ovàrica+profunda). Per una altra banda, també s'han observat diferències entre els dos cultius primaris obtinguts, on s'ha identificat una tendència a una major capacitat proliferativa basal per part de les cèl·lules estromals obtingudes d'una pacient amb major progressió d'endometriosis. Aquests resultats preliminars manifesten la utilitat d'aquest model per l'estudi dels mecanismes implicats en l'endometriosis i en la seva progressió i remarquen la necessitat d'obtenir un major nombre de mostres per obtenir resultats significatius i concloents.

Finalment, s'ha comprovat la capacitat migratòria dels nostres cultius primaris i s'han realitzat uns assajos inicials per l'estudi de la influència de l'ATP sobre la migració d'aquestes cèl·lules estromals, detectant una menor capacitat migratòria de les cèl·lules sota la presència de l'ATP. Aquests resultats primerencs posen en èmfasi la necessitat d'iniciar estudis que permetin la caracterització completa de les ectonucleotidases en els nostres cultius primaris, així com de la determinació dels diferents receptors purinèrgics presents en les cèl·lules per poder continuar amb l'estudi del paper de la senyalització purinèrgica en l'endometriosis. La continuïtat d'aquest estudi podria permetre la identificació de noves dianes terapèutiques que aconseguixin millorar la qualitat de vida de les dones amb la malaltia.

En la figura 11 s'han representat les principals troballes de la present tesi doctoral.



**Figura 11.** Representació de les principals troballes en el teixit endometrial eutòpic (A) i ectòpic (B). A) L'estudi de l'NTPDasa2 en l'endometri de dones sense endometriosis ha permès definir l'NTPDasa2 com a un marcador de les eMSCs SUSD2<sup>+</sup>. A més, la seva expressió només en l'estroma de la capa basal converteix aquesta ectonucleotidasa com a un marcador d'estroma basal. La comparació de l'expressió de les ectonucleotidases en l'endometri de dones sense la patologia amb l'endometri eutòpic de dones amb endometriosis mostra una expressió diferencial de les ectonucleotidases i determina l'expressió de l'NPP3 en l'estroma com a una marcador histològic de la patologia. B) L'anàlisi del fluid

contingut en els endometriomes ovàrics de dones amb endometriosis mostra un increment de l'NPP1 i l'ADA que els converteix en candidats a biomarcadors de l'endometriosis. L'estudi de l'expressió de les ectonucleotidases en les tres formes bàsiques de presentació de la malaltia han mostrat diferències d'expressió que associen una major gravetat de la malaltia amb una major pèrdua d'expressió de les ectonucleotidases, sobretot en l'eix principal d'hidròlisi de l'ATP CD39-CD73, i conseqüentment amb uns majors nivells d'ATP en el microambient. Figura d'elaboració pròpia.

En definitiva, amb els resultats recollits en aquesta tesi, podem confirmar la nostra hipòtesi inicial, la senyalització purinèrgica és una via de senyalització involucrada en l'endometriosis i les ectonucleotidases, elements de control fi de les concentracions extracel·lulars d'ATP i adenosina, presenten una expressió diferencial que pot ser utilitzada com a marcadors de la patologia. Concretament, l'estudi del fluid contingut en els endometriomes ovàrics ha permès determinar l'NPP1 i l'ADA com a candidats a biomarcadors de la patologia i l'estudi en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic ha permès definir l'expressió de l'NPP3 en el component estromal com a un marcador histològic d'endometriosis. Per una altra banda, l'estudi en el teixit endometrial eutòpic i ectòpic de dones amb endometriosis també ha mostrat una pèrdua aberrant de l'expressió de les ectonucleotidases, principalment en el component estromal, que condueix a un desbalanç en la hidròlisi de l'ATP, notòriament associada a la gravetat en la simptomatologia de la patologia i que relacionen l'ATP amb el dolor i la infertilitat associada a la malaltia. L'establiment de cultius primaris d'estroma endometrial eutòpic de pacients amb endometriosis i sense és una eina útil que ens permetrà l'estudi de la senyalització purinèrgica en el teixit endometrial i en l'endometriosis. A més, la troballa de l'NTPDasa2 com a marcador de l'estroma endometrial basal i de les eMSCs en l'endometri fisiològic reflecteix la importància de la senyalització purinèrgica en la regeneració endometrial, i aporta una nova eina pel traçat de patologies amb origen en la capa basal i per la medicina regenerativa.

# CONCLUSIONS

*"We know very little, and yet it is astonishing that we know so much,  
and still more astonishing that so little knowledge can give us so much power."*

Bertrand Russell





## CONCLUSIONS

Les principals conclusions d'aquesta tesi doctoral són:

1. Els ectoenzims NPP1 i ADA, presents en elevades concentracions en els fluids dels endometriomes, són candidats a biomarcadors de l'endometriosi.
2. La detecció simultània de l'expressió proteica de les ectonucleotidases i de la seva activitat enzimàtica és factible i resulta una excel·lent eina per al seu estudi.
3. L'ectonucleotidasa NTPDasa2 és el primer marcador d'estroma endometrial basal.
4. La detecció de NTPDasa2 és útil per traçar les lesions en l'adenomiosi.
5. L'NTPDasa2 és un marcador de la població de cèl·lules mare mesenquimals perivasculares SUSD2<sup>+</sup>.
6. La població cel·lular perivascular SUSD2<sup>+</sup>/NTPDasa2<sup>+</sup> es troba també en algunes lesions endometriòmiques.
7. L'activitat ectonucleotidasa es troba disminuïda en l'endometri de dones amb endometriosi, apuntant a l'acumulació d'ATP en el microambient endometrial eutòpic i ectòpic.
8. La pèrdua del principal eix d'hidròlisi de l'ATP, CD39-CD73, s'associa a les lesions més invasives d'endometriosi.
9. L'expressió proteica de l'ectoenzim NPP3 en les cèl·lules de l'estroma endometrial és un marcador histològic d'endometriosi.
10. Els cultius primaris de cèl·lules estromals endometrials provinents d'endometris de dones amb o sense endometriosi són una bona eina per l'estudi del paper de la senyalització purinèrgica en la patologia de l'endometriosi.



# **BIBLIOGRAFIA**

*"The more that you read, the more things you will know.*

*The more that you learn, the more places you'll go."*

Theodor Seuss Geisel (Dr. Seuss)



## BIBLIOGRAFIA

1. Nguyen, D.B.; Gilbert, S.; Arendas, K.; Jago, C.A.; Singh, S.S. Laparoscopic excision of pericardial and diaphragmatic endometriosis. *Fertil Steril* **2021**, *115*, 807-808, doi:10.1016/j.fertnstert.2020.09.152.
2. Sarma, D.; Iyengar, P.; Marotta, T.R.; terBrugge, K.G.; Gentili, F.; Halliday, W. Cerebellar endometriosis. *AJR Am J Roentgenol* **2004**, *182*, 1543-1546, doi:10.2214/ajr.182.6.1821543.
3. Ichida, M.; Gomi, A.; Hiranouchi, N.; Fujimoto, K.; Suzuki, K.; Yoshida, M.; Nokubi, M.; Masuzawa, T. A case of cerebral endometriosis causing catamenial epilepsy. *Neurology* **1993**, *43*, 2708-2709, doi:10.1212/wnl.43.12.2708.
4. Tong, S.S.; Yin, X.Y.; Hu, S.S.; Cui, Y.; Li, H.T. Case report of pulmonary endometriosis and review of the literature. *J Int Med Res* **2019**, *47*, 1766-1770, doi:10.1177/0300060518800868.
5. As-Sanie, S.; Black, R.; Giudice, L.C.; Gray Valbrun, T.; Gupta, J.; Jones, B.; Laufer, M.R.; Milspaw, A.T.; Missmer, S.A.; Norman, A.; et al. Assessing research gaps and unmet needs in endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* **2019**, *221*, 86-94, doi:10.1016/j.ajog.2019.02.033.
6. Ghai, V.; Jan, H.; Shakir, F.; Haines, P.; Kent, A. Diagnostic delay for superficial and deep endometriosis in the United Kingdom. *J Obstet Gynaecol* **2020**, *40*, 83-89, doi:10.1080/01443615.2019.1603217.
7. Zheng, P.; Zhang, W.; Leng, J.; Lang, J. Research on central sensitization of endometriosis-associated pain: a systematic review of the literature. *J Pain Res* **2019**, *12*, 1447-1456, doi:10.2147/jpr.s197667.
8. Morotti, M.; Vincent, K.; Becker, C.M. Mechanisms of pain in endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2017**, *209*, 8-13, doi:10.1016/j.ejogrb.2016.07.497.
9. Prescott, J.; Farland, L.V.; Tobias, D.K.; Gaskins, A.J.; Spiegelman, D.; Chavarro, J.E.; Rich-Edwards, J.W.; Barbieri, R.L.; Missmer, S.A. A prospective cohort study of endometriosis and subsequent risk of infertility. *Hum Reprod* **2016**, *31*, 1475-1482, doi:10.1093/humrep/dew085.
10. Broi, M.G.D.; Ferriani, R.A.; Navarro, P.A. Etiopathogenic mechanisms of endometriosis-related infertility. *JBRA Assist Reprod* **2019**, *23*, 273-280, doi:10.5935/1518-0557.20190029.
11. Della Corte, L.; Di Filippo, C.; Gabrielli, O.; Reppuccia, S.; La Rosa, V.L.; Ragusa, R.; Fichera, M.; Commodari, E.; Bifulco, G.; Giampaolino, P. The Burden of Endometriosis on Women's Lifespan: A Narrative Overview on Quality of Life and Psychosocial Wellbeing. *Int J Environ Res Public Health* **2020**, *17*, doi:10.3390/ijerph17134683.
12. Laganà, A.S.; La Rosa, V.L.; Rapisarda, A.M.C.; Valenti, G.; Sapia, F.; Chiofalo, B.; Rossetti, D.; Ban Frangež, H.; Vrtačnik Bokal, E.; Vitale, S.G. Anxiety and depression in patients with endometriosis: impact and management challenges. *Int J Womens Health* **2017**, *9*, 323-330, doi:10.2147/IJWH.S119729.
13. Falcone, T.; Flyckt, R. Clinical Management of Endometriosis. *Obstet Gynecol* **2018**, *131*, 557-571, doi:10.1097/AOG.0000000000002469.
14. Goncalves, M.O.; Siufi Neto, J.; Andres, M.P.; Siufi, D.; de Mattos, L.A.; Abrao, M.S. Systematic evaluation of endometriosis by transvaginal ultrasound can accurately replace diagnostic laparoscopy, mainly for deep and ovarian endometriosis. *Hum Reprod* **2021**, doi:10.1093/humrep/deab085.
15. Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. Model d'atenció a l'endometriosis a Catalunya. **2018**.



16. Nisolle, M.; Donnez, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil Steril* **1997**, *68*, 585-596, doi:10.1016/s0015-0282(97)00191-x.
17. Donnez, J.; Donnez, O.; Lousse, J.-C.; Squifflet, J. Peritoneal, Ovarian, and Rectovaginal Endometriosis are Three Different Entities. In *Endometriosis : Science and Practice*, Linda C Giudice, J.L.E., David L Healy, Ed.; Blackwell Publishing Ltd: 2012; pp. 92-107.
18. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis: 1996. *Fertil Steril* **1997**, *67*, 817-821, doi:10.1016/s0015-0282(97)81391-x.
19. Sampson, J.A. The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* **1940**, *40*, 549-557, doi:10.1016/S0002-9378(40)91238-8.
20. Koninckx, P.R.; Ussia, A.; Adamyan, L.; Wattiez, A.; Donnez, J. Deep endometriosis: definition, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril* **2012**, *98*, 564-571, doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1061.
21. Berlanda, N.; Somigliana, E.; Frattaruolo, M.P.; Buggio, L.; Dridi, D.; Vercellini, P. Surgery versus hormonal therapy for deep endometriosis: is it a choice of the physician? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2017**, *209*, 67-71, doi:10.1016/j.ejogrb.2016.07.513.
22. Koninckx, P.R.; Meuleman, C.; Demeyere, S.; Lesaffre, E.; Cornillie, F.J. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain. *Fertil Steril* **1991**, *55*, 759-765, doi:10.1016/s0015-0282(16)54244-7.
23. Montanari, E.; Dauser, B.; Keckstein, J.; Kirchner, E.; Nemeth, Z.; Hudelist, G. Association between disease extent and pain symptoms in patients with deep infiltrating endometriosis. *Reprod Biomed Online* **2019**, *39*, 845-851, doi:10.1016/j.rbmo.2019.06.006.
24. Rolla, E. Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Res* **2019**, *8*, doi:10.12688/f1000research.14817.1.
25. Tuttlies, F.; Keckstein, J.; Ulrich, U.; Possover, M.; Schweppe, K.W.; Wustlich, M.; Buchweitz, O.; Greb, R.; Kandolf, O.; Mangold, R.; et al. [ENZIAN-score, a classification of deep infiltrating endometriosis]. *Zentralbl Gynakol* **2005**, *127*, 275-281, doi:10.1055/s-2005-836904.
26. Adamson, G.D.; Pasta, D.J. Endometriosis fertility index: the new, validated endometriosis staging system. *Fertil Steril* **2010**, *94*, 1609-1615, doi:10.1016/j.fertnstert.2009.09.035.
27. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad de España. *Atención a las mujeres con endometriosis en el Sistema Nacional de Salud (SNS)*; España, 2013.
28. Young, B.; O'Dowd, G.; Woodford, P. Wheeler Histología Funcional: Texto y atlas en color. 6ª edición ed.; España, E., Ed.; España, 2014; pp. 361-368.
29. Hawkins, S.M.; Matzuk, M.M. The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci* **2008**, *1135*, 10-18, doi:10.1196/annals.1429.018.
30. Sampson, J. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* **1927**, *14*, 422- 424 469, doi:10.1016/S0002-9378(15)30003-X.
31. Sampson, J.A. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *Am J Pathol* **1927**, *3*, 93-110.143.
32. Halme, J.; Hammond, M.G.; Hulka, J.F.; Raj, S.G.; Talbert, L.M. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol* **1984**, *64*, 151-154.
33. O, D.F.; Roskams, T.; Van den Eynde, K.; Vanhie, A.; Peterse, D.P.; Meuleman, C.; Tomassetti, C.; Peeraer, K.; D'Hooghe, T.M.; Fassbender, A. The Presence of Endometrial Cells in Peritoneal Fluid of Women With and Without Endometriosis. *Reprod Sci* **2017**, *24*, 242-251, doi:10.1177/1933719116653677.

34. Koks, C.A.; Dunselman, G.A.; de Goeij, A.F.; Arends, J.W.; Evers, J.L. Evaluation of a menstrual cup to collect shed endometrium for in vitro studies. *Fertil Steril* **1997**, *68*, 560-564, doi:10.1016/s0015-0282(97)00250-1.
35. Rodrigues, M.C.; Lippert, T.; Nguyen, H.; Kaelber, S.; Sanberg, P.R.; Borlongan, C.V. Menstrual Blood-Derived Stem Cells: In Vitro and In Vivo Characterization of Functional Effects. *Adv Exp Med Biol* **2016**, *951*, 111-121, doi:10.1007/978-3-319-45457-3\_9.
36. Witz, C.A.; Allsup, K.T.; Montoya-Rodriguez, I.A.; Vaughn, S.L.; Centonze, V.E.; Schenken, R.S. Culture of menstrual endometrium with peritoneal explants and mesothelial monolayers confirms attachment to intact mesothelial cells. *Hum Reprod* **2002**, *17*, 2832-2838, doi:10.1093/humrep/17.11.2832.
37. Scioscia, M.; Bruni, F.; Ceccaroni, M.; Steinkasserer, M.; Stepniewska, A.; Minelli, L. Distribution of endometriotic lesions in endometriosis stage IV supports the menstrual reflux theory and requires specific preoperative assessment and therapy. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2011**, *90*, 136-139, doi:10.1111/j.1600-0412.2010.01008.x.
38. Martin, J.D.; Hauck, A.E. Endometriosis in the male. *Am Surg* **1985**, *51*, 426-430.
39. Rei, C.; Williams, T.; Feloney, M. Endometriosis in a Man as a Rare Source of Abdominal Pain: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Obstet Gynecol* **2018**, *2018*, 2083121, doi:10.1155/2018/2083121.
40. Scioscia, M.; Pesci, A.; Scardapane, A.; Noventa, M.; Bonaccorsi, G.; Greco, P.; Zamboni, G. Dye diffusion during laparoscopic tubal patency tests may suggest a lymphatic contribution to dissemination in endometriosis: A prospective, observational study. *PLoS One* **2019**, *14*, e0226264, doi:10.1371/journal.pone.0226264.
41. Berbic, M.; Ng, C.H.; Black, K.; Markham, R.; Russell, P.; Basten, A.; Fraser, I.S.; Hey-Cunningham, A.J. A novel pilot study of endometrial stromal cells and immune cell populations in sentinel uterine-draining lymph nodes during the menstrual cycle and in endometriosis. *Reprod Sci* **2013**, *20*, 1339-1348, doi:10.1177/1933719113485298.
42. Konrad, L.; Dietze, R.; Kudipudi, P.K.; Horné, F.; Meinhold-Heerlein, I. Endometriosis in MRKH cases as a proof for the coelomic metaplasia hypothesis? *Reproduction* **2019**, *158*, R41-R47, doi:10.1530/REP-19-0106.
43. Ferrari, S.; Persico, P.; Di Puppo, F.; Garavaglia, E.; Viganò, P.; Candiani, M. An ovarian endometriotic cyst in a patient with prepubertal hypopituitarism due to a craniopharyngioma: a clue for endometrioma pathogenesis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2012**, *164*, 115-116, doi:10.1016/j.ejogrb.2012.05.016.
44. Troncon, J.K.; Zani, A.C.; Vieira, A.D.; Poli-Neto, O.B.; Nogueira, A.A.; Rosa-E-Silva, J.C. Endometriosis in a patient with mayer-rokitansky-küster-hauser syndrome. *Case Rep Obstet Gynecol* **2014**, *2014*, 376231, doi:10.1155/2014/376231.
45. Matsuura, K.; Ohtake, H.; Katabuchi, H.; Okamura, H. Coelomic metaplasia theory of endometriosis: evidence from in vivo studies and an in vitro experimental model. *Gynecol Obstet Invest* **1999**, *47 Suppl 1*, 18-20; discussion 20-12, doi:10.1159/000052855.
46. Pitot, M.A.; Bookwalter, C.A.; Dudiak, K.M. Müllerian duct anomalies coincident with endometriosis: a review. *Abdom Radiol (NY)* **2020**, *45*, 1723-1740, doi:10.1007/s00261-020-02465-y.
47. Fukunaga, M. Paratesticular endometriosis in a man with a prolonged hormonal therapy for prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract* **2012**, *208*, 59-61, doi:10.1016/j.prp.2011.10.007.
48. Pinkert, T.C.; Catlow, C.E.; Straus, R. Endometriosis of the urinary bladder in a man with prostatic carcinoma. *Cancer* **1979**, *43*, 1562-1567, doi:10.1002/1097-0142(197904)43:4<1562::aid-cnrc2820430451>3.0.co;2-w.

49. Signorile, P.G.; Baldi, F.; Bussani, R.; Viceconte, R.; Bulzomi, P.; D'Armiento, M.; D'Avino, A.; Baldi, A. Embryologic origin of endometriosis: analysis of 101 human female fetuses. *J Cell Physiol* **2012**, *227*, 1653-1656, doi:10.1002/jcp.22888.
50. Cousins, F.L.; O, D.F.; Gargett, C.E. Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2018**, *50*, 27-38, doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.01.011.
51. Leyendecker, G.; Herbertz, M.; Kunz, G.; Mall, G. Endometriosis results from the dislocation of basal endometrium. *Hum Reprod* **2002**, *17*, 2725-2736, doi:10.1093/humrep/17.10.2725.
52. Brosens, I.; Gargett, C.; Gordts, S.; Brosens, J.; Benagiano, G. Neonatal menstruation explains epidemiological links between fetomaternal conditions and adolescent endometriosis. **2015**, *7*, 51-55, doi:10.5301/je.5000218.
53. Parazzini, F.; Esposito, G.; Tozzi, L.; Noli, S.; Bianchi, S. Epidemiology of endometriosis and its comorbidities. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2017**, *209*, 3-7, doi:10.1016/j.ejogrb.2016.04.021.
54. Viganò, P.; Parazzini, F.; Somigliana, E.; Vercellini, P. Endometriosis: epidemiology and aetiological factors. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2004**, *18*, 177-200, doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.01.007.
55. Hansen, K.A.; Eyster, K.M. Genetics and genomics of endometriosis. *Clin Obstet Gynecol* **2010**, *53*, 403-412, doi:10.1097/GRF.0b013e3181db7ca1.
56. Simpson, J.L.; Elias, S.; Malinak, L.R.; Buttram, V.C. Heritable aspects of endometriosis. I. Genetic studies. *Am J Obstet Gynecol* **1980**, *137*, 327-331, doi:10.1016/0002-9378(80)90917-5.
57. Treloar, S.A.; O'Connor, D.T.; O'Connor, V.M.; Martin, N.G. Genetic influences on endometriosis in an Australian twin sample. *Fertil Steril* **1999**, *71*, 701-710, doi:10.1016/s0015-0282(98)00540-8.
58. Vassilopoulou, L.; Matalliotakis, M.; Zervou, M.I.; Matalliotaki, C.; Krithinakis, K.; Matalliotakis, I.; Spandidos, D.A.; Goulielmos, G.N. Defining the genetic profile of endometriosis. *Exp Ther Med* **2019**, *17*, 3267-3281, doi:10.3892/etm.2019.7346.
59. Simpson, J.L.; Bischoff, F. Heritability and candidate genes for endometriosis. *Reprod Biomed Online* **2003**, *7*, 162-169, doi:10.1016/s1472-6483(10)61746-4.
60. Treloar, S.A.; Wicks, J.; Nyholt, D.R.; Montgomery, G.W.; Bahlo, M.; Smith, V.; Dawson, G.; Mackay, I.J.; Weeks, D.E.; Bennett, S.T.; et al. Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet* **2005**, *77*, 365-376, doi:10.1086/432960.
61. Zondervan, K.T.; Treloar, S.A.; Lin, J.; Weeks, D.E.; Nyholt, D.R.; Mangion, J.; MacKay, I.J.; Cardon, L.R.; Martin, N.G.; Kennedy, S.H.; et al. Significant evidence of one or more susceptibility loci for endometriosis with near-Mendelian inheritance on chromosome 7p13-15. *Hum Reprod* **2007**, *22*, 717-728, doi:10.1093/humrep/del446.
62. Painter, J.N.; Nyholt, D.R.; Morris, A.; Zhao, Z.Z.; Henders, A.K.; Lambert, A.; Wallace, L.; Martin, N.G.; Kennedy, S.H.; Treloar, S.A.; et al. High-density fine-mapping of a chromosome 10q26 linkage peak suggests association between endometriosis and variants close to CYP2C19. *Fertil Steril* **2011**, *95*, 2236-2240, doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.062.
63. Anglesio, M.S.; Papadopoulos, N.; Ayhan, A.; Nazeran, T.M.; Noë, M.; Horlings, H.M.; Lum, A.; Jones, S.; Senz, J.; Seckin, T.; et al. Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med* **2017**, *376*, 1835-1848, doi:10.1056/NEJMoa1614814.
64. Zubrzycka, A.; Zubrzycki, M.; Perdas, E.; Zubrzycka, M. Genetic, Epigenetic, and Steroidogenic Modulation Mechanisms in Endometriosis. *J Clin Med* **2020**, *9*, doi:10.3390/jcm9051309.

65. Giampaolino, P.; Della Corte, L.; Foreste, V.; Barra, F.; Ferrero, S.; Bifulco, G. Dioxin and endometriosis: a new possible relation based on epigenetic theory. *Gynecol Endocrinol* **2020**, *36*, 279-284, doi:10.1080/09513590.2019.1698024.
66. Smarr, M.M.; Kannan, K.; Buck Louis, G.M. Endocrine disrupting chemicals and endometriosis. *Fertil Steril* **2016**, *106*, 959-966, doi:10.1016/j.fertnstert.2016.06.034.
67. Yao, M.; Hu, T.; Wang, Y.; Du, Y.; Hu, C.; Wu, R. Polychlorinated biphenyls and its potential role in endometriosis. *Environ Pollut* **2017**, *229*, 837-845, doi:10.1016/j.envpol.2017.06.088.
68. Rier, S.E.; Martin, D.C.; Bowman, R.E.; Dmowski, W.P.; Becker, J.L. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* **1993**, *21*, 433-441, doi:10.1006/faat.1993.1119.
69. Marquardt, R.M.; Kim, T.H.; Shin, J.H.; Jeong, J.W. Progesterone and Estrogen Signaling in the Endometrium: What Goes Wrong in Endometriosis? *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20153822.
70. Han, S.J.; Jung, S.Y.; Wu, S.P.; Hawkins, S.M.; Park, M.J.; Kyo, S.; Qin, J.; Lydon, J.P.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J.; et al. Estrogen Receptor  $\beta$  Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. *Cell* **2015**, *163*, 960-974, doi:10.1016/j.cell.2015.10.034.
71. Bulun, S.E.; Monsavais, D.; Pavone, M.E.; Dyson, M.; Xue, Q.; Attar, E.; Tokunaga, H.; Su, E.J. Role of estrogen receptor- $\beta$  in endometriosis. *Semin Reprod Med* **2012**, *30*, 39-45, doi:10.1055/s-0031-1299596.
72. Hood, B.L.; Liu, B.; Alkhas, A.; Shoji, Y.; Challa, R.; Wang, G.; Ferguson, S.; Oliver, J.; Mitchell, D.; Bateman, N.W.; et al. Proteomics of the human endometrial glandular epithelium and stroma from the proliferative and secretory phases of the menstrual cycle. *Biol Reprod* **2015**, *92*, 106, doi:10.1095/biolreprod.114.127217.
73. Patel, B.; Elguero, S.; Thakore, S.; Dahoud, W.; Bedaiwy, M.; Mesiano, S. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum Reprod Update* **2015**, *21*, 155-173, doi:10.1093/humupd/dmu056.
74. Attia, G.R.; Zeitoun, K.; Edwards, D.; Johns, A.; Carr, B.R.; Bulun, S.E. Progesterone receptor isoform A but not B is expressed in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, *85*, 2897-2902, doi:10.1210/jcem.85.8.6739.
75. Bulun, S.E.; Cheng, Y.H.; Pavone, M.E.; Yin, P.; Imir, G.; Utsunomiya, H.; Thung, S.; Xue, Q.; Marsh, E.E.; Tokunaga, H.; et al. 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 deficiency and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med* **2010**, *28*, 44-50, doi:10.1055/s-0029-1242992.
76. Berbic, M.; Schulke, L.; Markham, R.; Tokushige, N.; Russell, P.; Fraser, I.S. Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod* **2009**, *24*, 325-332, doi:10.1093/humrep/den393.
77. Kyama, C.M.; Overbergh, L.; Mihalyi, A.; Meuleman, C.; Mwenda, J.M.; Mathieu, C.; D'Hooghe, T.M. Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis. *Fertil Steril* **2008**, *89*, 301-310, doi:10.1016/j.fertnstert.2007.02.057.
78. Matsuzaki, S.; Maleysson, E.; Darcha, C. Analysis of matrix metalloproteinase-7 expression in eutopic and ectopic endometrium samples from patients with different forms of endometriosis. *Hum Reprod* **2010**, *25*, 742-750, doi:10.1093/humrep/dep435.
79. Taniguchi, F.; Kaponis, A.; Izawa, M.; Kiyama, T.; Deura, I.; Ito, M.; Iwabe, T.; Adonakis, G.; Terakawa, N.; Harada, T. Apoptosis and endometriosis. *Front Biosci (Elite Ed)* **2011**, *3*, 648-662, doi:10.2741/e277.
80. Takebayashi, A.; Kimura, F.; Kishi, Y.; Ishida, M.; Takahashi, A.; Yamanaka, A.; Wu, D.; Zheng, L.; Takahashi, K.; Suginami, H.; et al. Subpopulations of macrophages within

- eutopic endometrium of endometriosis patients. *Am J Reprod Immunol* **2015**, *73*, 221-231, doi:10.1111/aji.12331.
81. Mor, G.; Cardenas, I.; Abrahams, V.; Guller, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci* **2011**, *1221*, 80-87, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05938.x.
  82. Laganà, A.S.; Salmeri, F.M.; Ban Frangež, H.; Ghezzi, F.; Vrtačnik-Bokal, E.; Granese, R. Evaluation of M1 and M2 macrophages in ovarian endometriomas from women affected by endometriosis at different stages of the disease. *Gynecol Endocrinol* **2020**, *36*, 441-444, doi:10.1080/09513590.2019.1683821.
  83. Bacci, M.; Capobianco, A.; Monno, A.; Cottone, L.; Di Puppo, F.; Camisa, B.; Mariani, M.; Brignole, C.; Ponzoni, M.; Ferrari, S.; et al. Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol* **2009**, *175*, 547-556, doi:10.2353/ajpath.2009.081011.
  84. Xie, Q.; He, H.; Wu, Y.H.; Zou, L.J.; She, X.L.; Xia, X.M.; Wu, X.Q. Eutopic endometrium from patients with endometriosis modulates the expression of CD36 and SIRP- $\alpha$  in peritoneal macrophages. *J Obstet Gynaecol Res* **2019**, *45*, 1045-1057, doi:10.1111/jog.13938.
  85. Liu, Y.Y.; Liu, Y.K.; Hu, W.T.; Tang, L.L.; Sheng, Y.R.; Wei, C.Y.; Li, M.Q.; Zhu, X.Y. Elevated heme impairs macrophage phagocytosis in endometriosis. *Reproduction* **2019**, *158*, 257-266, doi:10.1530/REP-19-0028.
  86. Beste, M.T.; Pfäffle-Doyle, N.; Prentice, E.A.; Morris, S.N.; Lauffenburger, D.A.; Isaacson, K.B.; Griffith, L.G. Molecular network analysis of endometriosis reveals a role for c-Jun-regulated macrophage activation. *Sci Transl Med* **2014**, *6*, 222ra216, doi:10.1126/scitranslmed.3007988.
  87. Morotti, M.; Vincent, K.; Brawn, J.; Zondervan, K.T.; Becker, C.M. Peripheral changes in endometriosis-associated pain. *Hum Reprod Update* **2014**, *20*, 717-736, doi:10.1093/humupd/dmu021.
  88. Collin, M.; Bigley, V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* **2018**, *154*, 3-20, doi:10.1111/imm.12888.
  89. Schulke, L.; Berbic, M.; Manconi, F.; Tokushige, N.; Markham, R.; Fraser, I.S. Dendritic cell populations in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* **2009**, *24*, 1695-1703, doi:10.1093/humrep/dep071.
  90. Maridas, D.E.; Hey-Cunningham, A.J.; Ng, C.H.M.; Markham, R.; Fraser, I.S.; Berbic, M. Peripheral and endometrial dendritic cell populations during the normal cycle and in the presence of endometriosis. *J Endometr Pelvic Pain Disord* **2014**, *6*, 67-119, doi:10.5301/je.5000180.
  91. Schulke, L.; Manconi, F.; Markham, R.; Fraser, I.S. Endometrial dendritic cell populations during the normal menstrual cycle. *Hum Reprod* **2008**, *23*, 1574-1580, doi:10.1093/humrep/den030.
  92. Flynn, L.; Byrne, B.; Carton, J.; Kelehan, P.; O'Herlihy, C.; O'Farrelly, C. Menstrual cycle dependent fluctuations in NK and T-lymphocyte subsets from non-pregnant human endometrium. *Am J Reprod Immunol* **2000**, *43*, 209-217, doi:10.1111/j.8755-8920.2000.430405.x.
  93. Junovich, G.; Azpiroz, A.; Incera, E.; Ferrer, C.; Pasqualini, A.; Gutierrez, G. Endometrial CD16(+) and CD16(-) NK cell count in fertility and unexplained infertility. *Am J Reprod Immunol* **2013**, *70*, 182-189, doi:10.1111/aji.12132.
  94. Guerrero, B.; Hassouneh, F.; Delgado, E.; Casado, J.G.; Tarazona, R. Natural killer cells in recurrent miscarriage: An overview. *J Reprod Immunol* **2020**, *142*, 103209, doi:10.1016/j.jri.2020.103209.



95. Mselle, T.F.; Meadows, S.K.; Eriksson, M.; Smith, J.M.; Shen, L.; Wira, C.R.; Sentman, C.L. Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract. *Clin Immunol* **2007**, *124*, 69-76, doi:10.1016/j.clim.2007.04.008.
96. Giuliani, E.; Parkin, K.L.; Lessey, B.A.; Young, S.L.; Fazleabas, A.T. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **2014**, *72*, 262-269, doi:10.1111/aji.12259.
97. Kikuchi, Y.; Ishikawa, N.; Hirata, J.; Imaizumi, E.; Sasa, H.; Nagata, I. Changes of peripheral blood lymphocyte subsets before and after operation of patients with endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* **1993**, *72*, 157-161, doi:10.3109/00016349309013364.
98. Thiruchelvam, U.; Wingfield, M.; O'Farrelly, C. Natural Killer Cells: Key Players in Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **2015**, *74*, 291-301, doi:10.1111/aji.12408.
99. Vallvé-Juanico, J.; Houshdaran, S.; Giudice, L.C. The endometrial immune environment of women with endometriosis. *Hum Reprod Update* **2019**, *25*, 564-591, doi:10.1093/humupd/dmz018.
100. Szylo, K.; Tchorzewski, H.; Banasik, M.; Glowacka, E.; Lewkowicz, P.; Kamer-Bartosinska, A. The involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of endometriotic tissues overgrowth in women with endometriosis. *Mediators Inflamm* **2003**, *12*, 131-138, doi:10.1080/0962935031000134842.
101. Witz, C.A.; Montoya, I.A.; Dey, T.D.; Schenken, R.S. Characterization of lymphocyte subpopulations and T cell activation in endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **1994**, *32*, 173-179, doi:10.1111/j.1600-0897.1994.tb01110.x.
102. Slabe, N.; Meden-Vrtovec, H.; Verdenik, I.; Kosir-Pogacnik, R.; Ihan, A. Cytotoxic T-Cells in Peripheral Blood in Women with Endometriosis. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **2013**, *73*, 1042-1048, doi:10.1055/s-0033-1350702.
103. Romagnani, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* **2000**, *85*, 9-18; quiz 18, 21, doi:10.1016/S1081-1206(10)62426-X.
104. Guéry, L.; Hugues, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 314620, doi:10.1155/2015/314620.
105. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **2008**, *133*, 775-787, doi:10.1016/j.cell.2008.05.009.
106. Saito, S.; Tsukaguchi, N.; Hasegawa, T.; Michimata, T.; Tsuda, H.; Narita, N. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am J Reprod Immunol* **1999**, *42*, 240-245, doi:10.1111/j.1600-0897.1999.tb00097.x.
107. Takamura, M.; Koga, K.; Izumi, G.; Hirata, T.; Harada, M.; Hirota, Y.; Hiraike, O.; Fujii, T.; Osuga, Y. Simultaneous Detection and Evaluation of Four Subsets of CD4+ T Lymphocyte in Lesions and Peripheral Blood in Endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **2015**, *74*, 480-486, doi:10.1111/aji.12426.
108. Podgaec, S.; Abrao, M.S.; Dias, J.A.; Rizzo, L.V.; de Oliveira, R.M.; Baracat, E.C. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. *Hum Reprod* **2007**, *22*, 1373-1379, doi:10.1093/humrep/del516.
109. Mack, M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol* **2018**, *68-69*, 106-121, doi:10.1016/j.matbio.2017.11.010.
110. Izumi, G.; Koga, K.; Takamura, M.; Makabe, T.; Satake, E.; Takeuchi, A.; Taguchi, A.; Urata, Y.; Fujii, T.; Osuga, Y. Involvement of immune cells in the pathogenesis of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* **2018**, *44*, 191-198, doi:10.1111/jog.13559.
111. Gogacz, M.; Winkler, I.; Bojarska-Junak, A.; Tabarkiewicz, J.; Semczuk, A.; Rechberger, T.; Adamiak, A. Increased percentage of Th17 cells in peritoneal fluid is associated with severity of endometriosis. *J Reprod Immunol* **2016**, *117*, 39-44, doi:10.1016/j.jri.2016.04.289.



112. Hirata, T.; Osuga, Y.; Takamura, M.; Kodama, A.; Hirota, Y.; Koga, K.; Yoshino, O.; Harada, M.; Takemura, Y.; Yano, T.; et al. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells. *Endocrinology* **2010**, *151*, 5468-5476, doi:10.1210/en.2010-0398.
113. Zhang, X.; Xu, H.; Lin, J.; Qian, Y.; Deng, L. Peritoneal fluid concentrations of interleukin-17 correlate with the severity of endometriosis and infertility of this disorder. *BIOG* **2005**, *112*, 1153-1155, doi:10.1111/j.1471-0528.2005.00639.x.
114. Osuga, Y.; Hirota, Y.; Hirata, T.; Takamura, M.; Urata, Y.; Harada, M.; Izumi, G.; Fujii, T.; Koga, K. Th2 Cells and Th17 Cells in the Development of Endometriosis – Possible Roles of Interleukin-4 and Interleukin-17A. **2016**, *8*, 136-140.
115. Chang, K.K.; Liu, L.B.; Jin, L.P.; Zhang, B.; Mei, J.; Li, H.; Wei, C.Y.; Zhou, W.J.; Zhu, X.Y.; Shao, J.; et al. IL-27 triggers IL-10 production in Th17 cells via a c-Maf/RORyt/Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis. *Cell Death Dis* **2017**, *8*, e2666, doi:10.1038/cddis.2017.95.
116. Arruvito, L.; Sanz, M.; Banham, A.H.; Fainboim, L. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol* **2007**, *178*, 2572-2578, doi:10.4049/jimmunol.178.4.2572.
117. de Barros, I.B.L.; Malvezzi, H.; Gueuvoghlian-Silva, B.Y.; Piccinato, C.A.; Rizzo, L.V.; Podgaec, S. "What do we know about regulatory T cells and endometriosis? A systematic review". *J Reprod Immunol* **2017**, *120*, 48-55, doi:10.1016/j.jri.2017.04.003.
118. Tanaka, Y.; Mori, T.; Ito, F.; Koshiba, A.; Takaoka, O.; Kataoka, H.; Maeda, E.; Okimura, H.; Kitawaki, J. Exacerbation of Endometriosis Due To Regulatory T-Cell Dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* **2017**, *102*, 3206-3217, doi:10.1210/jc.2017-00052.
119. Olkowska-Truchanowicz, J.; Bocian, K.; Maksym, R.B.; Białoszewska, A.; Włodarczyk, D.; Baranowski, W.; Ząbek, J.; Korczak-Kowalska, G.; Malejczyk, J. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in peripheral blood and peritoneal fluid of patients with endometriosis. *Hum Reprod* **2013**, *28*, 119-124, doi:10.1093/humrep/des346.
120. Podgaec, S.; Barbeiro, D.F.; Gueuvoghlian-Silva, B.Y.; Bellelis, P.; Abrão, M.S.; Baracat, E.C. Foxp3 expression in deep rectosigmoid endometriosis lesions and its association with chronic pelvic pain. *J Reprod Immunol* **2014**, *104-105*, 96-99, doi:10.1016/j.jri.2014.05.002.
121. Rigoni, A.; Colombo, M.P.; Pucillo, C. Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer. *Semin Immunol* **2018**, *35*, 29-34, doi:10.1016/j.smim.2018.02.001.
122. Sugamata, M.; Ihara, T.; Uchiide, I. Increase of activated mast cells in human endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **2005**, *53*, 120-125, doi:10.1111/j.1600-0897.2005.00254.x.
123. Eisenberg, V.H.; Zolti, M.; Soriano, D. Is there an association between autoimmunity and endometriosis? *Autoimmun Rev* **2012**, *11*, 806-814, doi:10.1016/j.autrev.2012.01.005.
124. Zhang, T.; De Carolis, C.; Man, G.C.W.; Wang, C.C. The link between immunity, autoimmunity and endometriosis: a literature update. *Autoimmun Rev* **2018**, *17*, 945-955, doi:10.1016/j.autrev.2018.03.017.
125. Lebovic, D.I.; Bentzien, F.; Chao, V.A.; Garrett, E.N.; Meng, Y.G.; Taylor, R.N. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. *Mol Hum Reprod* **2000**, *6*, 269-275, doi:10.1093/molehr/6.3.269.
126. Machairiotis, N.; Vasilakaki, S.; Thomakos, N. Inflammatory Mediators and Pain in Endometriosis: A Systematic Review. *Biomedicines* **2021**, *9*, doi:10.3390/biomedicines9010054.
127. Walling, B.L.; Kim, M. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Front Immunol* **2018**, *9*, 952, doi:10.3389/fimmu.2018.00952.

128. Fukaya, T.; Sugawara, J.; Yoshida, H.; Murakami, T.; Yajima, A. Intercellular adhesion molecule-1 and hepatocyte growth factor in human endometriosis: original investigation and a review of literature. *Gynecol Obstet Invest* **1999**, *47 Suppl 1*, 11-16; discussion 16-17, doi:10.1159/000052854.
129. Zhou, W.J.; Yang, H.L.; Shao, J.; Mei, J.; Chang, K.K.; Zhu, R.; Li, M.Q. Anti-inflammatory cytokines in endometriosis. *Cell Mol Life Sci* **2019**, *76*, 2111-2132, doi:10.1007/s00018-019-03056-x.
130. Grandi, G.; Barra, F.; Ferrero, S.; Sileo, F.G.; Bertucci, E.; Napolitano, A.; Facchinetti, F. Hormonal contraception in women with endometriosis: a systematic review. *Eur J Contracept Reprod Health Care* **2019**, *24*, 61-70, doi:10.1080/13625187.2018.1550576.
131. Triano-Sánchez, R.; de Prado-Prieto, L. [Update on the use of oral contraceptives in the treatment of endometriosis]. *Semergen* **2012**, *38*, 95-101.
132. Casper, R.F. Progestin-only pills may be a better first-line treatment for endometriosis than combined estrogen-progestin contraceptive pills. *Fertil Steril* **2017**, *107*, 533-536, doi:10.1016/j.fertnstert.2017.01.003.
133. Brown, J.; Crawford, T.J.; Allen, C.; Hopewell, S.; Prentice, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* **2017**, *1*, Cd004753, doi:10.1002/14651858.CD004753.pub4.
134. Ferrero, S.; Evangelisti, G.; Barra, F. Current and emerging treatment options for endometriosis. *Expert Opin Pharmacother* **2018**, *19*, 1109-1125, doi:10.1080/14656566.2018.1494154.
135. Patel, B.G.; Rudnicki, M.; Yu, J.; Shu, Y.; Taylor, R.N. Progesterone resistance in endometriosis: origins, consequences and interventions. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2017**, *96*, 623-632, doi:10.1111/aogs.13156.
136. Brown, J.; Pan, A.; Hart, R.J. Gonadotrophin-releasing hormone analogues for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* **2010**, CD008475, doi:10.1002/14651858.CD008475.pub2.
137. Strowitzki, T.; Marr, J.; Gerlinger, C.; Faustmann, T.; Seitz, C. Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicentre, open-label trial. *Hum Reprod* **2010**, *25*, 633-641, doi:10.1093/humrep/dep469.
138. Petta, C.A.; Ferriani, R.A.; Abrao, M.S.; Hassan, D.; Rosa E Silva, J.C.; Podgaec, S.; Bahamondes, L. Randomized clinical trial of a levonorgestrel-releasing intrauterine system and a depot GnRH analogue for the treatment of chronic pelvic pain in women with endometriosis. *Hum Reprod* **2005**, *20*, 1993-1998, doi:10.1093/humrep/deh869.
139. Bayoglu Tekin, Y.; Dilbaz, B.; Altinbas, S.K.; Dilbaz, S. Postoperative medical treatment of chronic pelvic pain related to severe endometriosis: levonorgestrel-releasing intrauterine system versus gonadotropin-releasing hormone analogue. *Fertil Steril* **2011**, *95*, 492-496, doi:10.1016/j.fertnstert.2010.08.042.
140. Vercellini, P.; Trespidi, L.; Colombo, A.; Vendola, N.; Marchini, M.; Crosignani, P.G. A gonadotropin-releasing hormone agonist versus a low-dose oral contraceptive for pelvic pain associated with endometriosis. *Fertil Steril* **1993**, *60*, 75-79.
141. Selak, V.; Farquhar, C.; Prentice, A.; Singla, A. Danazol for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* **2001**, CD000068, doi:10.1002/14651858.CD000068.
142. Kho, R.M.; Andres, M.P.; Borrelli, G.M.; Neto, J.S.; Zanluchi, A.; Abrão, M.S. Surgical treatment of different types of endometriosis: Comparison of major society guidelines and preferred clinical algorithms. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2018**, *51*, 102-110, doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.01.020.

143. Opøien, H.K.; Fedorcsak, P.; Byholm, T.; Tanbo, T. Complete surgical removal of minimal and mild endometriosis improves outcome of subsequent IVF/ICSI treatment. *Reprod Biomed Online* **2011**, *23*, 389-395, doi:10.1016/j.rbmo.2011.06.002.
144. Hart, R.J.; Hickey, M.; Maouris, P.; Buckett, W. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Syst Rev* **2008**, CD004992, doi:10.1002/14651858.CD004992.pub3.
145. Biacchiardi, C.P.; Piane, L.D.; Camanni, M.; Deltetto, F.; Delpiano, E.M.; Marchino, G.L.; Gennarelli, G.; Revelli, A. Laparoscopic stripping of endometriomas negatively affects ovarian follicular reserve even if performed by experienced surgeons. *Reprod Biomed Online* **2011**, *23*, 740-746, doi:10.1016/j.rbmo.2011.07.014.
146. Cohen, A.; Almog, B.; Tulandi, T. Sclerotherapy in the management of ovarian endometrioma: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* **2017**, *108*, 117-124.e115, doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.015.
147. Burnstock, G. The therapeutic potential of purinergic signalling. *Biochem Pharmacol* **2018**, *151*, 157-165, doi:10.1016/j.bcp.2017.07.016.
148. Jacobson, K.A.; Giancotti, L.A.; Lauro, F.; Mufti, F.; Salvemini, D. Treatment of chronic neuropathic pain: purine receptor modulation. *Pain* **2020**, *161*, 1425-1441, doi:10.1097/j.pain.0000000000001857.
149. Burnstock, G. Purinergic Mechanisms and Pain. *Adv Pharmacol* **2016**, *75*, 91-137, doi:10.1016/bs.apha.2015.09.001.
150. Khakh, B.S.; Burnstock, G. The double life of ATP. *Sci Am* **2009**, *301*, 84-90, 92, doi:10.1038/scientificamerican1209-84.
151. Holton, F.A.; Holton, P. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol* **1954**, *126*, 124-140, doi:10.1113/jphysiol.1954.sp005198.
152. Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **1972**, *24*, 509-581.
153. Yegutkin, G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2014**, *49*, 473-497, doi:10.3109/10409238.2014.953627.
154. Plattner, H.; Verkhatsky, A. Inseparable tandem: evolution chooses ATP and Ca<sup>2+</sup> to control life, death and cellular signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2016**, *371*, doi:10.1098/rstb.2015.0419.
155. Faas, M.M.; Saez, T.; de Vos, P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Mol Aspects Med* **2017**, *55*, 9-19, doi:10.1016/j.mam.2017.01.002.
156. Yegutkin, G.G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1783*, 673-694, doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.024.
157. Giuliani, A.L.; Sarti, A.C.; Di Virgilio, F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol Lett* **2019**, *205*, 16-24, doi:10.1016/j.imlet.2018.11.006.
158. Burnstock, G.; Verkhatsky, A. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* **2010**, *1*, e9, doi:10.1038/cddis.2009.11.
159. Burnstock, G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2016**, *371*, doi:10.1098/rstb.2015.0422.
160. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **1998**, *50*, 413-492.
161. Sawynok, J. Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience* **2016**, *338*, 1-18, doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.031.
162. Chandrasekaran, B.; Samarneh, S.; Jaber, A.M.Y.; Kassab, G.; Agrawal, N. Therapeutic Potentials of A2B Adenosine Receptor Ligands: Current Status and Perspectives. *Curr Pharm Des* **2019**, *25*, 2741-2771, doi:10.2174/1381612825666190717105834.

163. Schulte, G.; Fredholm, B.B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* **2003**, *15*, 813-827, doi:10.1016/s0898-6568(03)00058-5.
164. Zimmermann, H.; Zebisch, M.; Strater, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* **2012**, *8*, 437-502, doi:10.1007/s11302-012-9309-4.
165. Martín-Satué, M.; Rodríguez-Martínez, A.; Trapero, C. In Situ Identification of Ectoenzymes Involved in the Hydrolysis of Extracellular Nucleotides. In *Immunohistochemistry*; IntechOpen: 2019.
166. Trapero, C.; Martín-Satué, M. Purinergic Signaling in Endometriosis-Associated Pain. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21228512.
167. Burnstock, G. Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. *Purinergic Signal* **2014**, *10*, 157-187, doi:10.1007/s11302-013-9399-7.
168. Burnstock, G.; Dale, N. Purinergic signalling during development and ageing. *Purinergic Signal* **2015**, *11*, 277-305, doi:10.1007/s11302-015-9452-9.
169. Antonioli, L.; Pacher, P.; Vizi, E.S.; Haskó, G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* **2013**, *19*, 355-367, doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005.
170. Di Virgilio, F.; Sarti, A.C.; Coutinho-Silva, R. Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol* **2020**, *318*, C832-C835, doi:10.1152/ajpcell.00053.2020.
171. Lu, D.; Insel, P.A. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **2014**, *306*, C779-788, doi:10.1152/ajpcell.00381.2013.
172. Burnstock, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res* **2017**, *120*, 207-228, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309726.
173. Di Virgilio, F. P2X receptors and inflammation. *Curr Med Chem* **2015**, *22*, 866-877, doi:10.2174/0929867322666141210155311.
174. Di Virgilio, F.; Dal Ben, D.; Sarti, A.C.; Giuliani, A.L.; Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* **2017**, *47*, 15-31, doi:10.1016/j.immuni.2017.06.020.
175. Rivas-Yáñez, E.; Barrera-Avalos, C.; Parra-Tello, B.; Briceño, P.; Roseblatt, M.V.; Saavedra-Almarza, J.; Roseblatt, M.; Acuña-Castillo, C.; Bono, M.R.; Sauma, D. P2X7 Receptor at the Crossroads of T Cell Fate. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21144937.
176. Yu, Y.; Feng, S.; Wei, S.; Zhong, Y.; Yi, G.; Chen, H.; Liang, L.; Lu, X. Extracellular ATP activates P2X7R-NF- $\kappa$ B (p65) pathway to promote the maturation of bone marrow-derived dendritic cells of mice. *Cytokine* **2019**, *119*, 175-181, doi:10.1016/j.cyto.2019.03.019.
177. Myrtek, D.; Idzko, M. Chemotactic activity of extracellular nucleotides on human immune cells. *Purinergic Signal* **2007**, *3*, 5-11, doi:10.1007/s11302-006-9032-0.
178. Ledderose, C.; Liu, K.; Kondo, Y.; Slubowski, C.J.; Dertnig, T.; Denicoló, S.; Arbab, M.; Hubner, J.; Konrad, K.; Fakhari, M.; et al. Purinergic P2X4 receptors and mitochondrial ATP production regulate T cell migration. *J Clin Invest* **2018**, *128*, 3583-3594, doi:10.1172/JCI120972.
179. Woehrle, T.; Yip, L.; Elkhali, A.; Sumi, Y.; Chen, Y.; Yao, Y.; Insel, P.A.; Junger, W.G. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. *Blood* **2010**, *116*, 3475-3484, doi:10.1182/blood-2010-04-277707.
180. Yip, L.; Woehrle, T.; Corriden, R.; Hirsh, M.; Chen, Y.; Inoue, Y.; Ferrari, V.; Insel, P.A.; Junger, W.G. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* **2009**, *23*, 1685-1693, doi:10.1096/fj.08-126458.

181. Haschemi, A.; Wagner, O.; Marculescu, R.; Wegiel, B.; Robson, S.C.; Gagliani, N.; Gallo, D.; Chen, J.F.; Bach, F.H.; Otterbein, L.E. Cross-regulation of carbon monoxide and the adenosine A2a receptor in macrophages. *J Immunol* **2007**, *178*, 5921-5929, doi:10.4049/jimmunol.178.9.5921.
182. Cohen, H.B.; Ward, A.; Hamidzadeh, K.; Ravid, K.; Mosser, D.M. IFN- $\gamma$  Prevents Adenosine Receptor (A2bR) Upregulation To Sustain the Macrophage Activation Response. *J Immunol* **2015**, *195*, 3828-3837, doi:10.4049/jimmunol.1501139.
183. Haskó, G.; Pacher, P.; Deitch, E.A.; Vizi, E.S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol Ther* **2007**, *113*, 264-275, doi:10.1016/j.pharmthera.2006.08.003.
184. Csóka, B.; Selmeczy, Z.; Koscsó, B.; Németh, Z.H.; Pacher, P.; Murray, P.J.; Kepka-Lenhart, D.; Morris, S.M.; Gause, W.C.; Leibovich, S.J.; et al. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J* **2012**, *26*, 376-386, doi:10.1096/fj.11-190934.
185. Schnurr, M.; Toy, T.; Shin, A.; Hartmann, G.; Rothenfusser, S.; Soellner, J.; Davis, I.D.; Cebon, J.; Maraskovsky, E. Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **2004**, *103*, 1391-1397, doi:10.1182/blood-2003-06-1959.
186. Novitskiy, S.V.; Ryzhov, S.; Zaynagetdinov, R.; Goldstein, A.E.; Huang, Y.; Tikhomirov, O.Y.; Blackburn, M.R.; Biaggioni, I.; Carbone, D.P.; Feoktistov, I.; et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* **2008**, *112*, 1822-1831, doi:10.1182/blood-2008-02-136325.
187. Rudich, N.; Ravid, K.; Sagi-Eisenberg, R. Mast cell adenosine receptors function: a focus on the a3 adenosine receptor and inflammation. *Front Immunol* **2012**, *3*, 134, doi:10.3389/fimmu.2012.00134.
188. Antonioli, L.; Fornai, M.; Blandizzi, C.; Pacher, P.; Haskó, G. Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. *Immunol Lett* **2019**, *205*, 9-15, doi:10.1016/j.imlet.2018.04.006.
189. Sevigny, C.P.; Li, L.; Awad, A.S.; Huang, L.; McDuffie, M.; Linden, J.; Lobo, P.I.; Okusa, M.D. Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J Immunol* **2007**, *178*, 4240-4249, doi:10.4049/jimmunol.178.7.4240.
190. Romio, M.; Reinbeck, B.; Bongardt, S.; Hüls, S.; Burghoff, S.; Schrader, J. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **2011**, *301*, C530-539, doi:10.1152/ajpcell.00385.2010.
191. Kurashima, Y.; Kiyono, H.; Kunisawa, J. Pathophysiological role of extracellular purinergic mediators in the control of intestinal inflammation. *Mediators Inflamm* **2015**, *2015*, 427125, doi:10.1155/2015/427125.
192. Aliagas, E.; Vidal, A.; Texido, L.; Ponce, J.; Condom, E.; Martin-Satue, M. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators Inflamm* **2014**, *2014*, 509027, doi:10.1155/2014/509027.
193. foundation, K.A.W. The Human Protein Atlas. Available online: <https://www.proteinatlas.org/> (accessed on 28 d'Abril).
194. Gargett, C.E.; Schwab, K.E.; Deane, J.A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod Update* **2016**, *22*, 137-163, doi:10.1093/humupd/dmv051.
195. Semenova, S.; Shatrova, A.; Vassilieva, I.; Shamatova, M.; Pugovkina, N.; Negulyaev, Y. Adenosine-5'-triphosphate suppresses proliferation and migration capacity of human endometrial stem cells. *J Cell Mol Med* **2020**, *24*, 4580-4588, doi:10.1111/jcmm.15115.
196. Aliagas, E.; Vidal, A.; Torrejon-Escribano, B.; Taco Mdel, R.; Ponce, J.; de Aranda, I.G.; Sevigny, J.; Condom, E.; Martin-Satue, M. Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal* **2013**, *9*, 227-237, doi:10.1007/s11302-012-9345-0.



197. Ding, S.; Zhu, L.; Tian, Y.; Zhu, T.; Huang, X.; Zhang, X. P2X3 receptor involvement in endometriosis pain via ERK signaling pathway. *PLoS One* **2017**, *12*, e0184647, doi:10.1371/journal.pone.0184647.
198. Yu, J.; Boicea, A.; Barrett, K.L.; James, C.O.; Bagchi, I.C.; Bagchi, M.K.; Nezhat, C.; Sidell, N.; Taylor, R.N. Reduced connexin 43 in eutopic endometrium and cultured endometrial stromal cells from subjects with endometriosis. *Mol Hum Reprod* **2014**, *20*, 260-270, doi:10.1093/molehr/gat087.
199. Regidor, P.A.; Regidor, M.; Schindler, A.E.; Winterhager, E. Aberrant expression pattern of gap junction connexins in endometriotic tissues. *Mol Hum Reprod* **1997**, *3*, 375-381, doi:10.1093/molehr/3.5.375.
200. Coxon, L.; Horne, A.W.; Vincent, K. Pathophysiology of endometriosis-associated pain: A review of pelvic and central nervous system mechanisms. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2018**, *51*, 53-67, doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.01.014.
201. Vercellini, P.; Vigano, P.; Somigliana, E.; Fedele, L. Endometriosis: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* **2014**, *10*, 261-275, doi:10.1038/nrendo.2013.255.
202. Lin, J.; Li, G.; Den, X.; Xu, C.; Liu, S.; Gao, Y.; Liu, H.; Zhang, J.; Li, X.; Liang, S. VEGF and its receptor-2 involved in neuropathic pain transmission mediated by P2X<sub>2</sub>(/)<sub>3</sub> receptor of primary sensory neurons. *Brain research bulletin* **2010**, *83*, 284-291, doi:10.1016/j.brainresbull.2010.08.002.
203. Ye, Y.; Ono, K.; Bernabé, D.G.; Viet, C.T.; Pickering, V.; Dolan, J.C.; Hardt, M.; Ford, A.P.; Schmidt, B.L. Adenosine triphosphate drives head and neck cancer pain through P2X<sub>2</sub>/3 heterotrimers. *Acta neuropathologica communications* **2014**, *2*, 62-62, doi:10.1186/2051-5960-2-62.
204. Chen, Y.; Li, G.W.; Wang, C.; Gu, Y.; Huang, L.Y. Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state. *Pain* **2005**, *119*, 38-48, doi:10.1016/j.pain.2005.09.007.
205. Greaves, E.; Grieve, K.; Horne, A.W.; Saunders, P.T. Elevated peritoneal expression and estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **2014**, *99*, E1738-1743, doi:10.1210/jc.2014-2282.
206. Stratton, P.; Khachikyan, I.; Sinaii, N.; Ortiz, R.; Shah, J. Association of chronic pelvic pain and endometriosis with signs of sensitization and myofascial pain. *Obstet Gynecol* **2015**, *125*, 719-728, doi:10.1097/aog.0000000000000663.
207. Nakagawa, T.; Wakamatsu, K.; Zhang, N.; Maeda, S.; Minami, M.; Satoh, M.; Kaneko, S. Intrathecal administration of ATP produces long-lasting allodynia in rats: differential mechanisms in the phase of the induction and maintenance. *Neuroscience* **2007**, *147*, 445-455, doi:10.1016/j.neuroscience.2007.03.045.
208. Ding, S.; Yu, Q.; Wang, J.; Zhu, L.; Li, T.; Guo, X.; Zhang, X. Activation of ATF3/AP-1 signaling pathway is required for P2X3-induced endometriosis pain. *Hum Reprod* **2020**, *35*, 1130-1144, doi:10.1093/humrep/deaa061.
209. Lakshmi, S.; Joshi, P.G. Co-activation of P2Y2 receptor and TRPV channel by ATP: implications for ATP induced pain. *Cell Mol Neurobiol* **2005**, *25*, 819-832, doi:10.1007/s10571-005-4936-8.
210. Liang, Y.; Xie, H.; Wu, J.; Liu, D.; Yao, S. Villainous role of estrogen in macrophage-nerve interaction in endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* **2018**, *16*, 122, doi:10.1186/s12958-018-0441-z.
211. Mousseau, M.; Burma, N.E.; Lee, K.Y.; Leduc-Pessah, H.; Kwok, C.H.T.; Reid, A.R.; O'Brien, M.; Sagalajev, B.; Stratton, J.A.; Patrick, N.; et al. Microglial pannexin-1 channel activation is a spinal determinant of joint pain. *Sci Adv* **2018**, *4*, eaas9846, doi:10.1126/sciadv.aas9846.
212. Xu, F.; Yang, J.; Lu, F.; Liu, R.; Zheng, J.; Zhang, J.; Cui, W.; Wang, C.; Zhou, W.; Wang, Q.; et al. Fast Green FCF Alleviates Pain Hypersensitivity and Down-Regulates the Levels of



- Spinal P2X4 Expression and Pro-inflammatory Cytokines in a Rodent Inflammatory Pain Model. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 534, doi:10.3389/fphar.2018.00534.
213. Liu, P.W.; Yue, M.X.; Zhou, R.; Niu, J.; Huang, D.J.; Xu, T.; Luo, P.; Liu, X.H.; Zeng, J.W. P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors involved in ADP β s induced the release of IL-1 β , IL-6 and TNF- α from cultured dorsal horn microglia. *J Pain Res* **2017**, *10*, 1755-1767, doi:10.2147/JPR.S137131.
214. Yu, T.; Zhang, X.; Shi, H.; Tian, J.; Sun, L.; Hu, X.; Cui, W.; Du, D. P2Y12 regulates microglia activation and excitatory synaptic transmission in spinal lamina II neurons during neuropathic pain in rodents. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 165, doi:10.1038/s41419-019-1425-4.
215. Adebisi, M.G.; Manalo, J.; Kellems, R.E.; Xia, Y. Differential role of adenosine signaling cascade in acute and chronic pain. *Neurosci Lett* **2019**, *712*, 134483, doi:10.1016/j.neulet.2019.134483.
216. Effendi, W.I.; Nagano, T.; Kobayashi, K.; Nishimura, Y. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9030785.
217. Holoch, K.J.; Lessey, B.A. Endometriosis and infertility. *Clin Obstet Gynecol* **2010**, *53*, 429-438, doi:10.1097/GRF.0b013e3181db7d71.
218. Macer, M.L.; Taylor, H.S. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am* **2012**, *39*, 535-549, doi:10.1016/j.ogc.2012.10.002.
219. Sang, Q.; Zhang, Z.; Shi, J.; Sun, X.; Li, B.; Yan, Z.; Xue, S.; Ai, A.; Lyu, Q.; Li, W.; et al. A pannexin 1 channelopathy causes human oocyte death. *Sci Transl Med* **2019**, *11*, doi:10.1126/scitranslmed.aav8731.
220. Oral, E.; Arici, A.; Olive, D.L.; Huszar, G. Peritoneal fluid from women with moderate or severe endometriosis inhibits sperm motility: the role of seminal fluid components. *Fertil Steril* **1996**, *66*, 787-792, doi:10.1016/s0015-0282(16)58637-3.
221. Gu, N.H.; Zhao, W.L.; Wang, G.S.; Sun, F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reprod Biol Endocrinol* **2019**, *17*, 66, doi:10.1186/s12958-019-0510-y.
222. Sutovsky, P. Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* **2011**, *142*, 1-14, doi:10.1530/REP-11-0041.
223. Tomiyama, T.; Ohashi, K.; Tsutsui, T.; Saji, F.; Tanizawa, O. Acrosome reaction induced in a limited population of human spermatozoa by progesterone (Ca(2+)-dependent) and ATP (Ca(2+)-independent). *Hum Reprod* **1995**, *10*, 2052-2055, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a136235.
224. Bellezza, I.; Minelli, A. Adenosine in sperm physiology. *Mol Aspects Med* **2017**, *55*, 102-109, doi:10.1016/j.mam.2016.11.009.
225. Shu, J.; Xing, L.; Ding, G.; Luo, Q.; Liu, X.; Yan, Q.; Sheng, J.; Huang, H. The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on mitochondrial function and development of early mouse embryos. *PLoS One* **2013**, *8*, e82334, doi:10.1371/journal.pone.0082334.
226. Owhor, L.E.; Reese, S.; Kölle, S. Salpingitis Impairs Bovine Tubal Function and Sperm-Oviduct Interaction. *Sci Rep* **2019**, *9*, 10893, doi:10.1038/s41598-019-47431-x.
227. Barrera, N.P.; Morales, B.; Villalon, M. Plasma and intracellular membrane inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate the Ca(2+) increase associated with the ATP-induced increase in ciliary beat frequency. *Am J Physiol Cell Physiol* **2004**, *287*, C1114-1124, doi:10.1152/ajpcell.00343.2003.
228. Keating, N.; Dev, K.; Hynes, A.C.; Quinlan, L.R. Mechanism of luminal ATP activated chloride secretion in a polarized epithelium. *J Physiol Sci* **2019**, *69*, 85-95, doi:10.1007/s12576-018-0623-7.

229. Lessey, B.A.; Kim, J.J. Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why. *Fertil Steril* **2017**, *108*, 19-27, doi:10.1016/j.fertnstert.2017.05.031.
230. Leyendecker, G.; Kunz, G.; Wildt, L.; Beil, D.; Deininger, H. Uterine hyperperistalsis and dysperistalsis as dysfunctions of the mechanism of rapid sperm transport in patients with endometriosis and infertility. *Hum Reprod* **1996**, *11*, 1542-1551, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a019435.
231. Gu, X.W.; Yang, Y.; Li, T.; Chen, Z.C.; Fu, T.; Pan, J.M.; Ou, J.P.; Yang, Z.M. ATP mediates the interaction between human blastocyst and endometrium. *Cell Prolif* **2020**, *53*, e12737, doi:10.1111/cpr.12737.
232. Alotaibi, M. Changes in expression of P2X7 receptors in rat myometrium at different gestational stages and the mechanism of ATP-induced uterine contraction. *Life Sci* **2018**, *199*, 151-157, doi:10.1016/j.lfs.2018.03.016.
233. Wang, X.F.; Chan, H.C. Adenosine triphosphate induces inhibition of Na(+) absorption in mouse endometrial epithelium: a Ca(2+)-dependent mechanism. *Biol Reprod* **2000**, *63*, 1918-1924, doi:10.1095/biolreprod63.6.1918.
234. Texido, L.; Romero, C.; Vidal, A.; Garcia-Valero, J.; Fernandez Montoli, M.E.; Baixeras, N.; Condom, E.; Ponce, J.; Garcia-Tejedor, A.; Martin-Satue, M. Ecto-nucleotidases activities in the contents of ovarian endometriomas: potential biomarkers of endometriosis. *Mediators Inflamm* **2014**, *2014*, 120673, doi:10.1155/2014/120673.
235. Horne, A.W.; Saunders, P.T.K.; Abokhrais, I.M.; Hogg, L.; (appendix), E.P.S.P.S.G. Top ten endometriosis research priorities in the UK and Ireland. *Lancet* **2017**, *389*, 2191-2192, doi:10.1016/S0140-6736(17)31344-2.
236. Greaves, E.; Critchley, H.O.D.; Horne, A.W.; Saunders, P.T.K. Relevant human tissue resources and laboratory models for use in endometriosis research. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2017**, *96*, 644-658, doi:10.1111/aogs.13119.
237. Song, Y.; Joshi, N.R.; Vegter, E.; Hrbek, S.; Lessey, B.A.; Fazleabas, A.T. Establishment of an Immortalized Endometriotic Stromal Cell Line from Human Ovarian Endometrioma. *Reprod Sci* **2020**, *27*, 2082-2091, doi:10.1007/s43032-020-00228-0.
238. Huang, Z.X.; Wu, R.F.; Mao, X.M.; Huang, S.M.; Liu, T.T.; Chen, Q.H.; Chen, Q.X. Establishment of an immortalized stromal cell line derived from human Endometriotic lesion. *Reprod Biol Endocrinol* **2020**, *18*, 119, doi:10.1186/s12958-020-00669-x.
239. Persoons, E.; Hennes, A.; De Clercq, K.; Van Bree, R.; Vriens, G.; O, D.F.; Peterse, D.; Vanhie, A.; Meuleman, C.; Voets, T.; et al. Functional Expression of TRP Ion Channels in Endometrial Stromal Cells of Endometriosis Patients. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19092467.
240. Colón-Caraballo, M.; Torres-Reverón, A.; Soto-Vargas, J.L.; Young, S.L.; Lessey, B.; Mendoza, A.; Urrutia, R.; Flores, I. Effects of histone methyltransferase inhibition in endometriosis. *Biol Reprod* **2018**, *99*, 293-307, doi:10.1093/biolre/iy030.
241. Liu, H.; Du, Y.; Zhang, Z.; Lv, L.; Xiong, W.; Zhang, L.; Li, N.; He, H.; Li, Q.; Liu, Y. Autophagy contributes to hypoxia-induced epithelial to mesenchymal transition of endometrial epithelial cells in endometriosis. *Biol Reprod* **2018**, *99*, 968-981, doi:10.1093/biolre/iy0128.
242. Savilova, A.M.; Farkhat, K.N.; Yushina, M.N.; Rudimova, Y.V.; Makiyan, Z.N.; Adamyan, L.V. Characteristics of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Isolated from the Endometrium and Endometriosis Lesions of Women with Malformations of the Internal Reproductive Organs. *Bull Exp Biol Med* **2017**, *162*, 539-544, doi:10.1007/s10517-017-3656-7.
243. Hapangama, D.K.; Drury, J.; Da Silva, L.; Al-Lamee, H.; Earp, A.; Valentijn, A.J.; Edirisinghe, D.P.; Murray, P.A.; Fazleabas, A.T.; Gargett, C.E. Abnormally located SSEA1+/SOX9+ endometrial epithelial cells with a basalis-like phenotype in the eutopic functionalis

- layer may play a role in the pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod* **2019**, *34*, 56-68, doi:10.1093/humrep/dey336.
244. Yang, H.L.; Zhou, W.J.; Chang, K.K.; Mei, J.; Huang, L.Q.; Wang, M.Y.; Meng, Y.; Ha, S.Y.; Li, D.J.; Li, M.Q. The crosstalk between endometrial stromal cells and macrophages impairs cytotoxicity of NK cells in endometriosis by secreting IL-10 and TGF- $\beta$ . *Reproduction* **2017**, *154*, 815-825, doi:10.1530/REP-17-0342.
245. Miller, J.E.; Ahn, S.H.; Marks, R.M.; Monsanto, S.P.; Fazleabas, A.T.; Koti, M.; Tayade, C. IL-17A Modulates Peritoneal Macrophage Recruitment and M2 Polarization in Endometriosis. *Front Immunol* **2020**, *11*, 108, doi:10.3389/fimmu.2020.00108.
246. Fan, H. *In-vitro* models of human endometriosis. *Exp Ther Med* **2020**, *19*, 1617-1625, doi:10.3892/etm.2019.8363.
247. Trapero, C.; Vidal, A.; Fernandez-Montoli, M.E.; Coroleu, B.; Tresserra, F.; Barri, P.; Gomez de Aranda, I.; Sevigny, J.; Ponce, J.; Matias-Guiu, X.; et al. Impaired Expression of Ectonucleotidases in Ectopic and Eutopic Endometrial Tissue Is in Favor of ATP Accumulation in the Tissue Microenvironment in Endometriosis. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20225532.
248. Queckbörner, S.; Syk Lundberg, E.; Gemzell-Danielsson, K.; Davies, L.C. Endometrial stromal cells exhibit a distinct phenotypic and immunomodulatory profile. *Stem Cell Res Ther* **2020**, *11*, 15, doi:10.1186/s13287-019-1496-2.
249. Arnold, J.T.; Kaufman, D.G.; Seppälä, M.; Lessey, B.A. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod* **2001**, *16*, 836-845, doi:10.1093/humrep/16.5.836.
250. Wachstein, M.; Meisel, E. Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH; with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am J Clin Pathol* **1957**, *27*, 13-23, doi:10.1093/ajcp/27.1.13.
251. Wang, F.; Flanagan, J.; Su, N.; Wang, L.C.; Bui, S.; Nielson, A.; Wu, X.; Vo, H.T.; Ma, X.J.; Luo, Y. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* **2012**, *14*, 22-29, doi:10.1016/j.jmoldx.2011.08.002.
252. Trapero, C.; Vidal, A.; Rodriguez-Martinez, A.; Sevigny, J.; Ponce, J.; Coroleu, B.; Matias-Guiu, X.; Martin-Satue, M. The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: a novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells. *Purinergic Signal* **2019**, *15*, 225-236, doi:10.1007/s11302-019-09656-3.
253. Sivridis, E.; Giatromanolaki, A. Proliferative activity in postmenopausal endometrium: the lurking potential for giving rise to an endometrial adenocarcinoma. *J Clin Pathol* **2004**, *57*, 840-844, doi:10.1136/jcp.2003.014399.
254. Altayyeb, A.; Othman, E.; Khashbah, M.; Esmaeel, A.; El-Mokhtar, M.; Lambalk, C.; Mijatovic, V.; Abdelgawad, M. Characterization of Mechanical Signature of Eutopic Endometrial Stromal Cells of Endometriosis Patients. *Reprod Sci* **2020**, *27*, 364-374, doi:10.1007/s43032-019-00042-3.
255. Chaudhari-Kank, M.S.; Zaveri, K.; Antia, V.; Hinduja, I. Comparison of CD9 & CD146 markers in endometrial stromal cells of fertile & infertile females. *Indian J Med Res* **2018**, *147*, 552-559, doi:10.4103/ijmr.IJMR\_1186\_16.
256. Zhi, X.; Wang, Y.; Zhou, X.; Yu, J.; Jian, R.; Tang, S.; Yin, L.; Zhou, P. RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. *Cancer Sci* **2010**, *101*, 2561-2569, doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01733.x.
257. Carmo, M.; Gonçalves, F.Q.; Canas, P.M.; Osés, J.P.; Fernandes, F.D.; Duarte, F.V.; Palmeira, C.M.; Tomé, A.R.; Agostinho, P.; Andrade, G.M.; et al. Enhanced ATP release and CD73-mediated adenosine formation sustain adenosine A. *Br J Pharmacol* **2019**, *176*, 3666-3680, doi:10.1111/bph.14771.
258. Zhang, C.; Gao, L.; Yi, Y.; Han, H.; Cheng, H.; Ye, X.; Ma, R.; Sun, K.; Cui, H.; Chang, X. Adenosine Triphosphate Regresses Endometrial Explants in a Rat Model of Endometriosis. *Reprod Sci* **2016**, *23*, 924-930, doi:10.1177/1933719115625847.

259. Manousopoulou, A.; Hamdan, M.; Fotopoulos, M.; Garay-Baquero, D.J.; Teng, J.; Garbis, S.D.; Cheong, Y. Integrated Eutopic Endometrium and Non-Depleted Serum Quantitative Proteomic Analysis Identifies Candidate Serological Markers of Endometriosis. *Proteomics Clin Appl* **2019**, *13*, e1800153, doi:10.1002/prca.201800153.
260. Poli-Neto, O.B.; Meola, J.; Rosa-E-Silva, J.C.; Tiezzi, D. Transcriptome meta-analysis reveals differences of immune profile between eutopic endometrium from stage I-II and III-IV endometriosis independently of hormonal milieu. *Sci Rep* **2020**, *10*, 313, doi:10.1038/s41598-019-57207-y.
261. Koizumi, S.; Ohsawa, K.; Inoue, K.; Kohsaka, S. Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* **2013**, *61*, 47-54, doi:10.1002/glia.22358.
262. Davalos, D.; Grutzendler, J.; Yang, G.; Kim, J.V.; Zuo, Y.; Jung, S.; Littman, D.R.; Dustin, M.L.; Gan, W.B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* **2005**, *8*, 752-758, doi:10.1038/nn1472.
263. Ohsawa, K.; Irino, Y.; Sanagi, T.; Nakamura, Y.; Suzuki, E.; Inoue, K.; Kohsaka, S. P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* **2010**, *58*, 790-801, doi:10.1002/glia.20963.
264. Gyoneva, S.; Orr, A.G.; Traynelis, S.F. Differential regulation of microglial motility by ATP/ADP and adenosine. *Parkinsonism Relat Disord* **2009**, *15 Suppl 3*, S195-199, doi:10.1016/S1353-8020(09)70813-2.
265. Anastasiu, C.V.; Moga, M.A.; Elena Neculau, A.; Bălan, A.; Scârnciu, I.; Dragomir, R.M.; Dull, A.M.; Chicea, L.M. Biomarkers for the Noninvasive Diagnosis of Endometriosis: State of the Art and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21051750.
266. Conesa-Buendía, F.M.; Llamas-Granda, P.; Atencio, P.; Cabello, A.; Górgolas, M.; Largo, R.; Herrero-Beaumont, G.; Mediero, A. Adenosine Deaminase as a Biomarker of Tenofovir Mediated Inflammation in Naïve HIV Patients. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21103590.
267. Gao, Z.W.; Wang, X.; Zhang, H.Z.; Lin, F.; Liu, C.; Dong, K. The roles of adenosine deaminase in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* **2021**, *20*, 102709, doi:10.1016/j.autrev.2020.102709.
268. Vijayamahantesh; Amit, A.; Dikhit, M.R.; Pandey, R.K.; Singh, K.; Mishra, R.; Das, V.N.; Das, P.; Bimal, S. Elevated Serum ADA Activity as a Marker for Diagnosis and Prognosis of Visceral Leishmaniasis and Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis in Indian Patients. *PLoS One* **2016**, *11*, e0154117, doi:10.1371/journal.pone.0154117.
269. Kelgandre, D.C.; Pathak, J.; Patel, S.; Ingale, P.; Swain, N. Adenosine Deaminase - a Novel Diagnostic and Prognostic Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* **2016**, *17*, 1865-1868, doi:10.7314/apjcp.2016.17.4.1865.
270. Zhao, L.; Gu, C.; Ye, M.; Zhang, Z.; Han, W.; Fan, W.; Meng, Y. Identification of global transcriptome abnormalities and potential biomarkers in eutopic endometria of women with endometriosis: A preliminary study. *Biomed Rep* **2017**, *6*, 654-662, doi:10.3892/br.2017.902.
271. Onyedibe, K.I.; Wang, M.; Sintim, H.O. ENPP1, an Old Enzyme with New Functions, and Small Molecule Inhibitors-A STING in the Tale of ENPP1. *Molecules* **2019**, *24*, doi:10.3390/molecules24224192.
272. Li, X.D.; Wu, J.; Gao, D.; Wang, H.; Sun, L.; Chen, Z.J. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science* **2013**, *341*, 1390-1394, doi:10.1126/science.1244040.
273. Carozza, J.A.; Brown, J.A.; Böhnert, V.; Fernandez, D.; AlSaif, Y.; Mardjuki, R.E.; Smith, M.; Li, L. Structure-Aided Development of Small-Molecule Inhibitors of ENPP1, the

- Extracellular Phosphodiesterase of the Immunotransmitter cGAMP. *Cell Chem Biol* **2020**, *27*, 1347-1358.e1345, doi:10.1016/j.chembiol.2020.07.007.
274. Dey, R.J.; Dey, B.; Zheng, Y.; Cheung, L.S.; Zhou, J.; Sayre, D.; Kumar, P.; Guo, H.; Lamichhane, G.; Sintim, H.O.; et al. Inhibition of innate immune cytosolic surveillance by an M. tuberculosis phosphodiesterase. *Nat Chem Biol* **2017**, *13*, 210-217, doi:10.1038/nchembio.2254.
275. Qu, H.; Li, L.; Wang, T.L.; Seckin, T.; Segars, J.; Shih, I.M. Epithelial Cells in Endometriosis and Adenomyosis Upregulate STING Expression. *Reprod Sci* **2020**, *27*, 1276-1284, doi:10.1007/s43032-019-00127-z.
276. Rodríguez-Martínez, A.; Trapero, C.; Vidal, A.; Piulats, J.M.; Gómez de Aranda, I.; Sévigny, J.; Fernández-Montolí, M.E.; Ponce, J.; Matias-Guiu, X.; Martín-Satué, M. Characterization of the Endometrial MSC Marker Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) in Low- and High-Grade Endometrial Carcinomas: Loss of Stromal Expression in the Invasive Phenotypes. *J Pers Med* **2021**, *11*, doi:10.3390/jpm11050331.
277. Nguyen, H.P.T.; Xiao, L.; Deane, J.A.; Tan, K.S.; Cousins, F.L.; Masuda, H.; Sprung, C.N.; Rosamilia, A.; Gargett, C.E. N-cadherin identifies human endometrial epithelial progenitor cells by in vitro stem cell assays. *Hum Reprod* **2017**, *32*, 2254-2268, doi:10.1093/humrep/dex289.
278. Shukla, V.; Zimmermann, H.; Wang, L.; Kettenmann, H.; Raab, S.; Hammer, K.; Sévigny, J.; Robson, S.C.; Braun, N. Functional expression of the ecto-ATPase NTPDase2 and of nucleotide receptors by neuronal progenitor cells in the adult murine hippocampus. *J Neurosci Res* **2005**, *80*, 600-610, doi:10.1002/jnr.20508.
279. Mishra, S.K.; Braun, N.; Shukla, V.; Füllgrabe, M.; Schomerus, C.; Korf, H.W.; Gachet, C.; Ikehara, Y.; Sévigny, J.; Robson, S.C.; et al. Extracellular nucleotide signaling in adult neural stem cells: synergism with growth factor-mediated cellular proliferation. *Development* **2006**, *133*, 675-684, doi:10.1242/dev.02233.
280. Gampe, K.; Stefani, J.; Hammer, K.; Brendel, P.; Pöttsch, A.; Enikolopov, G.; Enjoji, K.; Acker-Palmer, A.; Robson, S.C.; Zimmermann, H. NTPDase2 and purinergic signaling control progenitor cell proliferation in neurogenic niches of the adult mouse brain. *Stem Cells* **2015**, *33*, 253-264, doi:10.1002/stem.1846.
281. Boccazzi, M.; Rolando, C.; Abbraccio, M.P.; Buffo, A.; Ceruti, S. Purines regulate adult brain subventricular zone cell functions: contribution of reactive astrocytes. *Glia* **2014**, *62*, 428-439, doi:10.1002/glia.22614.
282. Medrano, M.P.; Bejarano, C.A.; Battista, A.G.; Venera, G.D.; Bernabeu, R.O.; Faillace, M.P. Injury-induced purinergic signalling molecules upregulate pluripotency gene expression and mitotic activity of progenitor cells in the zebrafish retina. *Purinergic Signal* **2017**, *13*, 443-465, doi:10.1007/s11302-017-9572-5.
283. Masuda, H.; Anwar, S.S.; Bühring, H.J.; Rao, J.R.; Gargett, C.E. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplant* **2012**, *21*, 2201-2214, doi:10.3727/096368911X637362.
284. Darzi, S.; Werkmeister, J.A.; Deane, J.A.; Gargett, C.E. Identification and Characterization of Human Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Potential for Cellular Therapy. *Stem Cells Transl Med* **2016**, *5*, 1127-1132, doi:10.5966/sctm.2015-0190.
285. Roszek, K.; Wujak, M. How to influence the mesenchymal stem cells fate? Emerging role of ectoenzymes metabolizing nucleotides. *J Cell Physiol* **2018**, *234*, 320-334, doi:10.1002/jcp.26904.
286. Coppi, E.; Pugliese, A.M.; Urbani, S.; Melani, A.; Cerbai, E.; Mazzanti, B.; Bosi, A.; Saccardi, R.; Pedata, F. ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2007**, *25*, 1840-1849, doi:10.1634/stemcells.2006-0669.



287. Ferrari, D.; Gulinelli, S.; Salvestrini, V.; Lucchetti, G.; Zini, R.; Manfredini, R.; Caione, L.; Piacibello, W.; Ciciarello, M.; Rossi, L.; et al. Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Exp Hematol* **2011**, *39*, 360-374, 374.e361-365, doi:10.1016/j.exphem.2010.12.001.
288. Zippel, N.; Limbach, C.A.; Ratajski, N.; Urban, C.; Luparello, C.; Pansky, A.; Kassack, M.U.; Tobiasch, E. Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **2012**, *21*, 884-900, doi:10.1089/scd.2010.0576.
289. Bono, M.R.; Fernandez, D.; Flores-Santibanez, F.; Roseblatt, M.; Sauma, D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett* **2015**, *589*, 3454-3460, doi:10.1016/j.febslet.2015.07.027.
290. Aliagas, E.; Torrejon-Escribano, B.; Lavoie, E.G.; de Aranda, I.G.; Sevigny, J.; Solsona, C.; Martin-Satue, M. Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidase/CD73 along the mouse female estrous cycle. *Acta Physiol (Oxf)* **2010**, *199*, 191-197, doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x.
291. Luo, F.; Slayden, O.D. Altered Expression of ATP-Mediated Purinergic Signaling Pathways in Macaques with Endometriosis. **2020**, *114*, E205, doi:10.1016/j.fertnstert.2020.08.582
292. Gordts, S.; Koninckx, P.; Brosens, I. Pathogenesis of deep endometriosis. *Fertil Steril* **2017**, *108*, 872-885.e871, doi:10.1016/j.fertnstert.2017.08.036.
293. Altay, A.Y.; Yavuz, E.; Bayram, A.; Yasa, C.; Akhan, S.E.; Topuz, S.; Onder, S. Loss of stromal CD73 expression plays a role in pathogenesis of polypoid endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* **2021**, doi:10.1007/s00404-020-05942-3.
294. Kurnit, K.C.; Draisey, A.; Kazen, R.C.; Chung, C.; Phan, L.H.; Harvey, J.B.; Feng, J.; Xie, S.; Broaddus, R.R.; Bowser, J.L. Loss of CD73 shifts transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) from tumor suppressor to promoter in endometrial cancer. *Cancer Lett* **2021**, doi:10.1016/j.canlet.2021.01.030.
295. Bowser, J.L.; Blackburn, M.R.; Shipley, G.L.; Molina, J.G.; Dunner, K., Jr.; Broaddus, R.R. Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression. *J Clin Invest* **2016**, *126*, 220-238, doi:10.1172/jci79380.
296. Yuan, M.; Ding, S.; Meng, T.; Lu, B.; Shao, S.; Zhang, X.; Yuan, H.; Hu, F. Effect of A-317491 delivered by glycolipid-like polymer micelles on endometriosis pain. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 8171-8183, doi:10.2147/ijn.s146569.
297. Spaans, F.; Melgert, B.N.; Chiang, C.; Borghuis, T.; Klok, P.A.; de Vos, P.; van Goor, H.; Bakker, W.W.; Faas, M.M. Extracellular ATP decreases trophoblast invasion, spiral artery remodeling and immune cells in the mesometrial triangle in pregnant rats. *Placenta* **2014**, *35*, 587-595, doi:10.1016/j.placenta.2014.05.013.
298. Cotechini, T.; Komisarenko, M.; Sperou, A.; Macdonald-Goodfellow, S.; Adams, M.A.; Graham, C.H. Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia. *J Exp Med* **2014**, *211*, 165-179, doi:10.1084/jem.20130295.
299. Brosens, I.; Pijnenborg, R.; Benagiano, G. Defective myometrial spiral artery remodelling as a cause of major obstetrical syndromes in endometriosis and adenomyosis. *Placenta* **2013**, *34*, 100-105, doi:10.1016/j.placenta.2012.11.017.
300. Deissler, H.; Blass-Kampmann, S.; Bruyneel, E.; Mareel, M.; Rajewsky, M.F. Neural cell surface differentiation antigen gp130(RB13-6) induces fibroblasts and glioma cells to express astroglial proteins and invasive properties. *Faseb j* **1999**, *13*, 657-666, doi:10.1096/fasebj.13.6.657.
301. Yano, Y.; Hayashi, Y.; Sano, K.; Nagano, H.; Nakaji, M.; Seo, Y.; Ninomiya, T.; Yoon, S.; Yokozaki, H.; Kasuga, M. Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (E-NPP1/PC-1) and -3 (E-NPP3/CD203c/PD-



Ibeta/B10/gp130(RB13-6)) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases. *Cancer Lett* **2004**, 207, 139-147, doi:10.1016/j.canlet.2003.11.002.

# ANNEXOS

*"The advancement of science and the diffusion of information  
is the best aliment to true liberty."*

James Madison



## **ANNEX 1**

### **Capítol de llibre: Identificació in situ d'ectoenzims involucrats en la hidròlisi dels nucleòtids extracel·lulars**

**In Situ Identification of Ectoenzymes Involved in the Hydrolysis of Extracellular  
Nucleotides.**

Martín-Satué M, Rodríguez-Martínez A, Trapero C. En: Charles F. Streckfus, editor.  
Immunohistochemistry- The Ageless Biotechnology. London: IntechOpen; 2019.

doi: 10.5772/intechopen.84495



# In Situ Identification of Ectoenzymes Involved in the Hydrolysis of Extracellular Nucleotides

*Mireia Martín-Satué, Aitor Rodríguez-Martínez and Carla Trapero*

## Abstract

Adenosine triphosphate (ATP) and other nucleotides and nucleosides, such as adenosine, are signaling molecules involved in many physiological and pathophysiological processes. The group of cell and tissue responses mediated by these molecules is known as purinergic signaling. Ecto-nucleotidases are ectoenzymes expressed at the cell membrane that act sequentially to efficiently hydrolyze extracellular ATP into adenosine, and they are key elements of this signaling. There is growing interest in studying these enzymes in relation to various pathologies, especially those with an inflammatory component such as cancer. This review summarizes the main protocols for the study of the expression and in situ activity of ectoenzymes in tissue slices and cultured cells.

**Keywords:** nucleotidase, in situ histochemistry, CD39, CD73, lead staining

## 1. Introduction

In this chapter, we intend to detail basic protocols for the in situ detection of ecto-nucleotidases as an introduction to the technique for those who have never made these experimental approaches. This chapter does not aim to be a review on ecto-nucleotidases because there are already excellent highly recommended reviews [1–4].

Ecto-nucleotidases are broadly expressed enzymes active in almost all tissues of all organisms, both animals and plants. What varies among the cell (and tissue) types are the subtype(s) of enzyme(s) and the combination of them, expressed in a particular cell type. In general, these enzymes convert adenosine triphosphate (ATP), as well as diphosphate (ADP) and monophosphate (AMP), into adenosine. In situ detection of these enzymes confers functional sense on immunodetection studies. It is also a convenient tool for the validation of new inhibitors of these enzymes, which can be studied in the cell context of the tissue where they are found. The study of ecto-nucleotidases and their inhibitors (many of them antibodies) is at the center of oncological research to therapeutically target the adenosinergic pathway, a fact reflected in the increased number of high impact publications in the field.



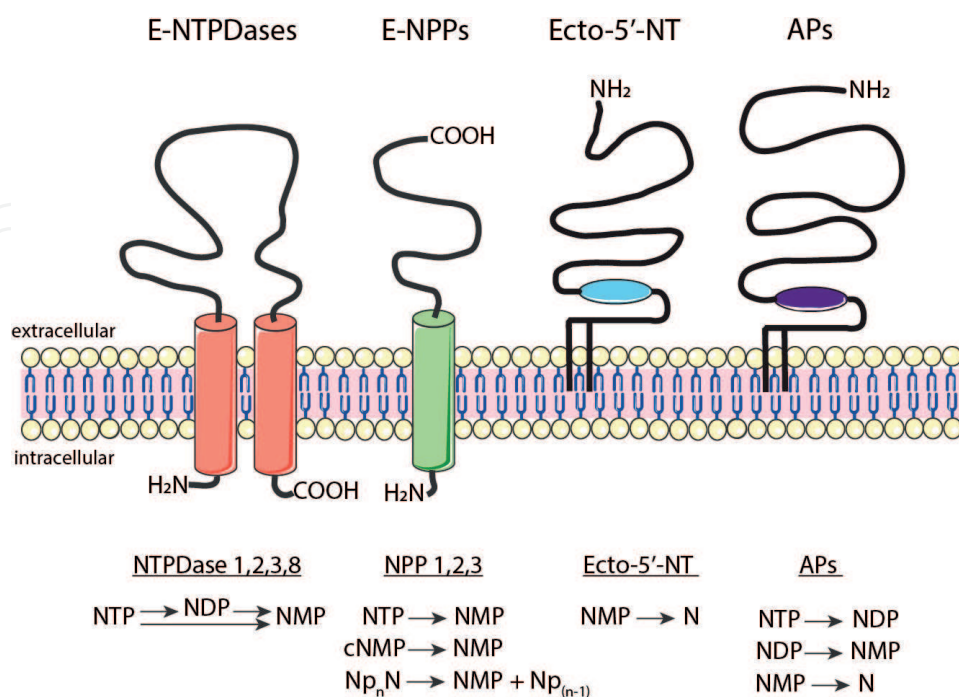
The technique is feasible because ecto-nucleotidases maintain their activity of hydrolyzing nucleotides in formalin-fixed frozen tissues (and cells). Inorganic phosphorous (Pi) generated upon their activity combines with a lead salt added to the reaction mixture, forming brown precipitates in the places where the enzymes are active, which can be visualized under light microscope. The protocol, with slight modifications, can also be used for electron microscopy.

There are four families of membrane-bound ecto-nucleotidases. Other nucleotidases act intracellularly but are not studied here. The main features of ecto-nucleotidases are included in **Figure 1** and summarized below:

### 1.1 Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases)

The E-NTPDase family is composed of eight members, four of which are cell surface-located: NTPDase1, also known as CD39; NTPDase2 or CD39L1; NTPDase3 or CD39L3; and NTPDase8. They perform the ATP (and ADP) hydrolysis to AMP with different ADP production abilities. These differences between enzymes reflect different consequences in cells depending on the ATP receptors expressed [5]. The four members display similar structural properties, with two transmembrane domains, close to the N and C terminus, and a catalytic extracellular domain [3]. They require millimolar concentrations of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  ions in order to perform ATP hydrolysis, and the absence of these ions results in no enzymatic activity. All of them hydrolyze nucleoside triphosphates (NTP), but they differ in substrate specificity. NTPDase1 hydrolyzes ATP and ADP equally, while NTPDase3 and NTPDase8 hydrolyze ATP or uridine triphosphate (UTP) more efficiently than ADP or uridine diphosphate (UDP). Finally, the NTPDase2 is the most ATP-specific NTPDase, and for this reason it is also named the ecto-ATPase [2].

Most of the available NTPDase inhibitors are ATP analogues such as ARL-67156 and PSB-6426, a potent NTPDase2 inhibitor. Non-nucleotide-based inhibitors also described in literature are compounds related to dyes bearing sulfonate groups such



**Figure 1.** Schematic representation of the four families of membrane-bound ecto-nucleotidases and their substrate specificities. E-NTPDases, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases; E-NPPs, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases; ecto-5'-NT, ecto-5'-nucleotidase; APs, alkaline phosphatases; NTP, nucleoside triphosphate; NDP, nucleoside diphosphate; NMP, nucleoside monophosphate; cNMP, cyclic nucleoside monophosphate; N, nucleoside.

as suramin, a nonselective inhibitor, and the pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS). Other inhibitors are the polyoxometalates, such as POM 1 [6]. Inhibitory antibodies, mainly against CD39, are being developed for use in cancer therapy [7].

## 1.2 Ecto-nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPPs)

The E-NPP family represents a versatile group of seven structurally related enzymes with pyrophosphatase and phosphodiesterase activities having a wide range of hydrolysable substrates. The membrane-bound ectoenzymes NPP1 and NPP3 and the secreted NPP2 are the most studied members. Catalytic activity of E-NPPs is composed of a two-step hydrolysis consisting of a first attack on the phosphate of the incoming substrate by a threonine/serine metal-activated catalytic site and a second attack on the intermediate substrate by a metal-activated site, thus releasing a nucleoside 5'-monophosphate. In general, NPP1–3 are typed as alkaline ecto-nucleotide pyrophosphatases that hydrolyze a number of phosphodiester bonds (e.g., from oligonucleotides, lysophosphatidylcholine, sphingomyelin, and glycerophosphorylcholine or from artificial substrates like the p-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate (p-Nph-5'-TMP)) and pyrophosphate bonds (e.g., from (d)NTPs, (d)NDPs, NAD, FAD, and UDP sugars or from artificial substrates like the thiamine pyrophosphate (TPP)) to generate nucleoside 5'-monophosphates. TPP is the “false” substrate mainly used for NPP identification in *in situ* activity assays. Like most of the enzymes, E-NPPs can be inhibited *in vitro* by the substrates and products of the NPP reaction, as well as by heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans, and by other substances such as imidazole, 2-mercaptoethanol, and metal ion-chelating agents [8]. Anti-NPP3 inhibitory antibody represents a promising therapeutic tool for the treatment of renal cell carcinoma [9].

## 1.3 Ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT, eN)/CD73

Extracellular AMP resulting from the hydrolysis of ATP and ADP by most of the ecto-nucleotidases can in turn be efficiently hydrolyzed into adenosine by eN, a glycosylphosphatidylinositol-linked membrane-bound glycoprotein also known as CD73 [10], which hydrolyses nucleotide-5'-monophosphates (NMP) [3]. It is broadly expressed as an alpha dimer bound with disulfide bridges and shows different functions depending on the cell type. Although eN activity is ion-independent in physiological conditions, *in vitro* the presence of  $Mg^{2+}$  ions can considerably increase its ability to hydrolyze AMP. In addition to its AMPase activity, eN hydrolyzes 2-deoxyribose compounds but much less effectively than AMP. Unlike other ectoenzymes such as NPPs, eN is not inhibited by Pi. Alpha,beta-methylene-ADP and some of its derivatives and analogues are efficient inhibitors [11]. Inhibitory anti-CD73 antibodies are used in clinical trials [7].

## 1.4 Alkaline phosphatases (APs)

Phosphatases are a superfamily of proteins that mediate the phosphate removal of proteins and other substrates [12]. Depending on their substrate specificity, they are divided into two major groups: the protein phosphatases, which mediate the hydrolysis of phosphate groups from protein residues (e.g., serine/threonine phosphatases), and the membrane-bound phosphatases, which mediate the hydrolysis of phosphate groups from nonprotein substrates (e.g., acid and alkaline phosphatases). In this chapter, we are focusing on the membrane-bound phosphatases, in particular the AP family [12, 13].

APs are zinc-containing dimeric membrane-bound glycoproteins that require magnesium ion for the hydrolysis of a wide range of phosphomonoesters. Although optimum activity occurs at alkaline pH (9.3–10.3), they are also active at a physiological pH, and they are primarily responsible for the PPi phosphohydrolysis in neutral and alkaline environments. APs are classified by their tissue expression and distribution [14]; in humans there are four types of APs in two main groups: the tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), with only one member, and the tissue-specific APs, which include the placental-like alkaline phosphatase (PLAP), the germ cell alkaline phosphatase (GCAP), and the intestinal alkaline phosphatase (IAP). Despite the fact that TNAP expression is not tissue-specific, it is mainly found in the liver, bone, and kidneys [15].

APs catalyze the hydrolysis of monoesters of phosphoric acids and have extensive substrate specificity *in vitro*. For example, TNAP is able to hydrolyze ATP, ADP, AMP, PPi, glucose-1-phosphate, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, and  $\beta$ -glycerophosphate; however, only a few compounds have been considered as natural *in vivo* AP substrates, like PPi, pyridoxal-5'-phosphate (PLP or vitamin B5), and phosphoethanolamine (PEA). APs by themselves are extremely efficient ATPase enzymes, but an autoregulatory mechanism has been described in order to modify the substrate specificity depending on the environmental concentrations of free inorganic phosphates or cell and tissue demands. Pi itself is known to inhibit the hydrolytic activity through a competitive mechanism, and therefore Pi levels will impact the ability of AP to hydrolyze PPi [15, 16]. Levamisole is an inhibitor of the APs. Because of the ability to cleave all forms of adenosine phosphates, APs significantly influence purinergic signaling [17].

## **2. In situ nucleotidase activity experiments**

The protocol detailed here for the detection of E-NTPDases, E-NPPs, and eN is based on the Wachstein-Meisel lead phosphate method [18], and the protocol for AP identification is based on the Gossrau method [19], with some modifications.

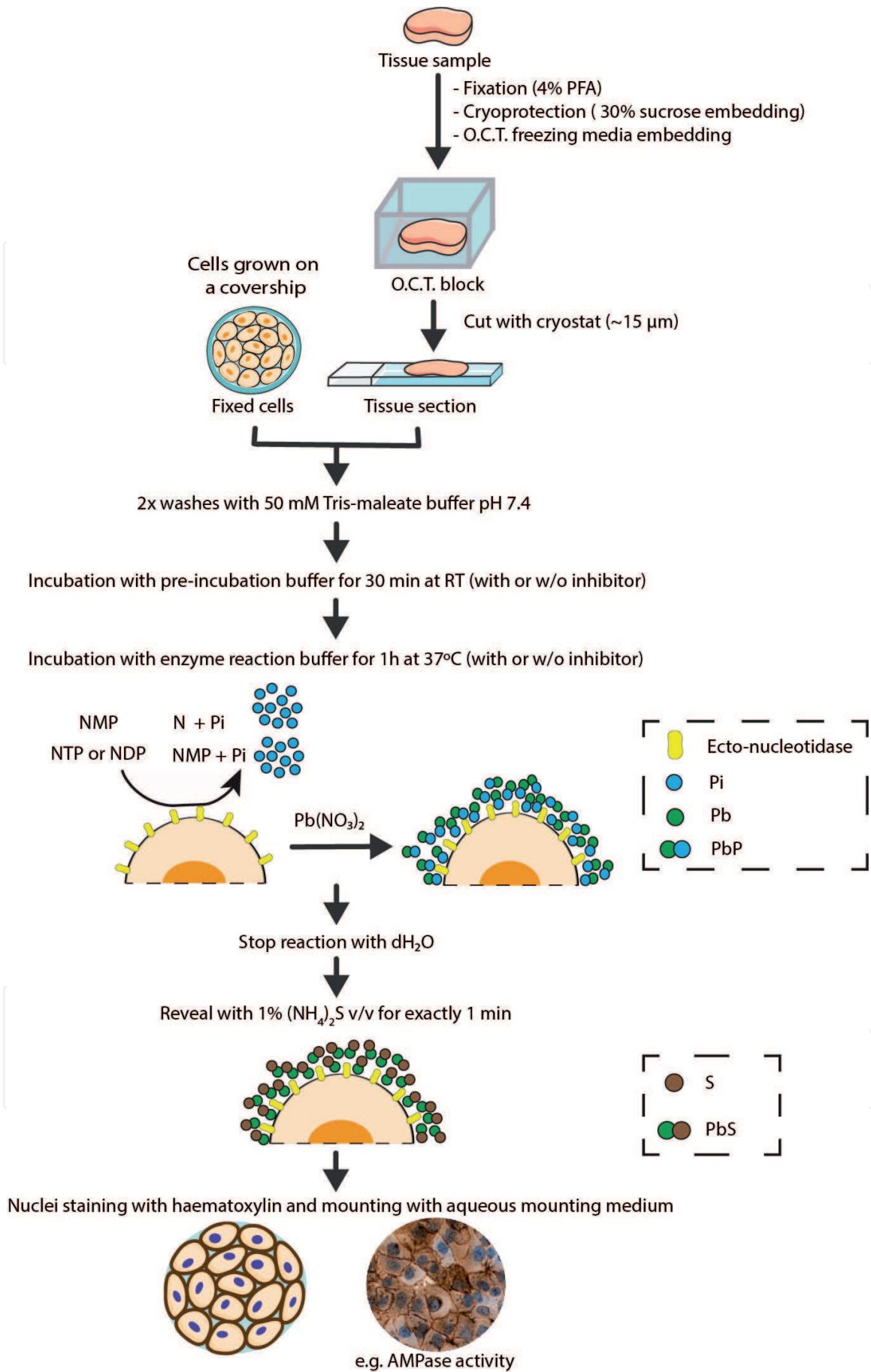
### **2.1 Wachstein-Meisel lead phosphate-based method**

#### *2.1.1 In tissue samples*

Tissue pieces are fixed with 4% paraformaldehyde for a time period varying from a few hours to 2 days depending on the size (**Figure 2**). Following fixation, tissue pieces are cryopreserved by embedding them in 30% sucrose (in Milli-Q H<sub>2</sub>O) O/N or until tissue sinks. Tissues are then embedded in optimum cutting temperature (OCT) compound and cut with a cryostat into 15  $\mu$ m-thick sections that are put on slides. It is recommended that pretreated slides be used, either homemade polylysine-treated or the commercial ones, to eliminate tissue loss during the procedure. Sections are stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

Tissue slides are rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to remove OCT compound and washed twice with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 at RT. Slides are then incubated for 30 min at RT with preincubation buffer (50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 containing 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 250 mM sucrose) and then for 1 h at 37°C with the enzyme reaction buffer (50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 supplemented with 250 mM sucrose, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and 2 mM





**Figure 2.** Scheme including the main steps of the lead phosphate-based method for ecto-nucleotidase activity detection.

CaCl<sub>2</sub> and stabilized with 3% Dextran T-250) in the presence or absence of nucleotide as substrate (e.g., ATP). The incubation time and the substrate concentration may vary depending on the experiment, but 1 h at 1 mM is generally suitable. To avoid interference with AP activity, experiments are performed in the presence of the inhibitor levamisole (2.5 mM). Note that the optimum pH for APs is 9, but they are also active at a pH of 7.4. The reaction is stopped with dH<sub>2</sub>O and revealed by incubating with 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S v/v for exactly 1 min. A control slide in the absence of nucleotide, in which no reaction is expected, is included in the experiment. Nuclei are counterstained with hematoxylin. Samples are then mounted with aqueous mounting medium (e.g., Fluoromount™, Sigma-Aldrich); dehydration is not recommended because of the eventual loss of lead precipitates. Finally, samples are observed and photographed under light microscope; enzyme-active sites are brownish black. An adapted protocol with slight modifications, including the replacement of ammonium sulfide by glutaraldehyde, can be applied for electron microscopy [20]. **Table 1** includes buffer formulations.

PRE-INCUBATION BUFFER			
Reagent	Stock Solution	Final Concentration	Volume (iV=1mL)
Tris-maleate	200 mM	50 mM	250 µL
Sucrose	1 M	0.25 M	250 µL
MgCl <sub>2</sub>	1 M	2 mM	2 µL
Milli-Q H <sub>2</sub> O	/	/	498 µL

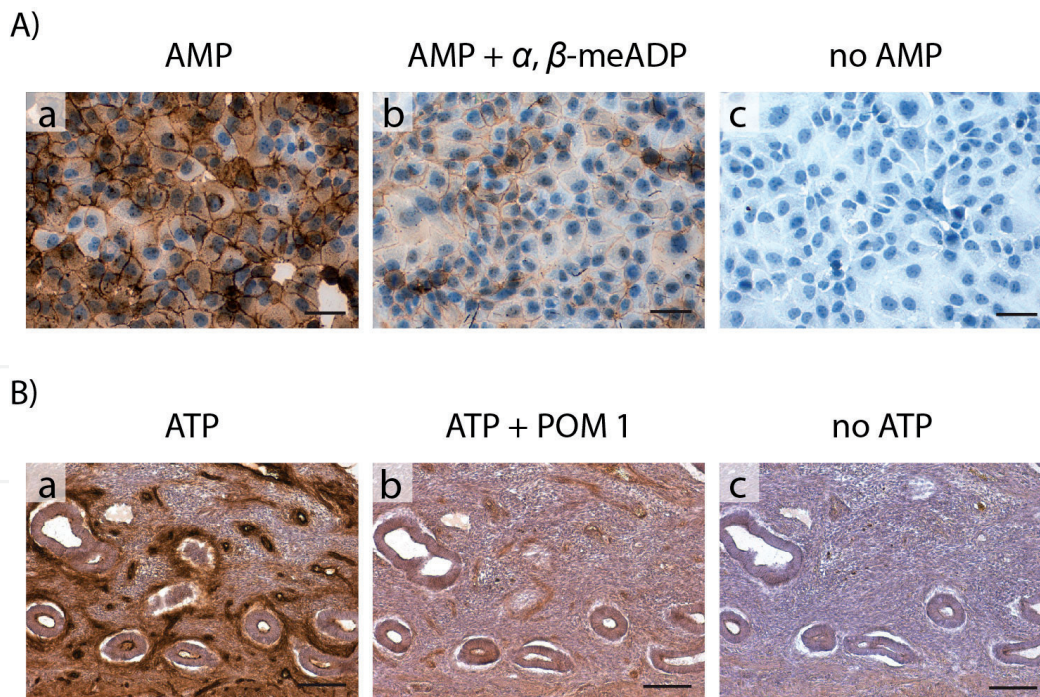
  

ENZYME REACTION BUFFER			
Reagent	Stock Solution	Final Concentration	Volume (iV=1mL)
Tris-maleate	200 mM	50 mM	250 µL
Sucrose	1 M	0.25 M	250 µL
Dextran	10 %	3 %	300 µL
MnCl <sub>2</sub>	1 M	5 mM	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1 M	2 mM	2 µL
CaCl <sub>2</sub>	1 M	2 mM	2 µL
Levamisole	250 mM	2.5 mM	10 µL
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 M	2 mM	2 µL
Substrate	10 mM	1 mM	100 µL
Milli- Q H <sub>2</sub> O	/	/	79 µL

**Table 1.**

*Formulation of buffers used for the lead phosphate-based method. The most right column includes the reagent amounts calculated to prepare a 1 mL final volume (FV) solution. Different nucleotides can be used as substrate. Inhibitors can also be added to both preincubation and reaction buffers; H<sub>2</sub>O to adjust the volume must then be modified accordingly.*

Besides levamisole, enzyme inhibitors might be included in both preincubation and incubation buffers. For example, 1 mM  $\alpha,\beta$ -methylene-ADP efficiently inhibits CD73, and POM 1 inhibits NTPDases (**Figure 3**).



**Figure 3.**  
(A) *In situ* AMPase activity in the endometrial carcinoma human HEC-1B cell line in the presence of 1 mM AMP (a). Note that most of the activity is located at the cell membrane, where CD73 is expressed. Incubation in the presence of the inhibitor  $\alpha, \beta$ -methylene-ADP ( $\alpha, \beta$ -meADP) drastically diminished the activity (b). No AMPase activity is detected when AMP is omitted in the reaction (c). (B) *In situ* enzyme ATPase activity in human endometrium in the presence of 1 mM ATP (a). Activity is strongly inhibited with the NTPDase inhibitor POM 1 (b). No ATP activity is detected when ATP is omitted (c). Scale bars are 50  $\mu\text{m}$  (a) and 200  $\mu\text{m}$  (B).

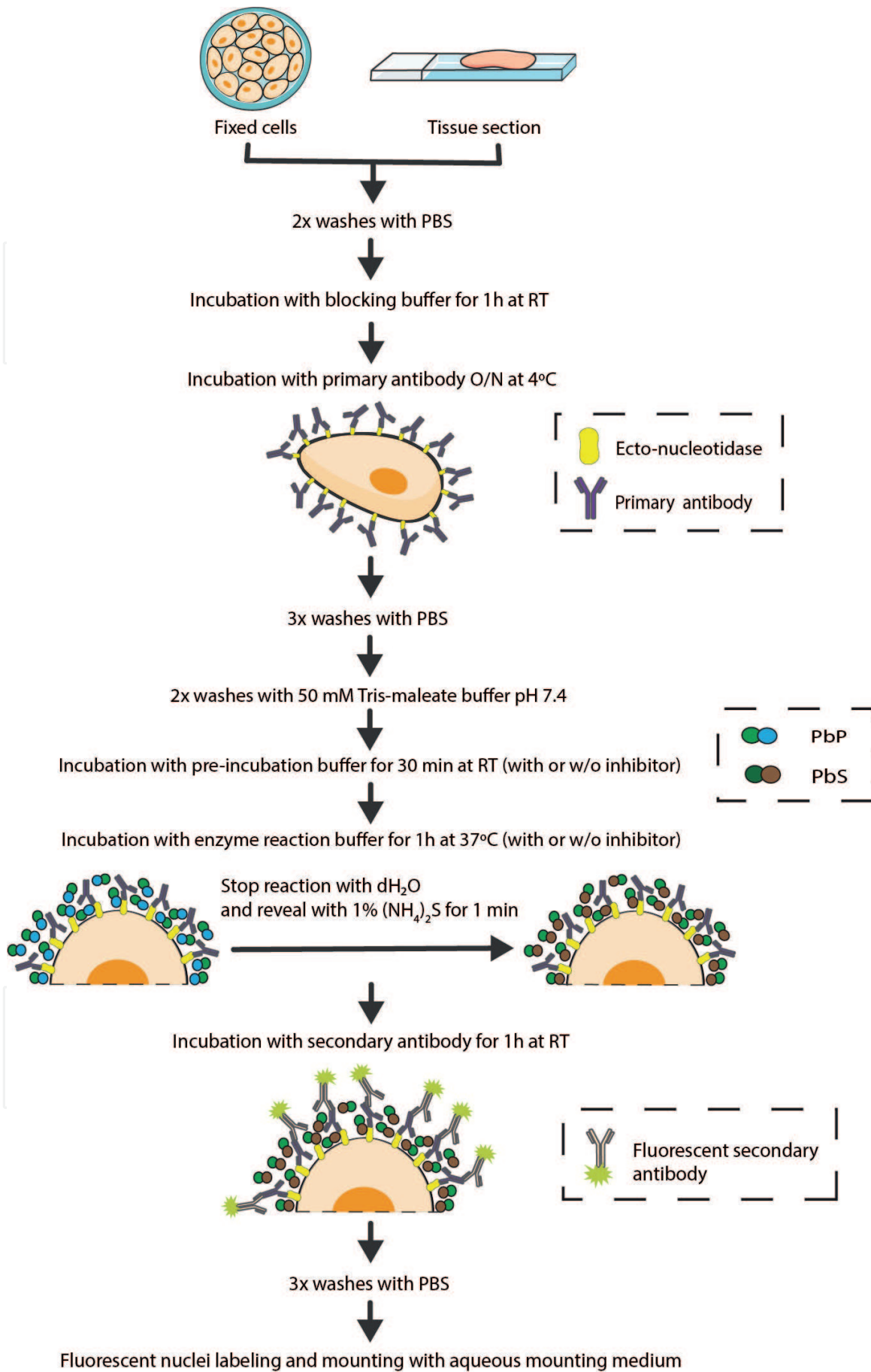
### 2.1.2 In cell cultures

Cells are seeded onto coverslips and allowed to grow with their regular medium until the desired confluence is achieved. The medium is then removed, and the cells are washed twice with PBS before fixation with 4% paraformaldehyde for 5–10 min at RT. Cells are washed three times with PBS to wash out the fixative and kept at 4°C with PBS until use. To proceed with the protocol, coverslips are washed twice for 5 min with gentle rocking with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 at RT and then incubated for 30 min at RT with the preincubation buffer. The following steps are as reported for the tissue slices.

### 2.2 Gossrau-based method for APs

*In situ* localization of APs can be addressed by using the Gossrau method that utilizes nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) as artificial substrates for the APs. Briefly, tissue slices or fixed cells grown on coverslips are washed twice in 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and then preincubated with the same buffer at pH 9.4 for 15 min at RT. Enzymatic reaction starts by adding the revealing reagent BCIP/NBT (Sigma-Aldrich) for 7 min (up to 15 min) at RT and stopped with 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.4. In AP inhibition experiments, 5 mM levamisole can be added to both preincubation and enzyme reaction buffers. In control experiments, the revealing reagent is omitted. Since the reaction generates blue precipitates, nuclei staining with hematoxylin should be avoided. Alternatively nuclei can be counterstained with methyl green dye. Samples are then mounted with aqueous mounting medium (e.g., Fluoromount™, Sigma-Aldrich) and observed and photographed under light microscope.





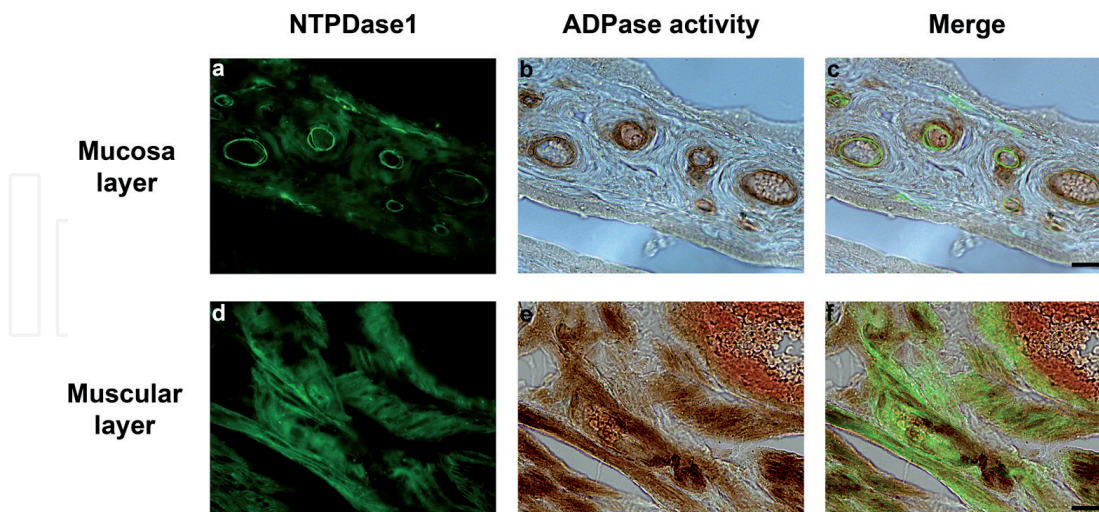
**Figure 4.** Scheme including the main steps of the method combining immunofluorescence and in situ ecto-nucleotidase activity detection protocols.

### 2.3 Combined immunolabeling and in situ nucleotidase activity experiments

The technique uses the same tissue slide (or the same coverslip of cells) to identify both the activity, with in situ histochemistry (or cytochemistry), and the protein, with immunofluorescence (**Figure 4**) [21, 22]. Tissue sample sections or fixed cells grown on coverslips are washed twice with PBS and incubated with a blocking solution containing 20% normal goat serum and 0.2% gelatin in PBS at RT for 1 h and then incubated O/N at 4°C with the appropriate primary antibody. The samples are washed three times with PBS and twice with 50 mM Tris-maleate buffer. In situ nucleotidase activity experiment is performed as detailed previously, adding the appropriate nucleotide as substrate. Subsequently, the tissues are washed three times in PBS before incubating with the appropriate fluorescent-labeled secondary antibody. After three final washes with PBS, nuclei are labeled, and the samples mounted with aqueous mounting medium; a mounting medium containing DAPI can be used for this purpose (e.g., ProLong Gold antifade reagent with DAPI mounting medium from Thermo Fisher Scientific). The sections are observed and photographed under a Nikon Eclipse E800 Microscope. Pictures of bright field (for activity) and fluorescence (for protein immunolocalization and nuclei visualization) are taken sequentially from the same field.

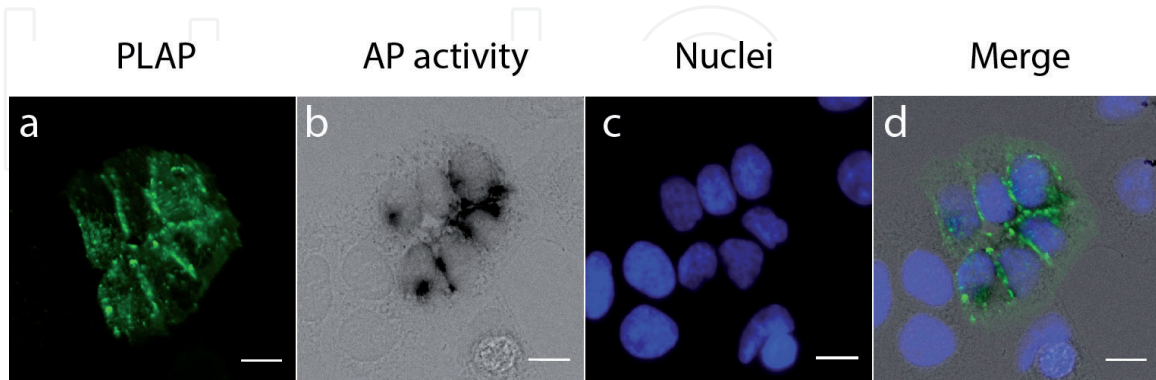
We recommend that histochemistry be performed between primary and secondary antibody incubations, but other protocols are also feasible. This is of interest when using inhibitory antibodies. In these cases the in situ histochemistry should be performed at the beginning of the procedure. It also has to be taken into account that it might be necessary to test different nucleotide concentrations and incubation times in order to optimize the results for a particular tissue in order to minimize hampering of fluorescence capture by the dark brown lead deposits.

**Figures 5 and 6** are examples of this combined technique in tissue and cell culture, respectively. **Figure 5** shows immunofluorescence to localize NTPDase1, and in situ histochemistry for the ADPase activity in human fallopian tubes. The



**Figure 5.** Immunolocalization of NTPDase1 (a, d) and in situ ADPase histochemistry (b, e) in cryosections of human oviducts. NTPDase1 was detected with immunofluorescence in endothelial cells of lamina propria (a) and in smooth muscle cells (d). Microphotographs b and e show dark brown deposits corresponding to in situ ADPase activity. Merge images (c, f) confirmed that NTPDase1 is active in the same structures where it immunolocalizes. Reddish structure at top right of image is the blood inside the vessel. Scale bar is 25  $\mu$ m. Reprinted by permission of Springer Nature Histochemistry and Cell Biology, Characterization of Ecto-nucleotidases in Human Oviducts with an Improved Approach Simultaneously Identifying Protein Expression and In Situ Enzyme Activity, Villamonte et al. [21].

antibodies used were mouse antihuman NTPDase1 primary antibody (clone BU-61, Ancell) and Alexa Fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody (Thermo Fisher Scientific). Label is seen together with the lead precipitate in endothelium of blood vessels, especially abundant in the lamina propria of the mucosa layer, and in muscle cells, predominant in the muscular layer [21]. In **Figure 6**, the antibody against human placental-like alkaline phosphatase (PLAP; clone 8B6, Sigma-Aldrich) was used in Ishikawa cells to localize the protein by immunofluorescence, together with the activity obtained with the BCIP/NBT reagent.



**Figure 6.** Placental-like alkaline phosphatase (PLAP) immunofluorescence (a) and in situ enzyme AP activity (b) in the Ishikawa endometrial carcinoma cell line. Nuclei are labeled with DAPI (c). Merge image (d) shows that precipitates are formed in cells expressing PLAP. Note that activity microphotograph (b) was obtained in gray scale, and in consequence blue deposits are visualized in black. Scale bar is 25  $\mu\text{m}$ .

### 3. Conclusions

In conclusion, in situ histochemistry for ecto-nucleotidases is an easy-to-perform, reproducible technique suitable for tissues and cells. The combined technique allows identification of the protein that has a precise enzyme activity. The technique is suitable for testing enzyme inhibitors.

### Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI15/00036), co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)—“a Way to Build Europe”—/FONDOS FEDER “una manera de hacer Europa”, and a grant from the Fundación Merck Salud (Ayuda Merck de Investigación 2016-Fertilidad). ARM was awarded a fellowship from the Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). We thank CERCA Programme (Generalitat de Catalunya) for the institutional support. We are grateful to Serveis Científics I Tecnològics (Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona) for the technical support. The authors thank Tom Yohannan for language editing.

**Figure 5** is reprinted by permission of Springer Nature Histochemistry and Cell Biology, Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and *in situ* enzyme activity, Villamonte et al. [21]. License number: 4487101229606.

### Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this book chapter.

IntechOpen

IntechOpen


### **Author details**

Mireia Martín-Satué\*, Aitor Rodríguez-Martínez and Carla Trapero  
Unit of Histology, Department of Pathology and Experimental Therapeutics,  
Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Barcelona; Bellvitge  
Biomedical Research Institute (IDIBELL)—CIBERONC, Barcelona, Spain

\*Address all correspondence to: [martinsatue@ub.edu](mailto:martinsatue@ub.edu)

### **IntechOpen**

---

© 2019 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 



## References

- [1] Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008;**1783**(5):673-694
- [2] Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;**49**(6):473-497
- [3] Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signalling*. 2012;**8**(3):437-502
- [4] Al-Rashida M et al. Ectonucleotidase inhibitors: A patent review (2011-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2017;**27**(12):1291-1304
- [5] Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2006;**2**(2):409-430
- [6] Baqi Y. Ecto-nucleotidase inhibitors: Recent developments in drug discovery. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2015;**15**(1):21-33
- [7] Vijayan D et al. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2017;**17**(12):709-724
- [8] Hosoda N et al. Inhibition of phosphodiesterase/pyrophosphatase activity of PC-1 by its association with glycosaminoglycans. *European Journal of Biochemistry*. 1999;**265**(2):763-770
- [9] Doñate F et al. AGS16F is a novel antibody drug conjugate directed against ENPP3 for the treatment of renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2016;**22**(8):1989-1999
- [10] Colgan SP et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling*. 2006;**2**(2):351-360
- [11] Bhattarai S et al. Alpha, beta-methylene-ADP (AOPCP) derivatives and analogues: Development of potent and selective ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;**58**(15):6248-6263
- [12] Fahs S, Lujan P, Kohn M. Approaches to study phosphatases. *ACS Chemical Biology*. 2016;**11**(11):2944-2961
- [13] Millán JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcified Tissue International*. 2013;**93**(4):299-306
- [14] Lowe D, John S. Alkaline Phosphatase. Treasure Island (FL): StatPearls; 2018
- [15] Buchet R, Millán JL, Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Methods in Molecular Biology*. 2013;**1053**:27-51
- [16] Simko V. Alkaline phosphatases in biology and medicine. *Digestive Diseases*. 1991;**9**(4):189-209
- [17] Sebastián-Serrano Á et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase regulates purinergic transmission in the central nervous system during development and disease. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2015;**13**:95-100
- [18] Wachstein M, Meisel E. Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH; with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *American Journal of Clinical Pathology*. 1957;**27**(1):13-23
- [19] Gossrau R. Azoindoxyl methods for the investigation of hydrolases. IV.

Suitability of various diazonium salts  
(author's transl). *Histochemistry*.  
1978;57(4):323-342

[20] Kirino M et al. Evolutionary origins  
of taste buds: Phylogenetic analysis  
of purinergic neurotransmission in  
epithelial chemosensors. *Open Biology*.  
2013;3(3):130015

[21] Villamonte ML et al. Characteri-  
zation of ecto-nucleotidases in human  
oviducts with an improved approach  
simultaneously identifying protein  
expression and in situ enzyme activity.  
*Histochemistry and Cell Biology*.  
2018;149(3):269-276

[22] Langer D et al. The  
ectonucleotidases alkaline phosphatase  
and nucleoside triphosphate  
diphosphohydrolase 2 are associated  
with subsets of progenitor cell  
populations in the mouse embryonic,  
postnatal and adult neurogenic zones.  
*Neuroscience*. 2007;150(4):863-879

IntechOpen





## ANNEX 2

### Revisió: La senyalització purinèrgica en el dolor associat amb l'endometriosis

**Purinergic Signaling in Endometriosis-Associated Pain.**

Trapero C, Martín-Satué M. *Int J Mol Sci.* **2020**; 21(22):8512.

doi: 10.3390/ijms21228512





Review

# Purinergic Signaling in Endometriosis-Associated Pain

Carla Trapero <sup>1,2</sup>  and Mireia Martín-Satué <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona, 08907 Barcelona, Spain; ctrapero@ub.edu

<sup>2</sup> Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Oncobell Program, CIBERONC, 08908 Barcelona, Spain

\* Correspondence: martinsatue@ub.edu

Received: 9 October 2020; Accepted: 10 November 2020; Published: 12 November 2020



**Abstract:** Endometriosis is an estrogen-dependent gynecological disease, with an associated chronic inflammatory component, characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity. Its predominant symptom is pain, a condition notably altering the quality of life of women with the disease. This review is intended to exhaustively gather current knowledge on purinergic signaling in endometriosis-associated pain. Altered extracellular ATP hydrolysis, due to changes in ectonucleotidase activity, has been reported in endometriosis; the resulting accumulation of ATP in the endometriotic microenvironment points to sustained activation of nucleotide receptors (P2 receptors) capable of generating a persistent pain message. P2X3 receptor, expressed in sensory neurons, mediates nociceptive, neuropathic, and inflammatory pain, and is enrolled in endometriosis-related pain. Pharmacological inhibition of P2X3 receptor is under evaluation as a pain relief treatment for women with endometriosis. The role of other ATP receptors is also discussed here, e.g., P2X4 and P2X7 receptors, which are involved in inflammatory cell–nerve and microglia–nerve crosstalk, and therefore in inflammatory and neuropathic pain. Adenosine receptors (P1 receptors), by contrast, mainly play antinociceptive and anti-inflammatory roles. Purinome-targeted drugs, including nucleotide receptors and metabolizing enzymes, are potential non-hormonal therapeutic tools for the pharmacological management of endometriosis-related pain.

**Keywords:** endometriosis; ATP; adenosine; P2Y; P2X; ectonucleotidases; pain; inflammation; endometrium; CD73; CD39

## 1. Introduction

Endometriosis is an estrogen-dependent gynecological disease characterized by the presence of endometrial tissue, glands, and stroma outside the uterine cavity, including the ovaries, pelvic peritoneum, and gastrointestinal tract, among other locations. In fact, depending on the location and characteristics, there are three different subtypes of endometriosis: peritoneal, ovarian, and deep infiltrating endometriosis [1]. It is estimated that this debilitating disease affects around 10% of women of reproductive age, but the true prevalence is difficult to quantify due to its unspecific symptoms and the lack of non-invasive diagnostic techniques that complicates diagnosis and can sometimes lead to misdiagnoses. Moreover, around 20–25% of women remain asymptomatic [2–4]. Even though pathogenesis of endometriosis is uncertain, the most widely accepted theory is the retrograde menstruation, described by Sampson, that includes three events that have to occur for endometriosis to develop: (i) menstrual blood flow backwards into the pelvic cavity (retrograde menstruation); (ii) the presence of available cells in menstrual debris; and (iii) the ectopic establishment

and growth of endometrial cells [5]. More research on endometriosis is needed to fill the gaps in our understanding of its pathogenesis so as to help develop new diagnostic and therapeutic tools.

Associated with endometriosis is a chronic inflammatory component necessary for the establishment and progression of endometriotic lesions and which is related with its main symptoms and signs [6–9]. The main clinical features defining this disorder are pain and infertility, with the most common symptoms being cyclic pelvic pain, dysmenorrhea (painful menstrual periods), dyspareunia (painful sexual relations), dysuria (painful urination), and dyschezia (painful defecation) [10]. Different types of pain have been described in endometriosis: nociceptive, inflammatory, neuropathic, and a mixture of all of them. Interestingly, the predominant type of pain, its intensity, and its cyclicity vary between patients without a clear correlation between the scope of endometriotic lesions and pain experience [11]. This turns endometriosis-associated pain into a complex symptom that is difficult to manage.

Current treatments, both pharmacological and surgical, are addressed to providing symptom relief and are mainly focused on complex pain management, without effective results for all patients [11]. Several studies are attempting to overcome these obstacles by identifying molecular targets to develop new therapeutic approaches to improve the quality of life of affected women.

In recent decades, a large body of data has been published on the role of purinergic signaling in different inflammatory pathologies and its possible use as therapeutic target. The purinergic system is the extracellular signaling with biological effects mediated by nucleotides, such as adenosine triphosphate (ATP), and nucleosides, such as adenosine, involved in a wide range of physiological and pathological inflammatory conditions and in pain generation and transmission [12]. The purinergic signaling complex of a cell is sometimes referred to as the purinome [13]. In recent years, several studies have shown the involvement of purinome elements in endometriosis, but few studies have assessed their role as therapeutic targets for the endometriosis-derived chronic pain.

In this review, we aim to highlight the role of purinergic signaling in the pathogenesis and pathophysiology of endometriosis-associated pain. This information may be useful in presenting the molecular mechanisms underlying endometriosis-associated pain and toward the development of novel pharmacological approaches for endometriosis treatment.

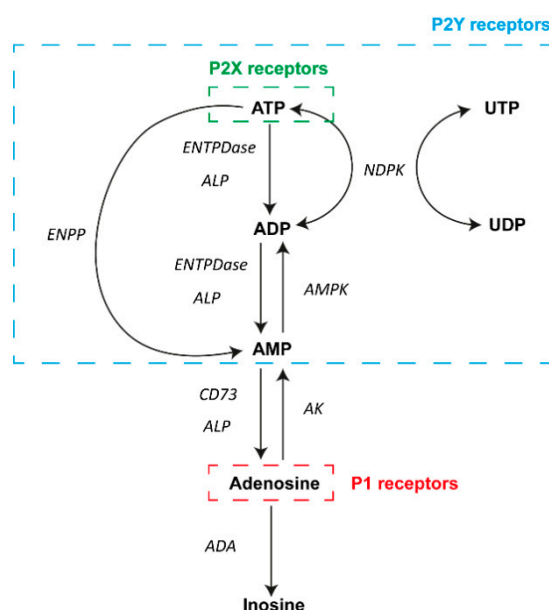
## 2. Overview of Purinergic Signaling

Extracellular ATP and adenosine are the main purinergic mediators, with multiple roles in physiology and pathophysiology. The release of endogenous nucleotides and nucleosides into extracellular space by different cells in response to cell injury, necrosis, apoptosis, or various mechanical and chemical stimuli represents the beginning of the purinergic signaling cascade, which eventually induces an inflammatory response [12,14].

Under physiological conditions, extracellular ATP concentrations are low (submicromolar levels). However, with the release of endogenous ATP under situations such as inflammation, there is a marked increase of these levels [15].

To avoid sustained ATP signaling and the adverse effects of increased extracellular ATP levels, ectonucleotidases act extracellularly by degrading ATP into adenosine. Ectonucleotidases are specialized nucleotide-hydrolyzing enzymes, broadly expressed at the cell surface of many tissues, which, acting alone or sequentially, control nucleotide and nucleosides levels in the extracellular milieu (Figure 1). Four families of ectonucleotidase have been described: (i) the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPDase) family (also known as CD39 family), with NTPDase1 (CD39), -2, -3, and -8 as plasma membrane-bound members, which hydrolyze extracellular ATP to adenosine diphosphate (ADP), and ADP to adenosine monophosphate (AMP); (ii) the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP) family, which converts ATP to AMP and inorganic pyrophosphate (PPi); (iii) the 5'-nucleotidase family, with only one membrane-bound member, the ecto-5'-nucleotidase, also known as CD73, which hydrolyzes AMP to adenosine; and (iv) the alkaline

phosphatase (ALP) family, able to hydrolyze adenine nucleotides and pyrophosphate, releasing inorganic phosphate (Pi) [12,16].



**Figure 1.** Diagram of the main elements of purinergic signaling. In the extracellular milieu, adenosine and nucleotides can activate P1 and P2 receptors on the surface of a wide variety of cell types. A number of different nucleotides can activate P2Y receptors (blue box), and ATP can also activate P2X receptors (green box). In contrast, adenosine actions involve the activation of P1 receptors (red box). Different enzymes are involved in the metabolism of adenosine and ATP in the process of achieving transient signaling. Abbreviations: adenosine triphosphate, ATP; adenosine diphosphate, ADP; adenosine monophosphate, AMP; uridine triphosphate, UTP; uridine diphosphate, UDP; ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase family, ENTPDase; alkaline phosphatase family, ALP; ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family, ENPP; ecto-5'-nucleotidase, CD73; nucleoside diphosphate kinase, NDPK; AMP-activated protein kinase, AMPK; adenosine kinase, AK; adenosine deaminase, ADA.

Adenosine also has important biological functions. In general, adenosine has been linked mainly to an anti-inflammatory effect. There are two enzymes responsible for adenosine metabolism: adenosine deaminase (ADA) and adenosine kinase (AK). ADA is a cytoplasmic enzyme but also an ectoenzyme that regulates intra- and extracellular adenosine levels, catalyzing the adenosine deamination yielding inosine [12]. As ectoenzyme, ADA is expressed as a soluble form or as membrane-associated enzyme-forming complexes with CD26/dipeptidyl peptidase IV in humans. AK is a cytosolic enzyme that catalyzes the phosphorylation of intracellular adenosine to AMP [12].

Once in the extracellular microenvironment, adenosine and nucleotides can activate two different purinergic receptor families, P1 and P2, respectively, which are widely and differentially expressed in the surface of most cells. Adenosine binds to P1 receptors, which are G protein-coupled receptors classified into four subtypes:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ , and  $A_3$  [17]. These receptors mainly act via adenylate cyclase (AC) activity, modulating cyclic AMP (cAMP) production. The stimulation of the  $A_{2A}$  and  $A_{2B}$  receptors induces activation of AC, increasing second-messenger cAMP levels. In contrast, the activation of the  $A_1$  and  $A_3$  receptors inhibits AC, causing a decrease in cAMP production [17]. Furthermore,  $A_3$  and  $A_{2B}$  receptors lead to the activation of phospholipase C (PLC) and an increase in intracellular calcium levels [18,19]. Moreover,  $A_1$  receptor is involved in the opening of  $K^+$  channels [18,19]. Cation mobilization triggered by adenosine receptors leads to transmission and modulation of pain. In addition, adenosine receptors stimulate mitogen-activated protein kinases (MAPK), regulating



growth and proliferation, apoptosis, necrosis, and inflammation, essential for the development of endometriosis [20].

In addition, P2 receptors are nucleotide-selective and include P2X and P2Y receptor subtypes. The ionotropic P2X receptors, comprising seven subtypes (P2X1–P2X7), are ligand-gate ion channels strictly activated by extracellular ATP to mediate K<sup>+</sup> efflux, and Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> influx, which mainly mediate short-term (acute) purinergic signaling, and which play an important role as mediators of fast excitatory neurotransmission in the central and peripheral nervous system [17,21]. The metabotropic P2Y receptors are G protein-coupled receptors that activate PLC- $\beta$  (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, and P2Y<sub>11</sub>) or inhibit AC (P2Y<sub>11–14</sub>). The P2Y receptors have distinctive nucleotide preferences and, based on this, they can be divided in three groups: (i) adenine nucleotide-preferring receptors, mainly responding to ATP (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, and P2Y<sub>11</sub>) and ADP (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>); (ii) uracil nucleotide-preferring receptors, activated by UTP (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, and P2Y<sub>6</sub>) and/or UDP (P2Y<sub>6</sub> and P2Y<sub>14</sub>); and (iii) the P2Y<sub>14</sub> nucleotide sugar-preferring receptor, responding to UDP sugars, such as UDP-glucose and UDP-galactose [17,22,23]. P1 and P2Y G protein-coupled receptors are predominantly involved in long-term (trophic) purinergic signaling, such as that found in remodeling, repair, and regeneration events in response to injury. P1 and P2Y receptors are involved in the regulation of proliferation, differentiation, motility, migration, and cell death [21], which are essential processes for the establishment of endometriotic lesions and the progression of endometriosis.

Correct expression and function of the purinome are essential to maintaining tissue homeostasis. Changes in ATP/adenosine balance and in the purinergic receptor activation state can alter the behavior of a wide range of cell types. These changes can trigger a pathological state or promote the progression of a disease, as may occur in endometriosis.

### 3. Purinergic Signaling in Eutopic and Ectopic Endometrial Tissue

Extracellular purines and pyrimidines play multiple roles in fertilization and embryo development [24,25]. This is made possible by different elements of the purinome, such as purinergic receptors and ectonucleotidases, present in both male and female reproductive organs [26–33].

Endometrium, the innermost layer of the uterus, contains the surface epithelium, the glandular epithelium, and a vascularized stroma. It is a dynamic tissue undergoing repetitive cycles of regeneration and degeneration in which a certain degree of inflammation is physiological. Purinergic signaling plays a role in both inflammation and reproduction and contributes to correct endometrial function. Therefore, it is not surprising that any change in purinergic signaling can alter uterine function and fertility in women, as happens in endometriosis. In addition, purinergic signaling is involved in the control of a number of cell events, such as cell proliferation, migration, and survival, but it is also seen in phenomena such as angiogenesis and fibrosis (reviewed in [34–36]), thus becoming a candidate pathway for playing a causative role in the pathogenesis and development of this disease.

Therefore, the characterization of the purinome elements of eutopic endometrium and endometriotic lesions is essential in order not only to elucidate the role of purinergic signaling in the pathogenesis, but also to identify the main symptoms and signs of endometriosis and new therapeutic targets. Moreover, knowledge of the microenvironment of ectopic lesions can improve understanding of the generation and neurotransmission of pain signals in endometriosis. We present below current knowledge on the expression of ectonucleotidases, the main elements of the purinome regulating the levels of nucleotides and nucleosides in eutopic and ectopic microenvironments.

#### *Ectonucleotidases in the Eutopic and Ectopic Endometria of Women with Endometriosis*

Ectonucleotidases are hormone-sensitive enzymes that vary their expression in the endometrium throughout the menstrual cycle [26]. NTPDase2, NTPDase3, NPP1, NPP3, ALP, CD26, and CD73 are expressed by endometrial epithelial cells, while NTPDase1, NTPDase2, and CD73 have been detected in endometrial stromal cells [26]. Although the ectonucleotidases studied to date are mainly present in the endometrial epithelium, most of the changes detected in endometriosis occur in the stroma [37].

Changes in eutopic endometrium of women with endometriosis in comparison with the endometrium of women without the pathology have been detected [26,37]. Moreover, differences between the different types of endometriotic lesions have been described [37]. One notable change in endometriosis is the expression of NPP3. Several studies of NPP3 expression in endometrial tissue have localized the protein in epithelial cells, with changes along the cycle [26,38,39]. In endometriosis, however, NPP3 is found to be expressed by the stroma, as well as the epithelium, in both eutopic and ectopic endometrial tissues [37]. This *de novo* expression of NPP3 points to its use as a putative histopathological marker of the disease. It has to be noted that although there is no protein expression of NPP3 in the endometrial stroma of women without endometrial pathology, Boggavarapu et al. detected more than double the levels of NPP3 mRNA in the stroma compared to glandular compartment [40]. All of this points to post-translational regulation of protein levels that needs to be further studied. This increased expression of NPP3 in endometrial tissue coincides with the increased ectonucleotidase activity detected in the fluid content of ovarian endometriomas [41]. These results suggest an increase in ATP metabolism, with a concomitant increase in extracellular adenosine levels, as observed in some cancers, in which high levels of adenosine in the tumor microenvironment induce suppression of the local immune response [42,43]. Conversely, the detection of one hundred times higher levels of ADA in the contents of endometriomas refutes the idea of adenosine accumulation [44]. Moreover, the great decrease in, or even the total loss, of the CD39–CD73 axis in endometrial tissue in endometriosis further suggests that extracellular adenosine synthesis is rather limited. [37]. In fact, these data suggest a relation between extracellular ATP accumulation and the severity and progression of endometriosis, since the loss of CD39–CD73 is related to deep infiltrating endometriosis, the most severe form of the illness with high recurrence rates and a high level of associated pain [45,46].

The consequences of the increase in extracellular ATP levels and the subsequent activation of purinergic signaling through P2 receptors in endometriosis-associated pain are discussed throughout this review.

## 4. Involvement of Purinergic Signaling in Endometriosis-Associated Pain

### 4.1. Endometriosis-Associated Pain

Pain is recognized as the most common symptom and the primary reason for medical assistance in women with endometriosis. In fact, up to 80% of patients present chronic pain, the most common forms being dysmenorrhea, non-cyclical pelvic pain (chronic pelvic pain), dyspareunia, dysuria, and dyschezia [2]. Endometriosis-associated pain has, in turn, negative effects on women's mental health, including anxiety and depression, thereby altering their quality of life and that of their loved ones [47,48]. For this reason, there is an urgent need to define the molecular mechanisms underlying endometriosis-associated pain to uncover therapeutic targets to minimize the suffering and raise the quality of life of affected women.

Endometriosis-associated pain is complex, and the underlying mechanisms seem to be related to the activation of the peripheral nervous system, involved in nociceptive (a response to a noxious stimulus), inflammatory (due to tissue damage and inflammatory response), and neuropathic (due to a lesion in somatosensory nervous system) pain, and central nervous systems, related with sensitization and hyperalgesia processes [49,50]. The stage of endometriosis, as classified by the American Society of Reproductive Medicine (ASRM), poorly correlates with the degree of pain or symptoms severity, thus hampering clinical management [11].

In recent years, many articles concerning endometriosis-associated pain and treatments for pain-relief have been published (reviewed in [10,11,49,51–63]); independently, the purinergic mechanisms involved in pain (reviewed in [18,64–70]) are also being studied. However, purinergic signaling in relation to endometriosis-associated pain has yet to be fully explored. In the following section, we look at the involvement of the purinergic signaling in pain, especially in peripheral, but also in central processes, in the context of endometriosis.

#### 4.1.1. The Pain Pathway

The neural process of pain starts with a peripheral noxious stimulus detected by the nociceptors on small diameter sensory afferent nerves (fibers A $\delta$  and C) and its transduction into an electric signal. These neurons, which innervate viscera, have the cell bodies in the dorsal root ganglia (DRG) and reach the lamina I-II of the dorsal spinal cord. This information is transmitted along the spinal cord to the brain, where the unpleasant experience called pain is generated. Although multiple painful conditions have their origin in the sensitization and excitation of neurons, immune and glial cells also play key roles in the generation and maintenance of pain signaling [71,72]. Indeed, the pain perceived can be altered, amplified, or reduced by many molecules, including ATP, released from these non-neuronal cells through different mechanisms required for the transition from acute to chronic pain [72,73]. ATP is a peripheral mediator of pain involved in the initiation of this pain perception.

There is evidence that endometriotic lesions are innervated. This innervation is mainly sympathetic, and sensory nerve fibers play a pivotal role in endometriosis-associated pain [74–78]. The inflammation, concomitant to the initial establishment of an endometriotic focus outside the uterus, activates sensory afferent neurons innervating adjacent visceral structures, transmitting the noxious stimulus to the spinal dorsal horn and causing pain. Moreover, local inflammatory cells release neurotrophic factors encouraging the new innervation and cytokines that lead to the implantation of endometrial ectopic cells. Neuronal and non-neuronal cells of endometriotic lesions can release ATP that in turn regulates the action of these cells. For example, the release of ATP and neurotransmitters by afferent neurons also activates spinal glial cells, contributing to central sensitization and overstated pain.

Endometriotic foci present cyclic proliferative and destructive phases similar to the endometrium. During the breakdown of a part of a lesion, high levels of ATP are released in the lesion microenvironment, acting as an acute danger signal on sensory nerve endings of the lesion. Moreover, this internal bleeding in the ectopic locations often leads to local inflammatory reactions that promote the inflammatory state and the release of molecules involved in the pain signaling pathway. In addition, ATP has the potential to modify the pain signaling by activation of pre- and post-synaptic P2 receptors. The two classes of P2 receptors are involved in pain: P2X receptors in short-term neurotransmission responses and P2Y receptors in the slow and continuous pain signaling.

The high levels of extracellular ATP in the ectopic milieu, together with the loss of the CD39–CD73 axis, turns purinergic signaling into a precious source of possible therapeutic targets for endometriosis-associated pain treatment. The role of ATP and adenosine in the pain signaling pathway in the context of endometriosis is reviewed in detail below.

#### 4.1.2. P2X Receptors in Primary Sensory Neuron: The Outset of Nociception

*P2X3 and P2X2/3 receptors.* P2X3 and P2X2/3 receptors are expressed in terminals of nociceptive fibers and in the sensory neurons of the central nervous system. Homomeric P2X3 receptors mediate transient nociceptive responses through rapidly desensitizing current, and heteromeric P2X2/3 receptors mediate sustained nociceptive responses through a slowly desensitizing current [79]. They mediate neuropathic pain, including inflammatory pain, in acute and chronic processes, and are involved in hyperalgesia and allodynia [80]. In fact, sensory neurons which express transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) channels and/or P2X3 receptors are essential for the initiation and transduction of nociception and the signaling of pain. Both TRPV1 and P2X3 induce Ca<sup>2+</sup> influx which activates a cascade of changes, including the phosphorylation of ion channels with the consequent increase in the excitability of sensory neurons.

Estrogens upregulate the expression of both the cation channel TRPV1 and P2X3 receptors of nerve fiber terminals in endometriosis [81]. The implication of TRPV1 in endometriosis-associated pain is clear, but the precise role of P2X3 is still under study, although there is increasing evidence of its central role in the onset of pain sensation in endometriosis. Ding et al. detected the expression of P2X3 in endometriotic epithelial and stromal cells but also in the sensory nerve fibers within endometriotic

lesions [82]. Moreover, they positively correlated the levels of P2X3 receptor in endometriotic lesions with the severity of pain [82].

The activation of P2X3 receptor in nerve fibers leads to the release of endogenous ATP via pannexin-1 hemichannels, triggering the activation of P2 receptors of sensory nerve fibers [83]. In addition, this ATP efflux can be enhanced by nerve growth factors [83]. Persistent extracellular ATP with the concomitant P2X3 and P2X2/3 receptor activation has been linked to the induction and the early maintenance phases of allodynia, a clinical manifestation of chronic pain present in endometriosis [84,85].

In rats, the induction of endometriosis produces thermal and mechanical hyperalgesia. Moreover, endometriosis causes the elevation of endogenous ATP content and P2X3 receptor expression in endometriotic and DRG tissues, which correlate with the severity of hyperalgesia in these animals [86]. In fact, the implication of ATP and P2X3 in endometriosis-associated pain was also confirmed, since administration of A-317491, a selective P2X3 receptor antagonist, attenuated endometriosis-associated pain in rats [87].

Study of the upregulation of P2X3 receptor in endometriosis-related pain showed ATP and ADP, but not UTP, as the effector molecules of this process [86]. In accordance with P2 receptor affinities, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub>, and/or P2Y<sub>13</sub> receptors could be responsible for this upregulation. Ding et al. determined that P2X3 upregulation by ADP is mediated by the activation of the transcription factors ATF3 and AP-1 [86]. Moreover, based on the literature, they discussed the possible role of P2Y<sub>1</sub> as the promoter of this pathway, but functional studies are needed to confirm this point [86].

Hence, extracellular ATP seems to have a close relationship with initiation, amplification, and maintenance of endometriosis-related pain [87]. In a persistent damaging inflammatory microenvironment, such as the one generally found in the peritoneum of women with endometriosis, high levels of inflammatory mediators are detected. Endometrial cells and immune cells in the ectopic lesions secrete different inflammatory mediators such as interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) [71,88], as well as growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), neurotrophin nerve growth factor (NGF), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), often promoted by the presence of high estrogen levels [71,89–91]. These factors not only promote the inflammatory state and the aberrant neuroangiogenic milieu, but are also involved in processes that reduce the threshold of ion channels of sensory fibers, increasing their membrane excitability and the expression of receptors involved in nociception, thus favoring the activation of pain signaling pathway. These molecules promote the release of endogenous ATP during inflammation with the subsequent activation of P2X3 and P2X2/3 receptors, allowing Ca<sup>2+</sup> influx and depolarization in nearby nociceptive fibers of the endometriotic foci and leading to the sensitization of sensory neurons, which send the pain message to the central nervous system. Therefore, ATP triggers the purinergic signaling cascade in nervous cells involved in pain symptoms. However, P2X3 activation by ATP as a potential action generator is only the beginning of ATP participation in the pain signaling pathway, as shown below.

The activation of the receptors tyrosine kinase A (TrkA), p75, and VEGFR2 in primary sensory neurons mediated by NGF and VEGF, secreted by endometriotic and immune cells, triggers the upregulation of P2X3, causing repeated neuronal sensitization by increased P2X3 receptor signaling and provoking a persistent sensation of pain [92,93]. Moreover, NGF plays a role in the production of the neuropeptide substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP), which sensitize the sensory nerve fibers, stimulate the immune system, cause the degranulation of mast cells, and promote fibrosis of the lesion through activation of their receptors neurokinin-1 receptor (NK1R) and calcitonin gene-related peptide receptor (CGRPR), respectively [94,95]. Moreover, the high levels of estrogens detected in the microenvironment of endometriotic lesions trigger the degranulation and secretion of NGF by mast cells [96]. Mast cell granules contain inflammatory mediators and neuro-sensitizing molecules including IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and histamine, which, once released into the endometriotic milieu, encourage nerve sensitization and the inflammatory state [97].

#### 4.1.3. P2Y Receptors in Primary Sensory Neuron: The Modulation of Nociception

Primary sensory neurons also express P2Y receptors and their role is mainly pain modulation. P2Y receptors potentiate pain induced by chemical or physical stimuli via capsaicin-sensitive TRPV1 channels and facilitate the P2X receptor-mediated currents [98,99].

*P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors.* Activation of P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors is involved in the activation of TRPV1 channels of nociceptors. Although in humans it is not clear, in rats, upregulation of TRPV1 channel expression by P2Y<sub>1</sub> receptors is mediated via p38/MAPK [100,101]. Therefore, it is probably the case that ATP and ADP are involved in short- and long-term effects in nociceptors. On the one hand, they can play a role in the modulation of Ca<sup>2+</sup> influx that potentiates the sensitization of sensory neurons, while, on the other hand, they may be involved in the long-term nociceptor changes that produce hyperalgesia through the upregulation of TRPV1 channels. Moreover, as stated above, P2Y<sub>1</sub> may also play a role in the upregulation of P2X3 receptor ion channel in endometriosis-associated pain [86]. In inflammation, P2Y<sub>2</sub> receptor upregulation occurs in sensory neurons of inflamed tissue [98,102]. ATP (and UTP) stimulus on P2Y<sub>2</sub> receptors activates TRPV1 channels [103]. This points to the contribution of ATP to chronic inflammatory pain, and therefore, endometriosis.

#### 4.1.4. P2X4 and P2X7 in Macrophage–Nerve Interaction: The Base of Inflammatory Pain

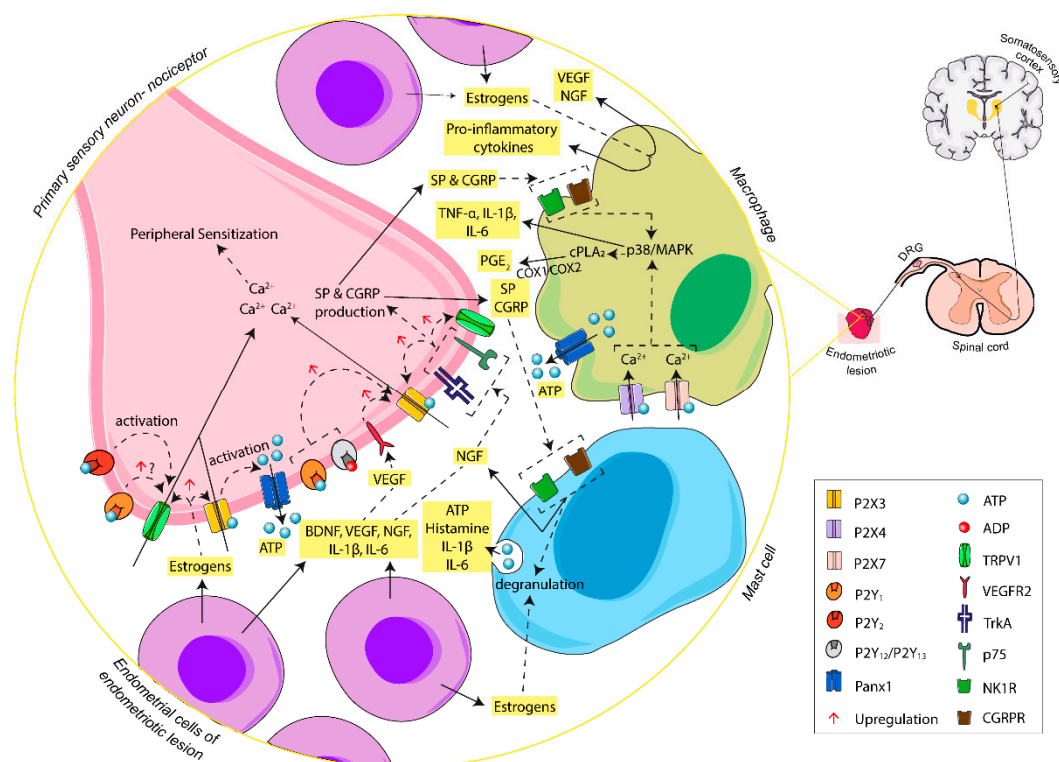
As a consequence of the inflammatory process, large numbers of macrophages, mastocytes, and neutrophils are recruited in the endometriotic focus and macrophages infiltrate DRG [71,96,104]. Macrophages are among the most numerous immune cells in endometriotic lesions. They produce pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6, which intervene in the pain phenomena [105] and have a role in endometriosis-associated pain (reviewed in [71]). The activation of P2 receptors expressed by immune cells, such as P2X7 and P2X4 receptors in macrophages [106], allows the activation of the immune system via ATP and leads to the production of cytokines, thus maintaining the persistent inflammatory state. Moreover, the activation of macrophage P2X4 receptors is involved in the release of COX-dependent release of prostaglandin E2 (PGE2), mediated by cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) [107]. PGE2 is involved in the sensitization of primary sensory neurons [107]. The interaction among endometrial cells, inflammatory cells, and peripheral sensory neurons at the ectopic foci, and the ATP-mediated molecular pathways, are represented in Figure 2.

#### 4.1.5. P2 Receptors in Activated Microglia: The Modulation of Pain Transmission

Endometriosis-associated pain is not only inflammatory but also neuropathic [82,108]. Nerve damage and persistent stimulation of peripheral fibers can lead to the secretion of inflammatory neurotransmitters and neuromodulators from nerve fibers, including ATP, which acts on glial cells. In the meantime, glial cells react, becoming the main source of neuroactive substances, including pro-inflammatory cytokines, trophic factors, and neurotransmitters (such as ATP), which regulate neuronal excitability and are fundamental to the transition from acute to chronic pain.

P2 receptors are present in the surface of activated spinal microglia and are involved in the recruitment and activation of microglia and the interaction between neurons and microglia (summarized in Figure 3). All of these play important roles in neuropathic pain, mainly in allodynia and hyperalgesia, and in neuroinflammation.





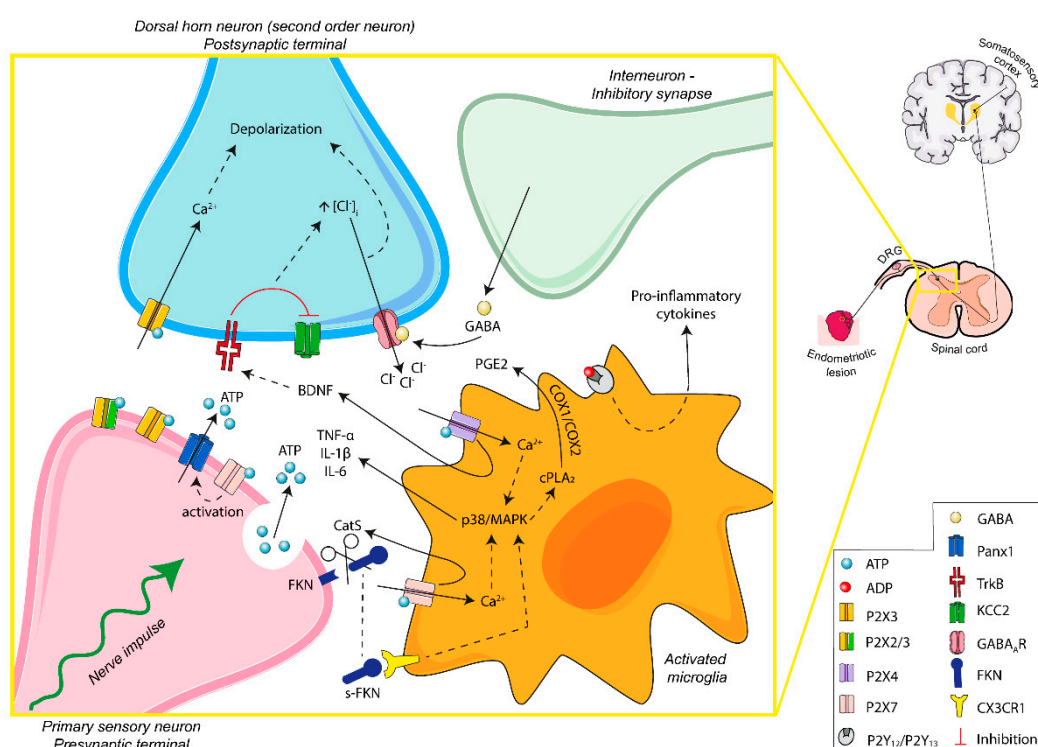
**Figure 2.** Schematic summary of the involvement of ATP, through activation of P2X and P2Y receptors, in the initiation of endometriosis-associated pain. In the endometriotic lesion, ATP, released by different cell sources, carries out  $\text{Ca}^{2+}$  influx via P2X3 receptor activation at the endings of primary sensory neurons, triggering a cascade of changes that increase the excitability of afferent sensory neurons. The activation of P2Y receptors potentiates the action of P2X3 receptor and TRPV1, triggering induction of nociception and the maintenance of overstated pain. Moreover, ectopic endometrial cells and inflammatory cells of the lesion release inflammatory mediators that boost nerve sensitization and promote the inflammatory state typical of women with endometriosis. Abbreviations: adenosine triphosphate, ATP; adenosine diphosphate, ADP; pannexin-1, Panx1; brain-derived neurotrophic factor, BDNF; neurotrophin nerve growth factor, NGF; tyrosine kinase A receptor, TrkA; p75 neurotrophin receptor, p75; vascular endothelial growth factor, VEGF; vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2; interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ ; interleukin-6, IL-6; tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ; substance P, SP; neurokinin-1 receptor, NK1R; calcitonin gene-related peptide, CGRP; calcitonin gene-related peptide receptor, CGRPR; transient receptor potential vanilloid-1 channel, TRPV1; p38 mitogen-activated protein kinases, p38/MAPK; cytosolic phospholipase A2, cPLA<sub>2</sub>; prostaglandin E2, PGE2; cyclooxygenase-1 and -2, COX-1/COX-2; dorsal root ganglia, DRG.

Apparently, the activation of microglial P2 receptors, particularly P2X4 and P2X7, promotes neuronal excitability. Therefore, blocking microglia–neuron signaling must be considered as a possible therapeutic strategy for treating endometriosis-associated pain.

**P2X4 receptor.** The role of the P2X4 receptor in activated microglia in endometriosis-associated pain has not yet been studied, but P2X4 receptor involvement in neuropathic pain is clear. Following peripheral nerve injury, P24 receptor is expressed by the microglia of the dorsal horn [109]. The activation of P2X4 receptor causes  $\text{Ca}^{2+}$  flux and p38/MAPK activation, which promotes the synthesis and release of BDNF, a key molecule for maintaining pain hypersensitivity. ATP-mediated BDNF release from activated microglia, via its receptor TrkB, mediates the downregulation of the  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter KCC2 in dorsal horn neurons. KCC2 maintains the anion gradient necessary for the inhibitory actions of gamma-aminobutyric acid (GABA) through gamma-aminobutyric acid A receptor (GABA<sub>A</sub>R). KCC2 downregulation increases intracellular chloride levels, allowing the accumulation of anions in dorsal horn neurons. Meanwhile, GABA is released from inhibitory interneurons. GABA



activates the GABA<sub>A</sub>R on dorsal horn neurons with the subsequent chloride outflow, causing the depolarization of the second order neurons. Hence, BDNF alters the chloride gradient of dorsal horn neurons, triggering a decrease in the inhibitory control of the GABAergic interneurons. Consequently, there is an increase in dorsal horn neuron excitability that enables low threshold information to gain access to nociceptive circuits. This evokes pain transmission and neuropathic pain [109–111]. In addition, P2X4 receptor, through p38/MAPK activation, leads to the synthesis and release of pro-inflammatory cytokines and increases the expression of COX, enhancing PGE2 levels, involved in pain-related inflammatory responses and dorsal horn neuronal excitability [112,113]. It is noteworthy, however, that P2X4 is not the only one. The activation of P2X7 (by ATP) and P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors (by ADP) also induces microglial pro-inflammatory cytokine release, upregulating excitatory synaptic transmission in the dorsal horn and participating in neuropathic pain [112,114–116]. Moreover, these P2 receptors can be activated by the release of ATP by spinal astrocytes, promoting cytokine production and a pro-inflammatory milieu [117].



**Figure 3.** Schematic overview of ATP signaling in microglia–nerve interaction in endometriosis-associated pain. Persistent stimulation of peripheral fibers leads to the release of ATP into the synaptic space. The activation of P2X3 receptors of postsynaptic terminals induces excitability of dorsal horn neurons. Moreover, P2X4 and P2X7 receptors of activated microglia are involved in the secretion of neuroactive substances, contributing to the microglia–nerve interaction needed for central sensitization and modulation of the sensation of pain. ATP-mediated signaling is fundamental in the transition from acute to chronic pain, including endometriosis-related neuropathic and inflammatory pain. Abbreviations: adenosine triphosphate, ATP; adenosine diphosphate, ADP; pannexin-1, Panx1; brain-derived neurotrophic factor, BDNF; interleukin-1 beta, IL-1β; interleukin-6, IL-6; tumor necrosis factor alpha, TNF-α; gamma-aminobutyric acid, GABA; gamma-aminobutyric acid A receptor, GABA<sub>A</sub>R; p38 mitogen-activated protein kinases, p38/MAPK; cytosolic phospholipase A2, cPLA<sub>2</sub>; prostaglandin E2, PGE2; cyclooxygenase-1 and -2, COX-1/COX-2; fractalkine, FKN; soluble-fractalkine, s-FKN; cathepsin S, CatS; CX3C chemokine receptor 1, CX3CR1; tyrosine kinase B receptor, TrkB; potassium-chloride cotransporter 2, KCC2; dorsal root ganglia, DRG.

**P2X7 receptor.** P2X7 receptor functions as an ion channel, but sustained stimulation with large amounts of extracellular ATP induces its conformation as nonselective large pores in cell membrane. It

is present in microglia and plays a role in the maintenance of neuropathic pain. Specific inhibition of P2X7 receptor pore formation, without affecting its cation channel activity, reduces chronic pain [118].

In microglia, the activation of P2X7 receptor causes the release of the enzyme Cathepsin S (CatS). Extracellular CatS splits the chemokine domain of neuronal membrane-bound fractalkine (FKN) present in dorsal horn neurons. Soluble-FKN (s-FKN) interacts with microglia CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1), stimulates p38/MAPK, and promotes the release of cytokines that sensitize the second order neurons of the sensory pathway [119–121]. Liu et al. showed an increase in the expression of FKN/CX3CR1/p38/MAPK and in the amount of microglia in the dorsal horn of the sciatic nerve, in an endometriosis rat model [122]. This microglia–nerve crosstalk plays a role in central sensitization and could explain one of the mechanisms associated with hypersensitivity and allodynia in endometriosis. Moreover, increased levels of s-FKN were found in the peritoneal fluid of women with endometriosis [123]. In the ectopic endometrial lesions of a sciatic endometriosis model in rats, increased levels of FKN and s-FKN as well as CX3CR1 have been detected, with a positive correlation with the severity of hyperalgesia [122]. In ectopic lesions, membrane-bound FKN was found in the macrophage surface, whereas CX3CR1 was present in nerve fibers, specifically in Schwann cells. As previously noted, macrophages express P2X7 receptor, which could be an essential piece in FKN cleavage in the endometriotic foci. s-FKN can act as a CX3CR1 ligand as well as being a potent chemoattractant that would favor the development and maintenance of the inflammatory microenvironment in the ectopic lesion, mainly around nerve fibers. On the other hand, a direct interaction between macrophage membrane-bound FKN and CX3CR1 of Schwann cells has been suggested, which could cause myelin phagocytosis and activation of Schwann cells involved in peripheral sensitization in ectopic lesions. Therefore, P2X7 receptor could contribute to peripheral and central hypersensitivity in endometriosis [122].

Although microglial P2X7 receptor activation by presynaptic neurons is mainly related to the release of pro-inflammatory cytokines, it also causes more ATP release into the dorsal horn microenvironment. This is made possible by the increase in the intracellular calcium resulting from P2X7 action that activates pannexin-1. The increasing extracellular ATP levels potentiate purinergic signaling in pain effectors and induce chronification of pain [124].

#### 4.1.6. Adenosine and Adenosine Receptors (AR): Analgesic and Anti-Inflammatory Effects

Adenosine, the hydrolysis product of purine nucleotides such as ATP and ADP, often plays the opposite role to them, leading to a compensatory system in physiological and pathological conditions. In fact, endogenous adenosine has modulating effects on neuronal and glial cells with implications in pain transmission. For this reason, adenosine has been proposed as a potential analgesic target for nociceptive, inflammatory, and neuropathic pain. Therefore, the adenosine signaling pathway may be an interesting target to treat endometriosis-associated pain. However, determining the effects of adenosine in endometriosis-associated pain is quite complex. It has been experimentally proven that adenosine can produce antinociceptive and anti-inflammatory effects as well as their opposite, depending on the site of action, the receptor activated, the extent of exposure, and the context.

Although the role of P1 receptors in endometriosis-associated pain has not yet been studied, we briefly outline the different effects that have been described in the literature and their possible usefulness for the treatment of endometriosis-associated pain.

*A<sub>1</sub> adenosine receptor (AR).* A<sub>1</sub>AR is the main adenosine receptor associated with inhibitory neuromodulation of pain. A<sub>1</sub>AR regulates neurotransmitter release, neuronal excitability, and pain reduction. This high adenosine affinity receptor is expressed at peripheral sensory nerve endings [125], in dorsal horn neurons of the superficial layers of spinal cord [126], and in microglia [127].

A<sub>1</sub>AR is G<sub>i</sub>-coupled and its activation inhibits AC activity (inhibition of cAMP production), which leads to hyperpolarization by increasing potassium conductance, blocks transient calcium channel opening, and stimulates PLC, inducing an increase in inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) and intracellular Ca<sup>2+</sup> levels and stimulation of calcium-binding proteins such as protein kinase C (PKC) [128].

Furthermore, A<sub>1</sub>AR presynaptically inhibits primary sensory neuron transmission onto dorsal spinal neurons by blocking neurotransmitter release [126,129]. Moreover, when primary sensory afferent neurons depolarize, afferent nerve terminals release glutamate and SP, but also adenosine, in the dorsal spinal cord [129]. In this situation, adenosine can act as a negative modulator by activating A<sub>1</sub>AR at postsynaptic sites.

As mentioned, A<sub>1</sub>AR is also present in spinal cord microglia where it is upregulated by high levels of extracellular ATP. The activation of A<sub>1</sub>ARs curbs activation of microglia and blocks their role in neuronal sensitization [127].

Several clinical studies have demonstrated that specific A<sub>1</sub>AR stimulation results in analgesic effects sufficient to ameliorate nociceptive, neuropathic, and inflammatory pain (reviewed in [18,130]). This antinociception, and specifically the reduction of hyperalgesia in several pain models, suggests A<sub>1</sub>AR agonists as possible tools for treating endometriosis-associated chronic pain.

*A<sub>2A</sub>AR.* A<sub>2A</sub>AR is present in immune cells, neurons, and glial cells, among other cell types. In fact, A<sub>2A</sub>AR is considered a potential therapeutic target in treating chronic pain of neuroinflammatory origin. A<sub>2A</sub>AR action is, however, controversial due to an apparent dichotomy between peripheral and central signaling.

At the molecular level, A<sub>2A</sub>ARs are directly coupled to G<sub>s</sub> intracellular proteins, leading to the activation of AC (activation of cAMP production) with the consequent activation of the protein kinase A (PKA) and PKC signaling cascade. Increased cAMP levels in primary afferent neurons contribute to peripheral sensory nerve stimulation and increased excitatory neurotransmitter release in the spinal cord, enhancing nociception [131].

In addition, A<sub>2A</sub>AR is considered the main mediator of anti-inflammatory responses through its expression in a wide range of immune cells. A<sub>2A</sub>AR activation increases intracellular immunosuppressive cAMP in peripheral immune cells. This may contribute to reducing inflammatory pain by modulating these cells and consequently decreasing the levels of sensitizing substances (e.g., inflammatory cytokines from macrophages or histamine from mast cells) in the endometriotic microenvironment [130].

In addition, A<sub>2A</sub>AR modulates immunoresponses of microglia. As in peripheral immune cells, A<sub>2A</sub>AR agonists produce a cAMP signaling cascade that attenuates pro-inflammatory cytokine production and increases anti-inflammatory cytokine release, mainly IL-10. The reduction of the inflammatory state relieves neuropathic pain [132–135].

Conversely, under pathologic conditions, A<sub>2A</sub>AR activation is also related to a pro-inflammatory role [136,137]. During neuropathic pain, persistent activation of spinal microglia occurs. The sustained release of stimulating molecules such as BDNF in spinal cord exacerbates neuronal hypersensitivity and chronic neuroinflammation. As noted above, ATP mediates BDNF release via P2X4 receptor from activated microglia, as well as by adenosine via A<sub>2A</sub>AR. Constitutive release of BDNF is under the control of PKC, but, in some pathological conditions, upregulation of A<sub>2A</sub>AR in microglia has been detected. The high levels of intracellular cAMP and the subsequent activation of PKA prevails over PKC actions inducing increased BDNF release [137]. However, the increase in A<sub>2A</sub>AR levels in microglia is mainly described in brain with chronic neuroinflammation in cases with neurodegenerative diseases, where A<sub>2A</sub>AR interaction with several neurotransmitters plays an important role in pathology progression [138]. Further studies are needed to determine if A<sub>2A</sub>AR upregulation in activated microglia also occurs in endometriosis-associated pain. If that is the case, the therapeutic strategies involving A<sub>2A</sub>AR activation might not be good for the evolution of chronic pain related with endometriosis.

In conclusion, therapeutic tools that potentiate A<sub>1</sub>AR-mediated antinociceptive and A<sub>2A</sub>AR-mediated anti-inflammatory actions of adenosine could have analgesic effects that would be useful for the management of endometriosis-associated pain.

*A<sub>2B</sub>AR.* A<sub>2B</sub>AR is mainly present in immune cells, as well as, at low levels, in spinal cord and CNS, and prominently in astrocytes [18,19]. Its ubiquitous expression in inflammatory cells suggests a role in inflammatory pain through the release of various inflammatory mediators.

A<sub>2B</sub>AR has a low affinity for adenosine, and it is therefore significantly activated under pathophysiological conditions, when adenosine concentration is high. Similar to A<sub>2A</sub>AR, A<sub>2B</sub>AR activates AC, leading to a PKA phosphorylation cascade. This cellular signaling mainly promotes an anti-inflammatory response in immune cells and plays a part in the attenuation of acute inflammation [128].

While it may appear that A<sub>2B</sub>AR plays the same role as A<sub>2A</sub>AR, its effect is sometimes opposed. This is possible because, as with A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub>AR, A<sub>2B</sub>AR is coupled to PLC, leading to the accumulation of intracellular Ca<sup>2+</sup>, the generation of IP<sub>3</sub> and diacylglycerol (DAG), and the activation of PKC, involved in the release of pro-inflammatory mediators such as IL-6 from macrophages and IL-1β and VEGF from mast cells, with indirect effects on inflammatory pain [19,130,139]. In fact, Hu et al. described a mechanism underlying A<sub>2B</sub>AR-mediated chronic pain in three independent models of chronic pain [140]. The prolonged elevated adenosine levels activate A<sub>2B</sub>ARs of myeloid cells. This activation increases the production and release of IL-6 and soluble IL-6 receptor (sIL-6R). The complex IL-6/sIL-6R trans-activates gp130 on primary sensory fibers, which in turn stimulates the transcription factor pSTAT3, inducing TRPV1 gene transcription. The increase of TRPV1 in nociceptors produces sensory neuron hyperexcitability and can produce chronic inflammatory pain.

These opposing effects of A<sub>2B</sub>AR hamper the use of its agonists or antagonists as potential therapeutic agents for inflammatory disorders and pain. Evaluating the possible use of A<sub>2B</sub>AR as therapeutic target of endometriosis-associated pain requires a better understanding of the function of A<sub>2B</sub>AR in this disease. Moreover, the loss of expression of some ectonucleotidases in endometriotic tissue and the large amount of ADA in the fluid contents of endometriomas suggests that the adenosine levels in endometriotic milieu are low, rendering activation of A<sub>2B</sub>ARs unlikely. Consequently, A<sub>2B</sub>AR does not seem to be a suitable target for endometriosis treatment.

**A<sub>3</sub>AR.** A<sub>3</sub>ARs are described in peripheral and central neurons, glial cells, and immune cells [141,142]. Over the last decades, experimental studies with A<sub>3</sub>AR agonists showed the attenuation of nociception and neuropathic pain [130,141–143]. This has made A<sub>3</sub>AR a focus of development of new therapeutic strategies for pain.

Similar to A<sub>1</sub>AR, A<sub>3</sub>AR is coupled to G<sub>i</sub>, which inhibits AC, and to G<sub>q</sub>, which activates PKC. On primary sensory neurons, A<sub>3</sub>AR inhibits the Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> currents, reducing their excitability and neurotransmitter release [142]. This mechanism exerts an antinociceptive effect, but it is not the only one.

Agonists of A<sub>3</sub>AR enhance and recover inhibitory GABA signaling in spinal cord neurons. In neuropathic pain states, reduced levels of spinal GABA and GAD65 [144,145], its synthesis enzyme, are detected, whereas the expression of GABA transporter GAT-1, which uptakes the neurotransmitter from the synapse, is increased [145]. Additionally, there is a reduction in the activity and expression of KCC2. As noted above, P2X4 receptor activation promotes the production and release of BDNF, which, via TrkB, downregulates KCC2 and disrupts Cl<sup>-</sup> homeostasis, altering GABA<sub>A</sub> receptor postsynaptic inhibitory control and leading to neuronal hyperexcitability [109–111]. A<sub>3</sub>AR activation reverses these situations. The use of A<sub>3</sub>AR agonists maintains the phosphorylation status of GAD65 and GAT-1, which stabilizes and activates GAD65 and leads to the internalization and inactivation of GAT-1 [146]. In addition, A<sub>3</sub>AR agonists enhance KCC2 phosphorylation, increasing its activity [146]. Therefore, the activation of A<sub>3</sub>AR allows the increase of GABA levels and the restoration of inhibitory actions of GABA in the spinal cord, alleviating neuropathic pain. Moreover, A<sub>3</sub>AR activation also diminishes the production of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-1β) and enhances the formation of anti-inflammatory cytokines (IL-10) in the spinal cord by inhibiting the p38/MAPK and NF-κB signaling pathways [143,147,148]. This enhances the reduction of glial activation, decreasing neuroinflammation and pain hypersensitivity.

In recent years, antinociceptive properties of A<sub>1</sub>AR and A<sub>2A</sub>AR agonists have been the most studied targets of adenosine signaling to relieve acute and chronic pain. However, A<sub>3</sub>AR agonists have increased in importance in pain treatment since they avoid the undesirable cardiovascular side effects

of A<sub>1</sub>AR and A<sub>2A</sub>AR agonists [149,150]. For this reason, the use of selective A<sub>3</sub>AR agonists seems promising as a safe and effective analgesic treatment for chronic pain, and it is also being considered to treat endometriosis-associated pain.

## 5. Perspectives of ATP and Adenosine Signaling Modulation: Possible Tools to Treat Endometriosis-Associated Pain

Most medical treatments for endometriosis are aimed at relieving the chronic pain associated with the disease, but in many cases endometriosis-associated pain symptoms are not improved, and, if they are, they return with treatment cessation (reviewed in [53]).

As we try to document in this review, there is clear involvement of purinergic signaling in the generation and modulation of the sensation of pain. ATP participates in the hyperexcitability of sensory neurons and the development and maintenance of different types of pain (nociceptive, inflammatory, and neuropathic). Evidence mostly suggests ATP is responsible for triggering nociceptive pain, as well as inflammatory responses in the body, in contrast to adenosine. ATP also influences fecundation, endometrial receptivity, and embryo implantation [2].

In endometriosis, the adhesion of viable endometrial cells to establish an ectopic endometriotic focus triggers signals of injury and promotes the activation of an immune system that is inefficient in clearing ectopic cells. This situation is reflected in a significant increase in extracellular ATP levels in the endometriotic lesion. The ATP-rich microenvironment of the endometriotic lesion contributes to the two main symptoms of endometriosis: pain and infertility. The increase in ATP levels is enhanced by the loss of expression of certain ectonucleotidases in endometrial ectopic cells, prolonging signaling and activating pain. It seems, then, reasonable that development of therapeutic approaches for endometriosis-associated pain be based on achieving a decrease in ATP levels and their signaling cascade, and/or increased adenosine levels and activation of their receptors. Despite the potential of purinergic-based drugs and their analgesic effects in various pain models, there is no medication presently available for clinical use.

Currently, most pharmacological therapies for endometriosis are hormonal therapies. Neither these nor surgical treatment are compatible with the pregnancy desire of women with endometriosis, and it is usually a matter of choosing between alleviating symptoms and getting pregnant. A non-hormonal alternative to alleviate endometriosis-associated pain may lie in purinergic-based drugs. The development of clinical drugs targeting purinergic receptors is not free of difficulties, such as the ubiquitous expression and wide action of purinergic receptors throughout the body, and the large number of receptor subtypes combined with a lack of complete knowledge of their physiological and pathophysiological functions.

We present below a selection of potential purinergic signaling targets for pharmacological treatment of endometriosis-associated pain, without ruling out their utility in the improvement of the fertility of these women.

### (I) P<sub>2</sub> Receptor Antagonists

ATP, through P<sub>2X</sub> and P<sub>2Y</sub> receptors, induces cell signaling directly involved in hyperexcitability of sensory neurons and sustained glial cell reactivity in neuropathic pain. P<sub>2</sub> receptor antagonists and other molecules that alter their function have been used to describe the involvement of ATP in pain signaling. Moreover, the attenuation of nociception, hyperalgesia, and allodynia by blocking some P<sub>2</sub> receptors suggests that P<sub>2</sub> receptor-related drugs are potential candidates for the treatment of chronic pain conditions. In fact, P<sub>2X3</sub> receptors of sensory neurons seem to be the main receptors involved in pain, and P<sub>2X4</sub> and P<sub>2X7</sub> receptors appear to be key elements in neuropathic and inflammatory pain for their function in glial and immune cells.

P<sub>2X3</sub> receptor is involved in the development and progression of endometriosis-associated pain [81,82,86,87], and there is a growing interest in the development of substances to interfere or inhibit its function. A P<sub>2X3</sub> antagonist, MK-7264/AF-219, known as gefapixant, is currently being



tested in various advanced clinical trials with subjects with pulmonary disease and chronic cough (NCT01432730, NCT02502097, and NCT02477709). Recently, a clinical trial has been begun to evaluate the efficacy and safety of gefapixant in women with endometriosis-associated pain (NCT03654326). Experimental evidence of the relief of endometriosis-related pain has been obtained with the use of P2X3 receptor antagonists (e.g., A-317491), in endometriosis-induced animal models [87].

The use of P2X4 receptor antagonists (such as CORM-2, 5-BDBD, and NP-1815-PX) and P2X7 receptor antagonists (such as AZD9056 and AZ11645373) has been reported to inhibit microglia activation, significantly reducing inflammation and alleviating pain (reviewed in [151,152]). Although the administration of AZD9056 yielded good results in pain models in animals, clinical trials were not successful in alleviating symptoms in patients with rheumatoid arthritis, a chronic inflammatory disorder [153]. This suggests that new pharmacological strategies with P2X4 and P2X7 as targets are needed to achieve the desired clinical results in the treatment of inflammation and pain in endometriosis.

P2Y receptors are also potential pharmacological targets. For example, P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation and the neurotransmission of the excitatory signal in spinal cord neurons; the administration of P2Y<sub>12</sub> antagonists blocked microglia action in nerve injury-induced pain models [115,154]. There are clinical trials with P2Y<sub>12</sub> antagonists, in cardiovascular pathologies, but not yet in pain. However, the antithrombotic actions of P2Y<sub>12</sub> antagonist drugs could certainly complicate their use.

## (II) The Control of ATP Release

ATP release can occur via vesicular and non-vesicular mechanisms. Targeting ATP release on the endometriotic lesions, on sensory and central neurons, would represent a fine-tuning regulation of the P2 receptors involved in pain.

Vesicular ATP release involves the mechanism of exocytosis. Vesicular nucleotide transporter (VNUT), encoded by *SLC17A9* gene, is responsible for the vesicular storage and release of ATP in neurons, astrocytes, and microglia [155,156]. It is known that secretion of ATP through VNUT-dependent vesicular release mechanisms is involved in purinergic signaling in pain and inflammation [155].

After peripheral nerve injury, increases in VNUT expression and extracellular ATP levels are detected in spinal cord [156]. Masuda et al. showed that mice lacking VNUT in the dorsal horn neurons reduced the alloydina evoked by peripheral nerve injury. This did not occur with mice lacking VNUT in primary sensory neurons, astrocytes, or microglia. Increased extracellular ATP levels and neuropathic pain were restored in these mice lacking VNUT in dorsal horn neurons when VNUT expression was restored [156].

Clodronate and etidronate are biphosphonates used in osteoporosis therapy that have analgesic properties. In vitro assays demonstrated that they inhibited VNUT, leading to the modulation of ATP release and purinergic transmission [157,158]. In addition, in vivo studies with clodronate showed attenuation of neuropathic and inflammatory pain [158]. As clodronate is approved for clinical use in the treatment of osteoporosis and its safety is proven, it may be a good candidate for the treatment of endometriosis-associated pain.

ATP release in neurons, astrocytes, and microglia also occurs through membrane channels, such as pannexin hemichannels, connexins, and the P2X7 receptor itself. In recent years, a wealth of evidence has pointed to pannexin-1 [124,159,160] and connexin-43 (reviewed in [161–163]) as crucial elements in the induction and maintenance of chronic pain. These ATP-permeable channels are, therefore, pain relief targets for further investigation.

## (III) Recombinant Ectonucleotidases

In endometriosis, a loss of ectonucleotidase expression is reported in association with the severity of the disease. This might contribute to a rise in ATP levels. Restoring the ectonucleotidase activity in the endometriotic tissue would consequently reduce ATP-induced pain and enhance the antinociceptive effects of adenosine in the pain pathway.



CD39, CD73, and prostatic acid phosphatase (PAP) have been described as the main ectonucleotidases involved in the production of adenosine in DRG and spinal cord neurons [128,164]. A single intrathecal injection of recombinant soluble CD73 or PAP had long-lasting antinociceptive effects, dependent on A<sub>1</sub>AR activation, including antihyperalgesic and antiallodynic effects, in naïve mice and in mouse models of inflammatory and neuropathic pain [165,166].

Recombinant ectonucleotidases are potential tools for endometriosis-associated pain treatment. Additional preclinical and clinical studies are required to confirm their benefit in inflammatory and neuropathic pain.

#### (IV) P1 Receptor Agonists

Adenosine has a limited use due to its short life in vivo. Alternatively, agonists and positive allosteric modulators of AR have been described as pharmacological tools to treat inflammation and pain (reviewed in [167–169]). Their analgesic and anti-inflammatory effects have been studied with A<sub>1</sub>AR, A<sub>2A</sub>AR, and A<sub>3</sub>AR agonists. The controversial role of A<sub>2B</sub>AR limits their therapeutic use.

Several preclinical and clinical trials with agonists of A<sub>1</sub>AR (e.g., GW493838 and NCT00376454) and A<sub>2A</sub>AR (e.g., BVT.115929 and NCT00452777) have been performed. Despite the good results of AR agonists in several pain models [126,132–135], the lack of analgesia in humans together with the evidence of undesirable side effects, such as cardiovascular involvement, jeopardizes their use in any therapy [168,169].

On the other hand, preclinical and human clinical studies with A<sub>3</sub>AR agonists did not have significant side effects [170]. Antinociceptive effects have been described with the use of moderately selective agonists of A<sub>3</sub>ARs, such as IB-MECA and CI-IB-MECA, and highly selective agonists, such as MRS5698 and MRS5980. In general, A<sub>3</sub>AR agonists tend to restore the altered pain signaling of chronic pain. For example, A<sub>3</sub>AR agonists decrease glial activation and the generation of pro-inflammatory cytokines [143,147,148], increase the production of anti-inflammatory cytokines [147,148], and restore the inhibitory action of GABA [146]. Interestingly, A<sub>3</sub>AR agonists selectively modify pathological pain but seem not to alter protective pain [171]. Phase II and III clinical trials with IB-MECA have been completed in rheumatoid arthritis (NCT01034306) and psoriasis (NCT01265667), respectively. A phase II clinical trial with CI-IB-MECA was also completed in chronic hepatitis C (NCT00790673). Moreover, CI-IB-MECA is currently in phase II for its antitumor effects in hepatocellular carcinoma (NCT02128958). Although these clinical trials do not attend to their effectiveness in chronic pain, the safety profile in chronic inflammatory diseases, liver disease, and cancer envisages an optimistic future in the pharmacological treatment of neuropathic endometriosis-associated pain.

Several studies have demonstrated that acupuncture improves endometriosis-associated pain [54,172,173]. Interestingly, mechanisms underlying acupuncture-induced analgesia involve purinergic signaling [174–176]. Acupuncture produces local release of ATP leading to the activation of purinoreceptors on sensory nerve endings, triggering the neurotransmission of pain signal to brain. Local release of adenosine in certain centers of the brain cortex can modulate and inhibit pain sensation through the activation of AR, mainly A<sub>1</sub>AR [175,177]. Thus, acupuncture is a possible complementary treatment to relieve endometriosis-related pain.

In addition, the potential analgesic effect of adenosine receptor antagonists such as caffeine has also been studied. Caffeine, at low doses, and in combination with analgesic drugs, acts as an adjuvant (reviewed in [178]). At dietary levels, caffeine has a high affinity for A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, and A<sub>2B</sub>ARs [179]. Adenosine-based mechanisms involved in caffeine pharmacological antinociception are attributed to the A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub>AR blockade [178]. Despite its auspicious effects, caffeine has not been tested in endometriosis-associated pain. In fact, we predict that the use of caffeine in relieving endometriosis-associated pain is a complex matter due to the role of caffeine in female hormone pathways, in turn influencing the endometriosis outcome [180–182]. Moreover, no consistent association has been found between coffee/caffeine intake and the risk of this hormone-dependent disease [183–185]. Furthermore, the inhibition of A<sub>1</sub>AR by caffeine might interfere with the effectiveness

of several analgesic agents and treatments, e.g., acupuncture (reviewed in [178]), which should be taken into account in the clinical management of patients.

#### **(V) Inhibitors of Equilibrative Nucleoside Transporters**

In contrast to ATP, adenosine is neither stored nor released in synaptic vesicles. However, adenosine can be released by the cell via nucleoside transporters. One way to increase local extracellular adenosine levels and the concomitant antinociceptive signaling is the blocking of the equilibrative nucleoside transporters (ENTs). ENTs regulate facilitated diffusion and bidirectional nucleoside transport across the cell membrane, following the concentration gradient, in a number of tissues, including central nervous system. ENT-1 is highly expressed in superficial dorsal horn laminae and in DRG, colocalizing with A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>AR [186,187].

Maes et al. demonstrated that systemic administration of ENT-1 inhibitors can reverse hyperalgesia in guinea pig inflammatory pain models [188]. The mechanism underlying this analgesia seems to be the blocking of adenosine reuptake into cells, allowing greater activation of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>AR [188]. These results show that it is necessary to investigate the potential therapeutic effect of ENT inhibition. Moreover, the use of ENT inhibitors in combination with AR agonists or ADA inhibitors might enhance the antinociceptive effects of these molecules.

Consequently, the use of ENT inhibitors for analgesia in endometriosis is worth studying.

#### **(VI) Inhibitors of AK and ADA**

Adenosine metabolism is mainly the responsibility of AK and ADA enzymes; their inhibition would result in an increase in local extracellular adenosine levels, enhancing their antinociceptive signaling.

Several studies have shown that the supply of an orally active non-nucleoside AK inhibitor (ABT-702) produced effective antinociceptive and anti-inflammatory effects both in vitro and in vivo [189–191]. Increased adenosine concentration by AK inhibition seems to produce therapeutic effects through the activation of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub>AR [192]. Moreover, its pharmacological action is achieved with lower doses than with AR agonists, thus reducing the probability of producing psychomotor and cardiovascular side effects. Nevertheless, other AK inhibitors have toxic side effects, such as neurotoxicity (reviewed in [192]). The findings about ABT-702 indicate this to be an efficient and safe drug for the treatment of neuropathic pain and inflammatory states. Studies of the effects of ABT-702 in induced-endometriosis animal models are needed to assess its utility in therapies against endometriosis-associated pain.

It is notable that ADA, another metabolic enzyme of adenosine, and AK have different kinetics: with low or moderate inflammation, AK is the one modulating adenosine levels; with greater inflammation, where there is a substantial elevation of adenosine levels, ADA activity gains importance [193]. Hence, the effect of their inhibitors would also vary depending on adenosine levels in the environment. While the antinociceptive effect of AK inhibitors has been demonstrated, inhibition of ADA does not produce an intrinsic antinociceptive effect without very high levels of adenosine [194]. This is why the use of ADA inhibitors is only considered as an enhancer of the antinociceptive effects of AK inhibitors [195]. ADA inhibitors, such as deoxycoformycin, have been shown to have anticancer effects and to be useful in the treatment of infectious diseases [196–198]. Unfortunately, these compounds are usually toxic at effective doses [196,198–200]. The co-administration of AK inhibitors, such as ABT-702, with ADA inhibitors at lower doses as adjuvants, seems to be a suitable strategy for analgesia in endometriosis patients, but exhaustive prior safety studies are required.

## **6. Conclusions**

Pain has a strong impact on the quality of life of women with endometriosis. Current surgical and pharmacological treatments for endometriosis have as their primary goal the relief of pain. Nevertheless, these treatments have a limited success rate and in general hamper pregnancy. Although there is increasing understanding of the essential role of purinergic signaling in the

development and progression of nociceptive, inflammatory, and neuropathic pain, its implication in endometriosis-associated pain is still poorly studied. In this review, we examine the role of purinergic signaling, and particularly the role of extracellular ATP as a triggering factor for acute and chronic pain signaling, in the context of endometriosis.

Ectonucleotidases, the enzymes regulating ATP levels in the extracellular milieu, are altered in endometrial tissue in endometriosis. Of note is the decrease in the expression of the CD39–CD73 axis that supports the hypothesis of ATP (rather than adenosine) accumulation. Concomitant sustained activation of P2 receptors, capable of generating a persistent pain message, is compatible with the onset and maintenance of endometriosis-associated pain. It is known that P2X3 receptor, expressed in sensory neurons, mediates nociceptive, neuropathic, and inflammatory pain, and it is enrolled in endometriosis-related pain; therefore, pharmacological P2X3 inhibition is a worthy candidate for testing; in this sense, the use of the P2X3 receptor antagonist gefapixant is under clinical study. Although the P2X3 receptor fulfills the requirements to be a suitable molecule to be targeted, other ATP receptors have to be considered as well, such as the P2X4 and P2X7 receptors that are involved in macrophage–nerve and microglia–nerve interactions, promoting a persistent inflammatory state and the chronification of pain. P2X4 receptor triggers the generation of the inflammatory pain sensitization mediator PGE2 and is involved in the decrease of inhibitory control of GABAergic interneurons in neuropathic pain. In contrast, P2X7 receptor promotes the maintenance of neuropathic pain through the FKN/CX3C/CX3CR1 pathway, which seems to be altered in endometriosis. The use of P2X4 and P2X7 antagonists has yielded good results in reducing inflammation and alleviating pain in animal models. However, a clinical trial with the P2X7 receptor antagonist AZD9056 has been unsuccessful in a chronic inflammatory disorder, rheumatoid arthritis.

P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> receptors are involved in the activation and regulation of P2X3 and TRPV1 receptor ion channels of nociceptors. Moreover, microglial P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors activation triggers the release of pro-inflammatory cytokines, increasing excitatory synaptic transmission in the dorsal horn. Although P2Y receptors are involved in the modulation of pain, there are no clinical trials evaluating the use of P2Y antagonists in pain.

In addition, the antinociceptive and anti-inflammatory actions of the ARs, mainly A<sub>1</sub>AR and A<sub>3</sub>AR, have encouraged studies using agonists of these receptors for the treatment of pain and chronic inflammatory diseases. With the current knowledge, A<sub>3</sub>AR-targeting drugs are potential tools to treat neuropathic pain, as well as endometriosis-associated pain, but clinical studies in this regard are needed.

In summary, purinergic signaling-based strategies need to be further explored in the medical management of endometriosis-associated pain. This will also improve treatment of other symptoms of endometriosis, such as infertility, in which purinergic signaling also plays a role.

**Author Contributions:** C.T., Writing—original draft preparation; and M.M.-S., Writing—review, and editing. Both authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Instituto de Salud Carlos III (grant number: PI18/00541), co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF) (“a Way to Build Europe”), FONDOS FEDER (“una manera de hacer Europa”), and a grant from the Fundación Merck Salud (Ayuda Merck de Investigación 2016-Fertilidad).

**Acknowledgments:** We thank CERCA Programme (Generalitat de Catalunya) for institutional support, and Tom Yohannan for language editing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Nisolle, M.; Donnez, J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities. *Fertil. Steril.* **1997**, *68*, 585–596. [[CrossRef](#)]
2. Bulletti, C.; Coccia, M.E.; Battistoni, S.; Borini, A. Endometriosis and infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2010**, *27*, 441–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. May, K.E.; Villar, J.; Kirtley, S.; Kennedy, S.H.; Becker, C.M. Endometrial alterations in endometriosis: A systematic review of putative biomarkers. *Hum. Reprod. Update* **2011**, *17*, 637–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. As-Sanie, S.; Black, R.; Giudice, L.C.; Gray Valbrun, T.; Gupta, J.; Jones, B.; Laufer, M.R.; Milspaw, A.T.; Missmer, S.A.; Norman, A.; et al. Assessing research gaps and unmet needs in endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2019**, *221*, 86–94. [[CrossRef](#)]
5. Sampson, J. Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1927**, *14*, 422–469. [[CrossRef](#)]
6. Grandi, G.; Mueller, M.D.; Papadia, A.; Kocbek, V.; Bersinger, N.A.; Petraglia, F.; Cagnacci, A.; McKinnon, B. Inflammation influences steroid hormone receptors targeted by progestins in endometrial stromal cells from women with endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2016**, *117*, 30–38. [[CrossRef](#)]
7. Nothnick, W.; Alali, Z. Recent advances in the understanding of endometriosis: The role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. *F1000Research* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
8. Ahn, S.H.; Khalaj, K.; Young, S.L.; Lessey, B.A.; Koti, M.; Tayade, C. Immune-inflammation gene signatures in endometriosis patients. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 1420–1431.e7. [[CrossRef](#)]
9. Zhang, T.; De Carolis, C.; Man, G.C.W.; Wang, C.C. The link between immunity, autoimmunity and endometriosis: A literature update. *Autoimmun. Rev.* **2018**, *17*, 945–955. [[CrossRef](#)]
10. Zheng, P.; Zhang, W.; Leng, J.; Lang, J. Research on central sensitization of endometriosis-associated pain: A systematic review of the literature. *J. Pain Res.* **2019**, *12*, 1447–1456. [[CrossRef](#)]
11. Morotti, M.; Vincent, K.; Becker, C.M. Mechanisms of pain in endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2017**, *209*, 8–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Yegutkin, G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 473–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Volonté, C.; D'Ambrosi, N. Membrane compartments and purinergic signalling: The purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *FEBS J.* **2009**, *276*, 318–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Faas, M.M.; Saez, T.; de Vos, P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Mol. Asp. Med.* **2017**, *55*, 9–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Falzoni, S.; Donvito, G.; Di Virgilio, F. Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space. *Interface Focus* **2013**, *3*, 20120101. [[CrossRef](#)]
16. Zimmermann, H.; Zebisch, M.; Strater, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* **2012**, *8*, 437–502. [[CrossRef](#)]
17. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413–492.
18. Sawynok, J. Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience* **2016**, *338*, 1–18. [[CrossRef](#)]
19. Chandrasekaran, B.; Samarneh, S.; Jaber, A.M.Y.; Kassab, G.; Agrawal, N. Therapeutic Potentials of A2B Adenosine Receptor Ligands: Current Status and Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25*, 2741–2771. [[CrossRef](#)]
20. Schulte, G.; Fredholm, B.B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal.* **2003**, *15*, 813–827. [[CrossRef](#)]
21. Burnstock, G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2016**, *371*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Scarfi, S. Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J. Stem Cells* **2014**, *6*, 153–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Roszek, K.; Wujak, M. How to influence the mesenchymal stem cells fate? Emerging role of ectoenzymes metabolizing nucleotides. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 320–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Burnstock, G. Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. *Purinergic Signal.* **2014**, *10*, 157–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Burnstock, G.; Dale, N. Purinergic signalling during development and ageing. *Purinergic Signal.* **2015**, *11*, 277–305. [[CrossRef](#)]
26. Aliagas, E.; Vidal, A.; Torrejon-Escribano, B.; Taco Mdel, R.; Ponce, J.; de Aranda, I.G.; Sevigny, J.; Condom, E.; Martin-Satue, M. Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 227–237. [[CrossRef](#)]

27. Villamonte, M.L.; Torrejon-Escribano, B.; Rodriguez-Martinez, A.; Trapero, C.; Vidal, A.; Gomez de Aranda, I.; Sevigny, J.; Matias-Guiu, X.; Martin-Satue, M. Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity. *Histochem. Cell Biol.* **2018**, *149*, 269–276. [[CrossRef](#)]
28. Battistone, M.A.; Merkulova, M.; Park, Y.J.; Peralta, M.A.; Gombar, F.; Brown, D.; Breton, S. Unravelling purinergic regulation in the epididymis: Activation of V-ATPase-dependent acidification by luminal ATP and adenosine. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 1957–1973. [[CrossRef](#)]
29. Casali, E.A.; de Souza, L.F.; Gelain, D.P.; Kaiser, G.R.; Battastini, A.M.; Sarkis, J.J. Changes in ectonucleotidase activities in rat Sertoli cells during sexual maturation. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, *247*, 111–119. [[CrossRef](#)]
30. Kauffenstein, G.; Pelletier, J.; Lavoie, E.G.; Kukulski, F.; Martin-Satue, M.; Dufresne, S.S.; Frenette, J.; Ribas Furstenau, C.; Sereda, M.J.; Toutain, B.; et al. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 ectonucleotidase is required for normal vas deferens contraction and male fertility through maintaining P2X1 receptor function. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 28629–28639. [[CrossRef](#)]
31. Martin-Satue, M.; Lavoie, E.G.; Pelletier, J.; Fausther, M.; Csizmadia, E.; Guckelberger, O.; Robson, S.C.; Sevigny, J. Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem. Cell Biol.* **2009**, *131*, 615–628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Martinez-Ramirez, A.S.; Vazquez-Cuevas, F.G. Purinergic signaling in the ovary. *Mol. Reprod. Dev.* **2015**, *82*, 839–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Trapero, C.; Vidal, A.; Rodriguez-Martinez, A.; Sevigny, J.; Ponce, J.; Coroleu, B.; Matias-Guiu, X.; Martin-Satue, M. The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: A novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells. *Purinergic Signal.* **2019**, *15*, 225–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Lu, D.; Insel, P.A. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2014**, *306*, C779–C788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Burnstock, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 207–228. [[CrossRef](#)]
36. Burnstock, G.; Verkhratsky, A. Long-term (trophic) purinergic signalling: Purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e9. [[CrossRef](#)]
37. Trapero, C.; Vidal, A.; Fernandez-Montoli, M.E.; Coroleu, B.; Tresserra, F.; Barri, P.; Gomez de Aranda, I.; Sevigny, J.; Ponce, J.; Matias-Guiu, X.; et al. Impaired Expression of Ectonucleotidases in Ectopic and Eutopic Endometrial Tissue Is in Favor of ATP Accumulation in the Tissue Microenvironment in Endometriosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5532. [[CrossRef](#)]
38. Hood, B.L.; Liu, B.; Alkhas, A.; Shoji, Y.; Challa, R.; Wang, G.; Ferguson, S.; Oliver, J.; Mitchell, D.; Bateman, N.W.; et al. Proteomics of the human endometrial glandular epithelium and stroma from the proliferative and secretory phases of the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* **2015**, *92*, 106. [[CrossRef](#)]
39. Chen, Q.; Xin, A.; Qu, R.; Zhang, W.; Li, L.; Chen, J.; Lu, X.; Gu, Y.; Li, J.; Sun, X. Expression of ENPP3 in human cyclic endometrium: A novel molecule involved in embryo implantation. *Reprod. Fertil. Dev.* **2018**, *30*, 1277–1285. [[CrossRef](#)]
40. Boggavarapu, N.R.; Lalitkumar, S.; Joshua, V.; Kasvandik, S.; Salumets, A.; Lalitkumar, P.G.; Gemzell-Danielsson, K. Compartmentalized gene expression profiling of receptive endometrium reveals progesterone regulated ENPP3 is differentially expressed and secreted in glycosylated form. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33811. [[CrossRef](#)]
41. Texido, L.; Romero, C.; Vidal, A.; Garcia-Valero, J.; Fernandez Montoli, M.E.; Baixeras, N.; Condom, E.; Ponce, J.; Garcia-Tejedor, A.; Martin-Satue, M. Ecto-nucleotidases activities in the contents of ovarian endometriomas: Potential biomarkers of endometriosis. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 120673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Leone, R.D.; Emens, L.A. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Aliagas, E.; Vidal, A.; Texido, L.; Ponce, J.; Condom, E.; Martin-Satue, M. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 509027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Trapero, C.; Jover, L.; Fernandez-Montoli, M.E.; Garcia-Tejedor, A.; Vidal, A.; Gomez de Aranda, I.; Ponce, J.; Matias-Guiu, X.; Martin-Satue, M. Analysis of the ectoenzymes ADA, ALP, ENPP1, and ENPP3, in the contents of ovarian endometriomas as candidate biomarkers of endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2018**, *79*. [[CrossRef](#)]



45. Busacca, M.; Chiaffarino, F.; Candiani, M.; Vignali, M.; Bertulesi, C.; Oggioni, G.; Parazzini, F. Determinants of long-term clinically detected recurrence rates of deep, ovarian, and pelvic endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2006**, *195*, 426–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Dai, Y.; Leng, J.H.; Lang, J.H.; Li, X.Y.; Zhang, J.J. Anatomical distribution of pelvic deep infiltrating endometriosis and its relationship with pain symptoms. *Chin. Med. J.* **2012**, *125*, 209–213. [[PubMed](#)]
47. Rush, G.; Misajon, R. Examining subjective wellbeing and health-related quality of life in women with endometriosis. *Health Care Women Int.* **2018**, *39*, 303–321. [[CrossRef](#)]
48. Facchin, F.; Barbara, G.; Dridi, D.; Alberico, D.; Buggio, L.; Somigliana, E.; Saita, E.; Vercellini, P. Mental health in women with endometriosis: Searching for predictors of psychological distress. *Hum. Reprod.* **2017**, *32*, 1855–1861. [[CrossRef](#)]
49. Coxon, L.; Horne, A.W.; Vincent, K. Pathophysiology of endometriosis-associated pain: A review of pelvic and central nervous system mechanisms. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2018**, *51*, 53–67. [[CrossRef](#)]
50. Vercellini, P.; Vigano, P.; Somigliana, E.; Fedele, L. Endometriosis: Pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 261–275. [[CrossRef](#)]
51. Aredo, J.V.; Heyrana, K.J.; Karp, B.I.; Shah, J.P.; Stratton, P. Relating Chronic Pelvic Pain and Endometriosis to Signs of Sensitization and Myofascial Pain and Dysfunction. *Semin. Reprod. Med.* **2017**, *35*, 88–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Rolla, E. Endometriosis: Advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *F1000Research* **2019**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Becker, C.M.; Gattrell, W.T.; Gude, K.; Singh, S.S. Reevaluating response and failure of medical treatment of endometriosis: A systematic review. *Fertil. Steril.* **2017**, *108*, 125–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Xu, Y.; Zhao, W.; Li, T.; Zhao, Y.; Bu, H.; Song, S. Effects of acupuncture for the treatment of endometriosis-related pain: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0186616. [[CrossRef](#)]
55. Brown, J.; Crawford, T.J.; Allen, C.; Hopewell, S.; Prentice, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for pain in women with endometriosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, *1*, Cd004753. [[CrossRef](#)]
56. Singh, S.S.; Suen, M.W. Surgery for endometriosis: Beyond medical therapies. *Fertil. Steril.* **2017**, *107*, 549–554. [[CrossRef](#)]
57. Chaichian, S.; Kabir, A.; Mehdizadehkashi, A.; Rahmani, K.; Moghimi, M.; Moazzami, B. Comparing the Efficacy of Surgery and Medical Therapy for Pain Management in Endometriosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pain Physician* **2017**, *20*, 185–195.
58. Kim, J.H.; Han, E. Endometriosis and Female Pelvic Pain. *Semin. Reprod. Med.* **2018**, *36*, 143–151. [[CrossRef](#)]
59. Andres, M.P.; Borrelli, G.M.; Abrao, M.S. Endometriosis classification according to pain symptoms: Can the ASRM classification be improved? *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2018**, *51*, 111–118. [[CrossRef](#)]
60. Brown, J.; Crawford, T.J.; Datta, S.; Prentice, A. Oral contraceptives for pain associated with endometriosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *5*, Cd001019. [[CrossRef](#)]
61. Vercellini, P.; Buggio, L.; Frattaruolo, M.P.; Borghi, A.; Dridi, D.; Somigliana, E. Medical treatment of endometriosis-related pain. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2018**, *51*, 68–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Flyckt, R.; Kim, S.; Falcone, T. Surgical Management of Endometriosis in Patients with Chronic Pelvic Pain. *Semin. Reprod. Med.* **2017**, *35*, 54–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Yan, D.; Liu, X.; Guo, S.W. Nerve fibers and endometriotic lesions: Partners in crime in inflicting pains in women with endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2017**, *209*, 14–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Bele, T.; Fabbretti, E. P2X receptors, sensory neurons and pain. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 845–850. [[CrossRef](#)]
65. Burnstock, G. Purinergic Mechanisms and Pain. *Adv. Pharmacol.* **2016**, *75*, 91–137. [[CrossRef](#)]
66. Inoue, K. Purinergic signaling in microglia in the pathogenesis of neuropathic pain. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2017**, *93*, 174–182. [[CrossRef](#)]
67. Magni, G.; Ceruti, S. The role of adenosine and P2Y receptors expressed by multiple cell types in pain transmission. *Brain Res. Bull.* **2019**. [[CrossRef](#)]
68. Magni, G.; Riccio, D.; Ceruti, S. Tackling Chronic Pain and Inflammation through the Purinergic System. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 3830–3865. [[CrossRef](#)]
69. Tsuda, M. P2 receptors, microglial cytokines and chemokines, and neuropathic pain. *J. Neurosci. Res.* **2017**, *95*, 1319–1329. [[CrossRef](#)]
70. Kuan, Y.H.; Shyu, B.C. Nociceptive transmission and modulation via P2X receptors in central pain syndrome. *Mol. Brain* **2016**, *9*, 58. [[CrossRef](#)]



71. Liang, Y.; Xie, H.; Wu, J.; Liu, D.; Yao, S. Villainous role of estrogen in macrophage-nerve interaction in endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2018**, *16*, 122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Inoue, K.; Tsuda, M. Microglia in neuropathic pain: Cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 138–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Scholz, J.; Woolf, C.J. The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1361–1368. [[CrossRef](#)]
74. Tokushige, N.; Markham, R.; Russell, P.; Fraser, I.S. Nerve fibres in peritoneal endometriosis. *Hum. Reprod.* **2006**, *21*, 3001–3007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Tokushige, N.; Russell, P.; Black, K.; Barrera, H.; Dubinovsky, S.; Markham, R.; Fraser, I.S. Nerve fibers in ovarian endometriomas. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 1944–1947. [[CrossRef](#)]
76. Zhang, X.; Yao, H.; Huang, X.; Lu, B.; Xu, H.; Zhou, C. Nerve fibres in ovarian endometriotic lesions in women with ovarian endometriosis. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 392–397. [[CrossRef](#)]
77. Wang, G.; Tokushige, N.; Markham, R.; Fraser, I.S. Rich innervation of deep infiltrating endometriosis. *Hum. Reprod.* **2009**, *24*, 827–834. [[CrossRef](#)]
78. Arnold, J.; Barcena de Arellano, M.L.; Ruster, C.; Vercellino, G.F.; Chiantera, V.; Schneider, A.; Mechsner, S. Imbalance between sympathetic and sensory innervation in peritoneal endometriosis. *Brain Behav. Immun.* **2012**, *26*, 132–141. [[CrossRef](#)]
79. Ueno, S.; Tsuda, M.; Iwanaga, T.; Inoue, K. Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 429–436. [[CrossRef](#)]
80. Chen, Y.; Li, G.W.; Wang, C.; Gu, Y.; Huang, L.Y. Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state. *Pain* **2005**, *119*, 38–48. [[CrossRef](#)]
81. Greaves, E.; Grieve, K.; Horne, A.W.; Saunders, P.T. Elevated peritoneal expression and estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E1738–E1743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Ding, S.; Zhu, L.; Tian, Y.; Zhu, T.; Huang, X.; Zhang, X. P2X3 receptor involvement in endometriosis pain via ERK signaling pathway. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Bele, T.; Fabbretti, E. The scaffold protein calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase controls ATP release in sensory ganglia upon P2X3 receptor activation and is part of an ATP keeper complex. *J. Neurochem.* **2016**, *138*, 587–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Stratton, P.; Khachikyan, I.; Sinaii, N.; Ortiz, R.; Shah, J. Association of chronic pelvic pain and endometriosis with signs of sensitization and myofascial pain. *Obstet. Gynecol.* **2015**, *125*, 719–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Nakagawa, T.; Wakamatsu, K.; Zhang, N.; Maeda, S.; Minami, M.; Satoh, M.; Kaneko, S. Intrathecal administration of ATP produces long-lasting allodynia in rats: Differential mechanisms in the phase of the induction and maintenance. *Neuroscience* **2007**, *147*, 445–455. [[CrossRef](#)]
86. Ding, S.; Yu, Q.; Wang, J.; Zhu, L.; Li, T.; Guo, X.; Zhang, X. Activation of ATF3/AP-1 signaling pathway is required for P2X3-induced endometriosis pain. *Hum. Reprod.* **2020**, *35*, 1130–1144. [[CrossRef](#)]
87. Yuan, M.; Ding, S.; Meng, T.; Lu, B.; Shao, S.; Zhang, X.; Yuan, H.; Hu, F. Effect of A-317491 delivered by glycolipid-like polymer micelles on endometriosis pain. *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 8171–8183. [[CrossRef](#)]
88. Tsudo, T.; Harada, T.; Iwabe, T.; Tanikawa, M.; Nagano, Y.; Ito, M.; Taniguchi, F.; Terakawa, N. Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil. Steril.* **2000**, *73*, 205–211. [[CrossRef](#)]
89. Wei, X.; Shao, X. Nobiletin alleviates endometriosis via down-regulating NF- $\kappa$ B activity in endometriosis mouse model. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*. [[CrossRef](#)]
90. Yu, J.; Francisco, A.M.C.; Patel, B.G.; Cline, J.M.; Zou, E.; Berga, S.L.; Taylor, R.N. IL-1 $\beta$  Stimulates Brain-Derived Neurotrophic Factor Production in Eutopic Endometriosis Stromal Cell Cultures: A Model for Cytokine Regulation of Neuroangiogenesis. *Am. J. Pathol.* **2018**, *188*, 2281–2292. [[CrossRef](#)]
91. Makabe, T.; Koga, K.; Miyashita, M.; Takeuchi, A.; Sue, F.; Taguchi, A.; Urata, Y.; Izumi, G.; Takamura, M.; Harada, M.; et al. Drospirenone reduces inflammatory cytokines, vascular endothelial growth factor (VEGF) and nerve growth factor (NGF) expression in human endometriotic stromal cells. *J. Reprod. Immunol.* **2017**, *119*, 44–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Lin, J.; Li, G.; Den, X.; Xu, C.; Liu, S.; Gao, Y.; Liu, H.; Zhang, J.; Li, X.; Liang, S. VEGF and its receptor-2 involved in neuropathic pain transmission mediated by P2X<sub>2/3</sub> receptor of primary sensory neurons. *Brain Res. Bull.* **2010**, *83*, 284–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

93. Ye, Y.; Ono, K.; Bernabé, D.G.; Viet, C.T.; Pickering, V.; Dolan, J.C.; Hardt, M.; Ford, A.P.; Schmidt, B.L. Adenosine triphosphate drives head and neck cancer pain through P2X2/3 heterotrimeric. *Acta Neuropathol. Commun.* **2014**, *2*, 62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Yan, D.; Liu, X.; Guo, S.W. Neuropeptides Substance P and Calcitonin Gene Related Peptide Accelerate the Development and Fibrogenesis of Endometriosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Kritas, S.K.; Caraffa, A.; Antinolfi, P.; Saggini, A.; Pantalone, A.; Rosati, M.; Tei, M.; Speziali, A.; Saggini, R.; Pandolfi, F.; et al. Nerve growth factor interactions with mast cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2014**, *27*, 15–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Zhu, T.H.; Ding, S.J.; Li, T.T.; Zhu, L.B.; Huang, X.F.; Zhang, X.M. Estrogen is an important mediator of mast cell activation in ovarian endometriomas. *Reproduction* **2018**, *155*, 73–83. [[CrossRef](#)]
97. Theoharides, T.C.; Tsilioni, I.; Bawazeer, M. Mast Cells, Neuroinflammation and Pain in Fibromyalgia Syndrome. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 353. [[CrossRef](#)]
98. Zhu, H.; Yu, Y.; Zheng, L.; Wang, L.; Li, C.; Yu, J.; Wei, J.; Wang, C.; Zhang, J.; Xu, S.; et al. Chronic inflammatory pain upregulates expression of P2Y2 receptor in small-diameter sensory neurons. *Metab. Brain Dis.* **2015**, *30*, 1349–1358. [[CrossRef](#)]
99. Chen, X.; Molliver, D.C.; Gebhart, G.F. The P2Y2 receptor sensitizes mouse bladder sensory neurons and facilitates purinergic currents. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 2365–2372. [[CrossRef](#)]
100. Kwon, S.G.; Roh, D.H.; Yoon, S.Y.; Moon, J.Y.; Choi, S.R.; Choi, H.S.; Kang, S.Y.; Han, H.J.; Beitz, A.J.; Oh, S.B.; et al. Acid evoked thermal hyperalgesia involves peripheral P2Y1 receptor mediated TRPV1 phosphorylation in a rodent model of thrombus induced ischemic pain. *Mol. Pain* **2014**, *10*, 2. [[CrossRef](#)]
101. Kwon, S.G.; Roh, D.H.; Yoon, S.Y.; Moon, J.Y.; Choi, S.R.; Choi, H.S.; Kang, S.Y.; Han, H.J.; Beitz, A.J.; Lee, J.H. Blockade of peripheral P2Y1 receptors prevents the induction of thermal hyperalgesia via modulation of TRPV1 expression in carrageenan-induced inflammatory pain rats: Involvement of p38 MAPK phosphorylation in DRGs. *Neuropharmacology* **2014**, *79*, 368–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Luo, Y.; Feng, C.; Wu, J.; Wu, Y.; Liu, D.; Dai, F.; Zhang, J. P2Y1, P2Y2, and TRPV1 Receptors Are Increased in Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome and P2Y2 Correlates with Abdominal Pain. *Dig. Dis. Sci.* **2016**, *61*, 2878–2886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Lakshmi, S.; Joshi, P.G. Co-activation of P2Y2 receptor and TRPV channel by ATP: Implications for ATP induced pain. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2005**, *25*, 819–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Munrós, J.; Tàssies, D.; Reverter, J.C.; Martín, L.; Pérez, A.; Carmona, F.; Martínez-Zamora, M. Circulating Neutrophil Extracellular Traps Are Elevated in Patients With Deep Infiltrating Endometriosis. *Reprod. Sci.* **2019**, *26*, 70–76. [[CrossRef](#)]
105. Oliveira-Fusaro, M.C.; Gregory, N.S.; Kolker, S.J.; Rasmussen, L.; Allen, L.H.; Sluka, K.A. P2X4 Receptors on Muscle Macrophages Are Required for Development of Hyperalgesia in an Animal Model of Activity-Induced Muscle Pain. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 1917–1929. [[CrossRef](#)]
106. Janks, L.; Sprague, R.S.; Egan, T.M. ATP-Gated P2X7 Receptors Require Chloride Channels To Promote Inflammation in Human Macrophages. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 883–898. [[CrossRef](#)]
107. Ulmann, L.; Hirbec, H.; Rassendren, F. P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *EMBO J.* **2010**, *29*, 2290–2300. [[CrossRef](#)]
108. Possover, M. Five-Year Follow-Up After Laparoscopic Large Nerve Resection for Deep Infiltrating Sciatic Nerve Endometriosis. *J. Minim. Invasive Gynecol.* **2017**, *24*, 822–826. [[CrossRef](#)]
109. Coull, J.A.; Beggs, S.; Boudreau, D.; Boivin, D.; Tsuda, M.; Inoue, K.; Gravel, C.; Salter, M.W.; De Koninck, Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* **2005**, *438*, 1017–1021. [[CrossRef](#)]
110. Ulmann, L.; Hatcher, J.P.; Hughes, J.P.; Chaumont, S.; Green, P.J.; Conquet, F.; Buell, G.N.; Reeve, A.J.; Chessell, I.P.; Rassendren, F. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 11263–11268. [[CrossRef](#)]
111. Long, T.; He, W.; Pan, Q.; Zhang, S.; Zhang, D.; Qin, G.; Chen, L.; Zhou, J. Microglia P2X4R-BDNF signalling contributes to central sensitization in a recurrent nitroglycerin-induced chronic migraine model. *J. Headache Pain* **2020**, *21*, 4. [[CrossRef](#)]

112. Xu, F.; Yang, J.; Lu, F.; Liu, R.; Zheng, J.; Zhang, J.; Cui, W.; Wang, C.; Zhou, W.; Wang, Q.; et al. Fast Green FCF Alleviates Pain Hypersensitivity and Down-Regulates the Levels of Spinal P2X4 Expression and Pro-inflammatory Cytokines in a Rodent Inflammatory Pain Model. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Ji, R.R.; Chamesian, A.; Zhang, Y.Q. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science* **2016**, *354*, 572–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Liu, P.W.; Yue, M.X.; Zhou, R.; Niu, J.; Huang, D.J.; Xu, T.; Luo, P.; Liu, X.H.; Zeng, J.W. P2Y<sub>12</sub> and P2Y<sub>13</sub> receptors involved in ADP β s induced the release of IL-1 β, IL-6 and TNF-α from cultured dorsal horn microglia. *J. Pain Res.* **2017**, *10*, 1755–1767. [[CrossRef](#)]
115. Yu, T.; Zhang, X.; Shi, H.; Tian, J.; Sun, L.; Hu, X.; Cui, W.; Du, D. P2Y<sub>12</sub> regulates microglia activation and excitatory synaptic transmission in spinal lamina II neurons during neuropathic pain in rodents. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Shieh, C.H.; Heinrich, A.; Serchov, T.; van Calker, D.; Biber, K. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF-α in cultured mouse microglia. *Glia* **2014**, *62*, 592–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Garré, J.M.; Yang, G.; Bukauskas, F.F.; Bennett, M.V. FGF-1 Triggers Pannexin-1 Hemichannel Opening in Spinal Astrocytes of Rodents and Promotes Inflammatory Responses in Acute Spinal Cord Slices. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 4785–4801. [[CrossRef](#)]
118. Sorge, R.E.; Trang, T.; Dorfman, R.; Smith, S.B.; Beggs, S.; Ritchie, J.; Austin, J.S.; Zaykin, D.V.; Vander Meulen, H.; Costigan, M.; et al. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 595–599. [[CrossRef](#)]
119. Clark, A.K.; Yip, P.K.; Grist, J.; Gentry, C.; Staniland, A.A.; Marchand, F.; Dehvari, M.; Wotherspoon, G.; Winter, J.; Ullah, J.; et al. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10655–10660. [[CrossRef](#)]
120. Clark, A.K.; Yip, P.K.; Malcangio, M. The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 6945–6954. [[CrossRef](#)]
121. Clark, A.K.; Wodarski, R.; Guida, F.; Sasso, O.; Malcangio, M. Cathepsin S release from primary cultured microglia is regulated by the P2X7 receptor. *Glia* **2010**, *58*, 1710–1726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Liu, Z.; Chen, S.; Qiu, C.; Sun, Y.; Li, W.; Jiang, J.; Zhang, J.M. Fractalkine/CX3CR1 Contributes to Endometriosis-Induced Neuropathic Pain and Mechanical Hypersensitivity in Rats. *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Hou, X.X.; Zhou, W.J.; Wang, X.Q.; Li, D.J. Fractalkine/CX3CR1 is involved in the pathogenesis of endometriosis by regulating endometrial stromal cell proliferation and invasion. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2016**, *76*, 318–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Mousseau, M.; Burma, N.E.; Lee, K.Y.; Leduc-Pessah, H.; Kwok, C.H.T.; Reid, A.R.; O'Brien, M.; Sagalajev, B.; Stratton, J.A.; Patrick, N.; et al. Microglial pannexin-1 channel activation is a spinal determinant of joint pain. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaas9846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Katz, N.K.; Ryals, J.M.; Wright, D.E. Central or peripheral delivery of an adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist improves mechanical allodynia in a mouse model of painful diabetic neuropathy. *Neuroscience* **2015**, *285*, 312–323. [[CrossRef](#)]
126. Imlach, W.L.; Bhola, R.F.; May, L.T.; Christopoulos, A.; Christie, M.J. A Positive Allosteric Modulator of the Adenosine A<sub>1</sub> Receptor Selectively Inhibits Primary Afferent Synaptic Transmission in a Neuropathic Pain Model. *Mol. Pharmacol.* **2015**, *88*, 460–468. [[CrossRef](#)]
127. Luongo, L.; Guida, F.; Imperatore, R.; Napolitano, F.; Gatta, L.; Cristino, L.; Giordano, C.; Siniscalco, D.; Di Marzo, V.; Bellini, G.; et al. The A<sub>1</sub> adenosine receptor as a new player in microglia physiology. *Glia* **2014**, *62*, 122–132. [[CrossRef](#)]
128. Borea, P.A.; Gessi, S.; Merighi, S.; Vincenzi, F.; Varani, K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 1591–1625. [[CrossRef](#)]
129. El-Hashim, A.Z.; Mathews, S.; Al-Shamlan, F. Central adenosine A<sub>1</sub> receptors inhibit cough *via* suppression of excitatory glutamatergic and tachykininergic neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 3162–3174. [[CrossRef](#)]
130. Effendi, W.I.; Nagano, T.; Kobayashi, K.; Nishimura, Y. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells* **2020**, *9*, 785. [[CrossRef](#)]

131. Li, Z.H.; Cui, D.; Qiu, C.J.; Song, X.J. Cyclic nucleotide signaling in sensory neuron hyperexcitability and chronic pain after nerve injury. *Neurobiol. Pain* **2019**, *6*, 100028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Loram, L.C.; Taylor, F.R.; Strand, K.A.; Harrison, J.A.; Rzasalynn, R.; Sholar, P.; Rieger, J.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. Intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists reversed neuropathic allodynia through protein kinase (PK)A/PKC signaling. *Brain Behav. Immun.* **2013**, *33*, 112–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Loram, L.C.; Harrison, J.A.; Sloane, E.M.; Hutchinson, M.R.; Sholar, P.; Taylor, F.R.; Berkelhammer, D.; Coats, B.D.; Poole, S.; Milligan, E.D.; et al. Enduring reversal of neuropathic pain by a single intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists: A novel therapy for neuropathic pain. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 14015–14025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Kwilasz, A.J.; Green Fulgham, S.M.; Ellis, A.; Patel, H.P.; Duran-Malle, J.C.; Favret, J.; Harvey, L.O.; Rieger, J.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. A single peri-sciatic nerve administration of the adenosine 2A receptor agonist ATL313 produces long-lasting anti-allodynia and anti-inflammatory effects in male rats. *Brain Behav. Immun.* **2019**, *76*, 116–125. [[CrossRef](#)]
135. Kwilasz, A.J.; Ellis, A.; Wieseler, J.; Loram, L.; Favret, J.; McFadden, A.; Springer, K.; Falci, S.; Rieger, J.; Maier, S.F.; et al. Sustained reversal of central neuropathic pain induced by a single intrathecal injection of adenosine A2A receptor agonists. *Brain Behav. Immun.* **2018**, *69*, 470–479. [[CrossRef](#)]
136. Meng, F.; Guo, Z.; Hu, Y.; Mai, W.; Zhang, Z.; Zhang, B.; Ge, Q.; Lou, H.; Guo, F.; Chen, J.; et al. CD73-derived adenosine controls inflammation and neurodegeneration by modulating dopamine signalling. *Brain* **2019**, *142*, 700–718. [[CrossRef](#)]
137. Gomes, C.; Ferreira, R.; George, J.; Sanches, R.; Rodrigues, D.I.; Gonçalves, N.; Cunha, R.A. Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *J. Neuroinflamm.* **2013**, *10*, 16. [[CrossRef](#)]
138. Cunha, R.A. How does adenosine control neuronal dysfunction and neurodegeneration? *J. Neurochem.* **2016**, *139*, 1019–1055. [[CrossRef](#)]
139. Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Adv. Pharmacol.* **2011**, *61*, 115–144. [[CrossRef](#)]
140. Hu, X.; Adebiyi, M.G.; Luo, J.; Sun, K.; Le, T.T.; Zhang, Y.; Wu, H.; Zhao, S.; Karmouty-Quintana, H.; Liu, H.; et al. Sustained Elevated Adenosine via ADORA2B Promotes Chronic Pain through Neuro-immune Interaction. *Cell Rep.* **2016**, *16*, 106–119. [[CrossRef](#)]
141. Janes, K.; Symons-Liguori, A.M.; Jacobson, K.A.; Salvemini, D. Identification of A3 adenosine receptor agonists as novel non-narcotic analgesics. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 1253–1267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Coppi, E.; Cherchi, F.; Fusco, I.; Failli, P.; Vona, A.; Dettori, I.; Gaviano, L.; Lucarini, E.; Jacobson, K.A.; Tosh, D.K.; et al. Adenosine A3 receptor activation inhibits pronociceptive N-type Ca<sup>2+</sup> currents and cell excitability in dorsal root ganglion neurons. *Pain* **2019**, *160*, 1103–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Terayama, R.; Tabata, M.; Maruhama, K.; Iida, S. A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist attenuates neuropathic pain by suppressing activation of microglia and convergence of nociceptive inputs in the spinal dorsal horn. *Exp. Brain Res.* **2018**, *236*, 3203–3213. [[CrossRef](#)]
144. Lorenzo, L.E.; Magnussen, C.; Bailey, A.L.; St Louis, M.; De Koninck, Y.; Ribeiro-da-Silva, A. Spatial and temporal pattern of changes in the number of GAD65-immunoreactive inhibitory terminals in the rat superficial dorsal horn following peripheral nerve injury. *Mol. Pain* **2014**, *10*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Ge, M.M.; Chen, S.P.; Zhou, Y.Q.; Li, Z.; Tian, X.B.; Gao, F.; Manyande, A.; Tian, Y.K.; Yang, H. The therapeutic potential of GABA in neuron-glia interactions of cancer-induced bone pain. *Eur. J. Pharmacol.* **2019**, *858*, 172475. [[CrossRef](#)]
146. Ford, A.; Castonguay, A.; Cottet, M.; Little, J.W.; Chen, Z.; Symons-Liguori, A.M.; Doyle, T.; Egan, T.M.; Vanderah, T.W.; De Koninck, Y.; et al. Engagement of the GABA to KCC2 signaling pathway contributes to the analgesic effects of A3AR agonists in neuropathic pain. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 6057–6067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Janes, K.; Esposito, E.; Doyle, T.; Cuzzocrea, S.; Tosh, D.K.; Jacobson, K.A.; Salvemini, D. A3 adenosine receptor agonist prevents the development of paclitaxel-induced neuropathic pain by modulating spinal glial-restricted redox-dependent signaling pathways. *Pain* **2014**, *155*, 2560–2567. [[CrossRef](#)]



148. Janes, K.; Wahlman, C.; Little, J.W.; Doyle, T.; Tosh, D.K.; Jacobson, K.A.; Salvemini, D. Spinal neuroimmune activation is independent of T-cell infiltration and attenuated by A3 adenosine receptor agonists in a model of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Brain Behav. Immun.* **2015**, *44*, 91–99. [[CrossRef](#)]
149. Zylka, M.J. Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 188–196. [[CrossRef](#)]
150. Guerrero, A. A2A Adenosine Receptor Agonists and their Potential Therapeutic Applications. An Update. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25*, 3597–3612. [[CrossRef](#)]
151. Zhang, W.J.; Zhu, Z.M.; Liu, Z.X. The role of P2X4 receptor in neuropathic pain and its pharmacological properties. *Pharmacol. Res.* **2020**, *158*, 104875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Zhang, W.J.; Zhu, Z.M.; Liu, Z.X. The role and pharmacological properties of the P2X7 receptor in neuropathic pain. *Brain Res. Bull.* **2020**, *155*, 19–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Keystone, E.C.; Wang, M.M.; Layton, M.; Hollis, S.; McInnes, I.B.; Team, D.C.S. Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann. Rheum. Dis.* **2012**, *71*, 1630–1635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Horváth, G.; Göllöncsér, F.; Csölle, C.; Király, K.; Andó, R.D.; Baranyi, M.; Koványi, B.; Máté, Z.; Hoffmann, K.; Algaier, I.; et al. Central P2Y12 receptor blockade alleviates inflammatory and neuropathic pain and cytokine production in rodents. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *70*, 162–178. [[CrossRef](#)]
155. Moriyama, Y.; Hiasa, M.; Sakamoto, S.; Omote, H.; Nomura, M. Vesicular nucleotide transporter (VNUT): Appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signal.* **2017**, *13*, 387–404. [[CrossRef](#)]
156. Masuda, T.; Ozono, Y.; Mikuriya, S.; Kohro, Y.; Tozaki-Saitoh, H.; Iwatsuki, K.; Uneyama, H.; Ichikawa, R.; Salter, M.W.; Tsuda, M.; et al. Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12529. [[CrossRef](#)]
157. Yamagata, R.; Nemoto, W.; Nakagawasai, O.; Hung, W.Y.; Shima, K.; Endo, Y.; Tan-No, K. Etidronate attenuates tactile allodynia by spinal ATP release inhibition in mice with partial sciatic nerve ligation. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* **2019**, *392*, 349–357. [[CrossRef](#)]
158. Kato, Y.; Hiasa, M.; Ichikawa, R.; Hasuzawa, N.; Kadowaki, A.; Iwatsuki, K.; Shima, K.; Endo, Y.; Kitahara, Y.; Inoue, T.; et al. Identification of a vesicular ATP release inhibitor for the treatment of neuropathic and inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E6297–E6305. [[CrossRef](#)]
159. Yamakita, S.; Horii, Y.; Takemura, H.; Matsuoka, Y.; Yamashita, A.; Yamaguchi, Y.; Matsuda, M.; Sawa, T.; Amaya, F. Synergistic activation of ERK1/2 between A-fiber neurons and glial cells in the DRG contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. *Mol. Pain* **2018**, *14*, 1744806918767508. [[CrossRef](#)]
160. Zhang, Y.; Laumet, G.; Chen, S.R.; Hittelman, W.N.; Pan, H.L. Pannexin-1 Up-regulation in the Dorsal Root Ganglion Contributes to Neuropathic Pain Development. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 14647–14655. [[CrossRef](#)]
161. Wang, A.; Xu, C. The role of connexin43 in neuropathic pain induced by spinal cord injury. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2019**, *51*, 555–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Morioka, N.; Nakamura, Y.; Zhang, F.F.; Hisaoka-Nakashima, K.; Nakata, Y. Role of Connexins in Chronic Pain and Their Potential as Therapeutic Targets for Next-Generation Analgesics. *Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 857–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Spray, D.C.; Hanani, M. Gap junctions, pannexins and pain. *Neurosci. Lett.* **2019**, *695*, 46–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Street, S.E.; Walsh, P.L.; Sowa, N.A.; Taylor-Blake, B.; Guillot, T.S.; Vihko, P.; Wightman, R.M.; Zylka, M.J. PAP and NT5E inhibit nociceptive neurotransmission by rapidly hydrolyzing nucleotides to adenosine. *Mol. Pain* **2011**, *7*, 80. [[CrossRef](#)]
165. Sowa, N.A.; Vadakkan, K.I.; Zylka, M.J. Recombinant mouse PAP has pH-dependent ectonucleotidase activity and acts through A(1)-adenosine receptors to mediate antinociception. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4248. [[CrossRef](#)]
166. Sowa, N.A.; Voss, M.K.; Zylka, M.J. Recombinant ecto-5'-nucleotidase (CD73) has long lasting antinociceptive effects that are dependent on adenosine A1 receptor activation. *Mol. Pain* **2010**, *6*, 20. [[CrossRef](#)]
167. Deb, P.K.; Deka, S.; Borah, P.; Abed, S.N.; Klotz, K.N. Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential of Agonists, Antagonists and Allosteric Modulators of A1 Adenosine Receptor: Current Status and Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25*, 2697–2715. [[CrossRef](#)]

168. Jacobson, K.A.; Tosh, D.K.; Jain, S.; Gao, Z.G. Historical and Current Adenosine Receptor Agonists in Preclinical and Clinical Development. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 124. [[CrossRef](#)]
169. Jacobson, K.A.; Giancotti, L.A.; Lauro, F.; Mufti, F.; Salvemini, D. Treatment of chronic neuropathic pain: Purine receptor modulation. *Pain* **2020**, *161*, 1425–1441. [[CrossRef](#)]
170. Jacobson, K.A.; Merighi, S.; Varani, K.; Borea, P.A.; Baraldi, S.; Aghazadeh Tabrizi, M.; Romagnoli, R.; Baraldi, P.G.; Ciancetta, A.; Tosh, D.K.; et al. A<sub>3</sub> Adenosine Receptors as Modulators of Inflammation: From Medicinal Chemistry to Therapy. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38*, 1031–1072. [[CrossRef](#)]
171. Little, J.W.; Ford, A.; Symons-Liguori, A.M.; Chen, Z.; Janes, K.; Doyle, T.; Xie, J.; Luongo, L.; Tosh, D.K.; Maione, S.; et al. Endogenous adenosine A<sub>3</sub> receptor activation selectively alleviates persistent pain states. *Brain* **2015**, *138*, 28–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Mira, T.A.A.; Buen, M.M.; Borges, M.G.; Yela, D.A.; Benetti-Pinto, C.L. Systematic review and meta-analysis of complementary treatments for women with symptomatic endometriosis. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2018**, *143*, 2–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Liang, R.; Li, P.; Peng, X.; Xu, L.; Fan, P.; Peng, J.; Zhou, X.; Xiao, C.; Jiang, M. Efficacy of acupuncture on pelvic pain in patients with endometriosis: Study protocol for a randomized, single-blind, multi-center, placebo-controlled trial. *Trials* **2018**, *19*, 314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Burnstock, G. Acupuncture: A novel hypothesis for the involvement of purinergic signalling. *Med. Hypotheses* **2009**, *73*, 470–472. [[CrossRef](#)]
175. Tang, Y.; Yin, H.Y.; Rubini, P.; Illes, P. Acupuncture-Induced Analgesia: A Neurobiological Basis in Purinergic Signaling. *Neuroscientist* **2016**, *22*, 563–578. [[CrossRef](#)]
176. Zhang, Y.; Huang, L.; Kozlov, S.A.; Rubini, P.; Tang, Y.; Illes, P. Acupuncture alleviates acid- and purine-induced pain in rodents. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 77–92. [[CrossRef](#)]
177. Goldman, N.; Chen, M.; Fujita, T.; Xu, Q.; Peng, W.; Liu, W.; Jensen, T.K.; Pei, Y.; Wang, F.; Han, X.; et al. Adenosine A<sub>1</sub> receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 883–888. [[CrossRef](#)]
178. Sawynok, J. Caffeine and pain. *Pain* **2011**, *152*, 726–729. [[CrossRef](#)]
179. Fredholm, B.B.; Bättig, K.; Holmén, J.; Nehlig, A.; Zvartau, E.E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol. Rev.* **1999**, *51*, 83–133.
180. Kwak, Y.; Choi, H.; Bae, J.; Choi, Y.Y.; Roh, J. Peri-pubertal high caffeine exposure increases ovarian estradiol production in immature rats. *Reprod. Toxicol.* **2017**, *69*, 43–52. [[CrossRef](#)]
181. Klonoff-Cohen, H.; Bleha, J.; Lam-Kruglick, P. A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-Fallopian transfer. *Hum. Reprod.* **2002**, *17*, 1746–1754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Lucero, J.; Harlow, B.L.; Barbieri, R.L.; Sluss, P.; Cramer, D.W. Early follicular phase hormone levels in relation to patterns of alcohol, tobacco, and coffee use. *Fertil. Steril.* **2001**, *76*, 723–729. [[CrossRef](#)]
183. Hemmert, R.; Schliep, K.C.; Willis, S.; Peterson, C.M.; Louis, G.B.; Allen-Brady, K.; Simonsen, S.E.; Stanford, J.B.; Byun, J.; Smith, K.R. Modifiable life style factors and risk for incident endometriosis. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **2019**, *33*, 19–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Chiaffarino, F.; Bravi, F.; Cipriani, S.; Parazzini, F.; Ricci, E.; Viganò, P.; La Vecchia, C. Coffee and caffeine intake and risk of endometriosis: A meta-analysis. *Eur. J. Nutr.* **2014**, *53*, 1573–1579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Parazzini, F.; Viganò, P.; Candiani, M.; Fedele, L. Diet and endometriosis risk: A literature review. *Reprod. Biomed. Online* **2013**, *26*, 323–336. [[CrossRef](#)]
186. Governo, R.J.; Deuchars, J.; Baldwin, S.A.; King, A.E. Localization of the NBMPR-sensitive equilibrative nucleoside transporter, ENT1, in the rat dorsal root ganglion and lumbar spinal cord. *Brain Res.* **2005**, *1059*, 129–138. [[CrossRef](#)]
187. Choca, J.I.; Proudfit, H.K.; Green, R.D. Identification of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptors in the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1987**, *242*, 905–910.
188. Maes, S.S.; Pype, S.; Hoffmann, V.L.; Biermans, M.; Meert, T.F. Antihyperalgesic activity of nucleoside transport inhibitors in models of inflammatory pain in guinea pigs. *J. Pain Res.* **2012**, *5*, 391–400. [[CrossRef](#)]
189. Suzuki, R.; Stanfa, L.C.; Kowaluk, E.A.; Williams, M.; Jarvis, M.F.; Dickenson, A.H. The effect of ABT-702, a novel adenosine kinase inhibitor, on the responses of spinal neurones following carrageenan inflammation and peripheral nerve injury. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 1615–1623. [[CrossRef](#)]



190. Jarvis, M.F.; Yu, H.; Kohlhaas, K.; Alexander, K.; Lee, C.H.; Jiang, M.; Bhagwat, S.S.; Williams, M.; Kowaluk, E.A. ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties: I. In vitro characterization and acute antinociceptive effects in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295*, 1156–1164.
191. Kowaluk, E.A.; Mikusa, J.; Wismer, C.T.; Zhu, C.Z.; Schweitzer, E.; Lynch, J.J.; Lee, C.H.; Jiang, M.; Bhagwat, S.S.; Gomtsyan, A.; et al. ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholino-pyridin-3-yl)pyrido[2,3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties. II. In vivo characterization in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295*, 1165–1174. [[PubMed](#)]
192. Jarvis, M.F. Therapeutic potential of adenosine kinase inhibition-Revisited. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2019**, *7*, e00506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Liu, X.J.; White, T.D.; Sawynok, J. Potentiation of formalin-evoked adenosine release by an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor in the rat hind paw: A microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *408*, 143–152. [[CrossRef](#)]
194. Keil, G.J.; DeLander, G.E. Adenosine kinase and adenosine deaminase inhibition modulate spinal adenosine- and opioid agonist-induced antinociception in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *271*, 37–46. [[CrossRef](#)]
195. Poon, A.; Sawynok, J. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of an adenosine kinase inhibitor and an adenosine deaminase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *384*, 123–138. [[CrossRef](#)]
196. Yoshikawa, N.; Nakamura, K.; Yamaguchi, Y.; Kagota, S.; Shinozuka, K.; Kunitomo, M. Reinforcement of antitumor effect of Cordyceps sinensis by 2'-deoxycoformycin, an adenosine deaminase inhibitor. *In Vivo* **2007**, *21*, 291–295.
197. Bennett, M.; Matutes, E.; Gaulard, P. Hepatosplenic T cell lymphoma responsive to 2'-deoxycoformycin therapy. *Am. J. Hematol.* **2010**, *85*, 727–729. [[CrossRef](#)]
198. Spiers, A.S. Deoxycoformycin (pentostatin): Clinical pharmacology, role in the chemotherapy of cancer, and use in other diseases. *Haematologia* **1996**, *27*, 55–84.
199. Todd, S.A.; Morris, T.C.; Alexander, H.D. Myelodysplasia terminating in acute myeloid leukemia in a hairy cell leukemia patient treated with 2-deoxycoformycin. *Leuk. Lymphoma* **2002**, *43*, 1343–1344. [[CrossRef](#)]
200. Dalla Rosa, L.; Da Silva, A.S.; Oliveira, C.B.; Gressler, L.T.; Arnold, C.B.; Baldissera, M.D.; Sagrillo, M.; Sangoi, M.; Moresco, R.; Mendes, R.E.; et al. Dose finding of 3'-deoxyadenosine and deoxycoformycin for the treatment of Trypanosoma evansi infection: An effective and nontoxic dose. *Microb. Pathog.* **2015**, *85*, 21–28. [[CrossRef](#)]

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## ANNEX 3

### **Article d'investigació: Caracterització del marcador d'eMSCs NTPD2 en carcinomes endometrials de baix i d'alt grau: pèrdua de l'expressió estromal en els fenotips invasius**

**Characterization of the Endometrial MSC Marker Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) in Low- and High-Grade Endometrial Carcinomas: Loss of Stromal Expression in the Invasive Phenotypes.**

Rodríguez-Martínez A \*, [Trapero C](#)\*, Vidal A, Piulats JM, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Fernández-Montolí ME, Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. J Pers Med. **2021**; 11(5):331.  
doi: 10.3390/jpm11050331

(\* Coautoria)



Article

# Characterization of the Endometrial MSC Marker Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) in Low- and High-Grade Endometrial Carcinomas: Loss of Stromal Expression in the Invasive Phenotypes

Aitor Rodríguez-Martínez <sup>1,2,†</sup>, Carla Trapero <sup>1,2,†</sup>, August Vidal <sup>1,2,3</sup>, Josep Maria Piulats <sup>2,4</sup>, Inmaculada Gómez de Aranda <sup>1</sup>, Jean Sévigny <sup>5,6</sup>, Maria Eulàlia Fernández-Montolí <sup>2,7</sup>, Jordi Ponce <sup>2,7</sup>, Xavier Matias-Guiu <sup>1,2,3</sup> and Mireia Martín-Satué <sup>1,2,\*</sup>



**Citation:** Rodríguez-Martínez, A.; Trapero, C.; Vidal, A.; Piulats, J.M.; Gómez de Aranda, I.; Sévigny, J.; Fernández-Montolí, M.E.; Ponce, J.; Matias-Guiu, X.; Martín-Satué, M. Characterization of the Endometrial MSC Marker Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) in Low- and High-Grade Endometrial Carcinomas: Loss of Stromal Expression in the Invasive Phenotypes. *J. Pers. Med.* **2021**, *11*, 331. <https://doi.org/10.3390/jpm11050331>

Academic Editors: Caroline E. Gargett and Dharani Hapangama

Received: 5 March 2021  
Accepted: 15 April 2021  
Published: 22 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain; arodriguez@ub.edu (A.R.-M.); ctrapero@ub.edu (C.T.); a Vidal@bellvitgehospital.cat (A.V.); igomezdearanda@ub.edu (I.G.d.A.); xmatias@idibell.cat (X.M.-G.)
- <sup>2</sup> Oncobell Program, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), CIBERONC, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Spain; jmpulats@iconcologia.net (J.M.P.); mefernandez@bellvitgehospital.cat (M.E.F.-M.); jponce@bellvitgehospital.cat (J.P.)
- <sup>3</sup> Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain
- <sup>4</sup> Servei d'Oncologia Mèdica, Institut Català d'Oncologia (ICO), 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Spain
- <sup>5</sup> Centre du Recherche du CHU de Québec-Université Laval, Québec City, QC G1V 4G2, Canada; jean.sevigny@crchudequebec.ulaval.ca
- <sup>6</sup> Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec City, QC G1V 4G2, Canada
- <sup>7</sup> Servei de Ginecologia, Hospital Universitari de Bellvitge, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain
- \* Correspondence: martinsatue@ub.edu
- † Co-authorship these authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1) has been described in human non-pathological endometrium in both epithelial and stromal components without changes along the cycle. It was identified as a stromal marker of basalism. In the present study, we aimed to evaluate NTPDase2 distribution, using immunolabeling and in situ enzyme activity approaches, in endometrial carcinoma (EC) at different tumor grades. NTPDase2 was present in tumor epithelial EC cells, as in the non-pathological endometria, but the expression underwent changes in subcellular distribution and also tended to decrease with the tumor grade. In stroma, NTPDase2 was identified exclusively at the tumor-myometrial junction but this expression was lost in tumors of invasive phenotype. We have also identified in EC samples the presence of the perivascular population of endometrial mesenchymal stem cells (eMSCs) positive for sushi domain containing 2 (SUSD2) and for NTPDase2, already described in non-tumoral endometrium. Our results point to NTPDase2 as a histopathological marker of tumor invasion in EC, with diagnostic relevance especially in cases of EC coexisting with other endometrial disorders, such as adenomyosis, which occasionally hampers the assessment of tumor invasion parameters.

**Keywords:** NTPDase2; endometrial carcinoma; adenomyosis; purinergic signaling; ATP; CD39; endometrial MSC; SUSD2

## 1. Introduction

The human endometrium, the mucous membrane lining the cavity of the uterus, consists of two layers: the functionalis, adjacent to the uterine cavity, which contains the surface epithelium, the glandular epithelium, and a substantial amount of vascularized stroma;

and the basalis, adjacent to the myometrium, made up of the basal portions of the glands, a dense stroma, and blood vessels. The endometrium is a dynamic tissue with recurring cycles of regeneration to restore the functional layer, shed during menses. This regenerative capacity requires the presence of adult stem or progenitor cells. It has been suggested that stem/progenitor cells reside in the remaining basalis of the endometrium [1,2]. Clonogenic cells, or colony-forming units, have been identified in purified populations of human epithelial and stromal cells [3]. Despite the robust studies conducted in the field, nicely reviewed by de Miguel-Gómez et al. [4], more studies are required to deepen our knowledge of the regenerative capacity of the basalis. This highlights the need for describing endometrial basal stromal markers to provide tools for further study.

Extracellular adenosine triphosphate (ATP), its derived nucleotides, and the nucleoside adenosine are mediators of so-called purinergic signaling, which is involved in a wide range of physiological and pathological conditions, including proliferation, differentiation, motility, migration, death, and immune responses of cells, among others [5,6]. Ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2/CD39L1), a cell-surface member of the NTPDase (CD39) family of ectoenzymes, hydrolyses mainly ATP and, to a much lesser extent, adenosine diphosphate (ADP) [5]. We have previously described the expression of NTPDase2 in the cyclic and atrophic human endometrium without changes of expression along the menstrual cycle [7,8]. NTPDase2 is present in both surface and glandular epithelium although confined to cilia of ciliated cells [7]. Importantly, NTPDase2 has also been identified as a marker of human endometrial basal stroma, useful to trace diseases originating in the basalis, such as adenomyosis, defined by the presence of normal endometrial glandular and stromal cells in the myometrium [7]. Moreover, NTPDase2 is also expressed in the perivascular population of endometrial mesenchymal stem cells (eMSCs) positive for sushi domain containing 2 (SUSD2), the most abundant population of MSCs described in the human endometrium, located in both functionalis and basalis [7,9]. This finding coincides with a number of studies that revealed the implication of purinergic signaling in the regulation of the proliferation, differentiation, motility, migration, death, and immunomodulatory capacity of MSCs [10–14]. SUSD2<sup>+</sup>/NTPDase2<sup>+</sup> perivascular cells have also been identified in the myometrium [7]. The presence of NTPDase2 in basal stromal cells and in eMSCs, along with the role of purinergic signaling in MSCs, suggests that NTPDase2 may be involved in the control of endometrial regeneration. The fine regulation of endometrial regeneration is essential for correct reproductive function, and it is necessary to avoid an uncontrolled proliferation leading to pathological states such as cancer.

Endometrial carcinoma (EC) represents the most common gynecologic cancer in women in Western populations, reaching 12% of cancer cases [15]. Classically, ECs are classified according to their histological characteristics into endometrioid endometrial carcinomas (EECs), comprising low-grade (grade 1 and grade 2), with better prognosis, and high-grade (grade 3) tumors; and the high-grade non-endometrioid carcinomas, including the serous carcinomas as the main type, but also others such as clear cell carcinomas, endometrial carcinosarcomas, and mixed carcinomas, mostly aggressive and with a poor prognosis [16,17]. As mentioned above, purinergic signaling is involved in a wide range of cellular processes, and the purinergic imbalance observed in some inflammatory and neoplastic processes evidences its involvement in tumorigenesis and cancer progression [18]; moreover, increased levels of extracellular ATP are found in tumors [19,20]. Different studies have confirmed the involvement of purinergic signaling in ECs. The membrane pore-forming ATP receptor P2X7 is downregulated in endometrial and other gynecological cancers, probably preventing P2X7-mediated apoptosis in these tumor cells [21–24]. Other ATP receptors, such as P2X4, have been identified in EC [25]. We have previously demonstrated the expression of the so-called CD39-CD73 axis in EC, with high ATPase (and ADPase) activity in part attributable to NTPDase1 (formerly CD39), highly expressed in the tumor stroma [26]. Ecto-5′nucleotidase (CD73), also highly expressed in tumor stroma, is able to complete the hydrolysis of the adenosine monophosphate (AMP) generated by CD39 to adenosine [26]. However, CD73 expression in epithelial tumor cells in

EC decreases with the tumor grade and it has been identified as a possible modulator of epithelial migration and invasion in EC [27]. The expression of other ectonucleotidases contributing to the high nucleotidase activity in EC has not yet been studied, although their expression is well documented in non-pathological endometrium [28].

In the present study, we aimed to decipher the NTPDase2 expression in endometrial cancer at different tumor grades. We evaluated NTPDase2 expression at the stroma of the endometrial–myometrial junction both in non-invasive and desmoplastic invasive ECs, to determine whether this expression is related to the myofibroblast-like phenotype acquired by some stromal cells in EC. The chance to analyze EC samples coexistent with non-tumoral lesions, such as adenomyosis and endometrial polyps, allowed us to compare the stroma of the tumor with the non-tumoral stroma of the samples. Furthermore, we studied the presence, in EC, of the SUSD2<sup>+</sup>/NTPDase2<sup>+</sup> eMSC population, already identified in non-tumoral endometrium.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Samples

The ethical principles of this study adhere to the Helsinki Declaration, and all the procedures were approved by the ethics committee for clinical investigation of Bellvitge University Hospital (PR179/18). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Fifty-seven human EC samples were obtained from hysterectomy specimens and were diagnosed and classified by histology type and grading at the Pathology Service of Bellvitge University Hospital. Tumors included in the study were EECs (82.4%), serous carcinomas (8.8%), carcinosarcomas (5.3%), and mixed carcinomas (3.5%). The presence or absence of the following histological features of the recruited tumor cases was evaluated: 1) adenomyotic lesions, defined by the presence of endometrial glands and well-defined stroma within the myometrium away from the endometrial-myometrial junction, 2) invasion of the tumor into the myometrium, and 3) the presence or absence of surrounding reactive and fibrotic stroma, known as desmoplasia or desmoplastic reaction. Moreover, tumors were classified according to histological grading into three categories: I) high-grade tumors, including EECs grade 3 and non-endometrioid carcinomas (47.4% of cases); II) medium-grade tumors, including EECs grade 2 (17.5%); and III) low-grade tumors, including EECs grade 1 (35.1%). Two cases presented endometrial polyps with EC. A descriptive statistical summary of tumor cases is included in Table 1.

**Table 1.** Descriptive statistics of endometrial tumor samples.

EC Histologic Types		Number of Total Cases (n)	Cases without Myometrial Infiltration	Cases with Myometrial Infiltration		Adenomyotic Lesions
				with Desmoplastic Reaction	without Desmoplastic Reaction	
Endometrioid carcinoma	Grade 1	20 *	5	12 *	3	4
	Grade 2	10	1	8	1	0
	Grade 3	17	2	14	1	2
Serous carcinoma		5 *	0	5 *	0	1
Carcinosarcoma		3	1	2	0	1
Mixed carcinoma		2	0	2	0	0
Total		57	9	43	5	8

\* Including a case of endometrial carcinoma (EC) in endometrial polyp.

For immunolabeling experiments, tissue samples were cut and fixed with 4% paraformaldehyde and soaked in 30% sucrose solution at 4 °C for 24 h for cryoprotection. Then, they were embedded in O.C.T. freezing medium (Tissue-Tek<sup>®</sup>; Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands). Fifteen-µm sections were obtained using a Leica CM1950 Cryostat (Leica, Wetzlar, Germany). Sections were put onto poly-L-lysine coated glass slides and stored at −20 °C until use. Unless otherwise indicated, the reagents used were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).



## 2.2. Antibodies

The primary antibodies and their respective dilutions for immunohistochemistry and immunofluorescence experiments were mouse anti-NTPDase2 (Clone H9s; <http://ectonucleotidases-ab.com>) at 1 µg/mL, rabbit anti-NTPDase2 (CD39L1) (ALX-215-045, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) at 1:100, rabbit anti-SUSD2 (ab121214, Abcam, Cambridge, UK) at 1:400, and rabbit anti-alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (ab5694, Abcam, Cambridge, UK) at 1:200. Dilutions were made in phosphate-buffered saline (PBS). Secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated ready-to-use goat anti-mouse and anti-rabbit antibodies (EnVision™ + System; DAKO, Carpinteria, CA, USA) were used for immunohistochemistry. Secondary goat anti-mouse Alexa Fluor 488 and goat anti-rabbit Alexa Fluor 555 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were used at 1:500, diluted in PBS, for immunofluorescence experiments.

## 2.3. Immunolabeling Experiments

Immunolabeling experiments were performed as previously described [7,8]. Tissue sections were washed twice with PBS to remove the O.C.T freezing medium. Non-specific binding of antibodies was blocked by pre-incubation of samples for 1 h at room temperature (RT) with PBS containing 20% normal goat serum (NGS, Gibco, Paisley, UK), 0.2% Triton, and 0.2% gelatin (Merck, Darmstadt, Germany). For immunohistochemistry experiments, previous blocking of endogenous peroxidase activity was performed with 10% methanol (*v/v*) and 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*v/v*) in PBS for 30 min. Slices were then incubated overnight at 4 °C with the selected primary antibody. After three washes in PBS, tissue sections were incubated with the appropriate secondary antibody for 30 min in the case of HRP-conjugated antibodies and for 1 h in the case of fluorescence at RT. Secondary antibodies alone were routinely included as controls for the experiments.

For immunohistochemistry, the peroxidase reaction was performed in a solution containing 0.6 mg/mL 3, 3'-diaminobenzidine substrate (DAB; D-5637, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.5 µL/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 10 min and stopped with PBS. Nuclei were counterstained with haematoxylin and slides were then dehydrated and mounted with DPX mounting medium (BDH Laboratories, Dubai, UAE). Samples were observed under light Nikon Eclipse E200 (Nikon, Tokyo, Japan) and photographed under a light Leica DMD 108 microscope (Leica, Wetzlar, Germany). In fluorescence assays, for nucleus labeling, sections were mounted with aqueous mounting medium with DAPI (ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI, Life Technologies, Paisley, UK). Samples were observed and photographed under a Zeiss LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Fluorescence images were processed with the ZEN 2.3 SP1 software (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Immunohistochemical staining was independently evaluated by three observers. Staining distribution was recorded as protein presence or absence in the selected tumor location.

## 2.4. In Situ ATPase Activity Experiments

In situ ATPase activity was detected on tumor sections using a protocol based on the Wachstein/Meisel lead phosphate method [8,29,30]. Frozen tumor sections were kept at RT for 10 min, washed twice with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4, and pre-incubated for 30 min at RT with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 containing 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 250 mM sucrose. Enzymatic reaction was performed for 1 h at 37 °C in a buffer containing 50 mM Tris-maleate pH 7.4, 250 mM sucrose, 3% (*v/v*) dextran, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, and 2.5 mM levamisole, as an inhibitor of alkaline phosphatases, in the presence of 1 mM ATP as a substrate. Control assays were performed in the absence of ATP.

Released inorganic phosphate was revealed by incubation with 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S (*v/v*) for exactly 1 min. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Samples were mounted with Fluoromount™ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), observed under light Nikon Eclipse E200 microscope, and photographed under a light Leica DMD 108 microscope.

### 2.5. *In Silico* TCGA (The Cancer Genome Atlas) and Survival Analysis

Data used for the *in silico* analysis correspond to the uterine corpus endometrial carcinoma (TCGA-UCEC), extracted from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) through cBioPortal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org>). A total of 527 samples were used with integrated expression and clinical data. Gene expression data were downloaded as normalized fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) values, and Log<sub>2</sub> transformed. Groups were compared with a one-way analysis of variance (ANOVA) test. Survival analysis was performed with R *survminer* package (created by Alboukadel Kassambara). For overall survival (OS) and progression-free survival/disease-free survival (PFS/DFS) curves, the median values were used as cut-off for 'High' and 'Low' groups. The results are displayed as Kaplan–Meier plots, and Log-rank test was used for comparison of the survival curves. A *p*-value < 0.05 is considered statistically significant.

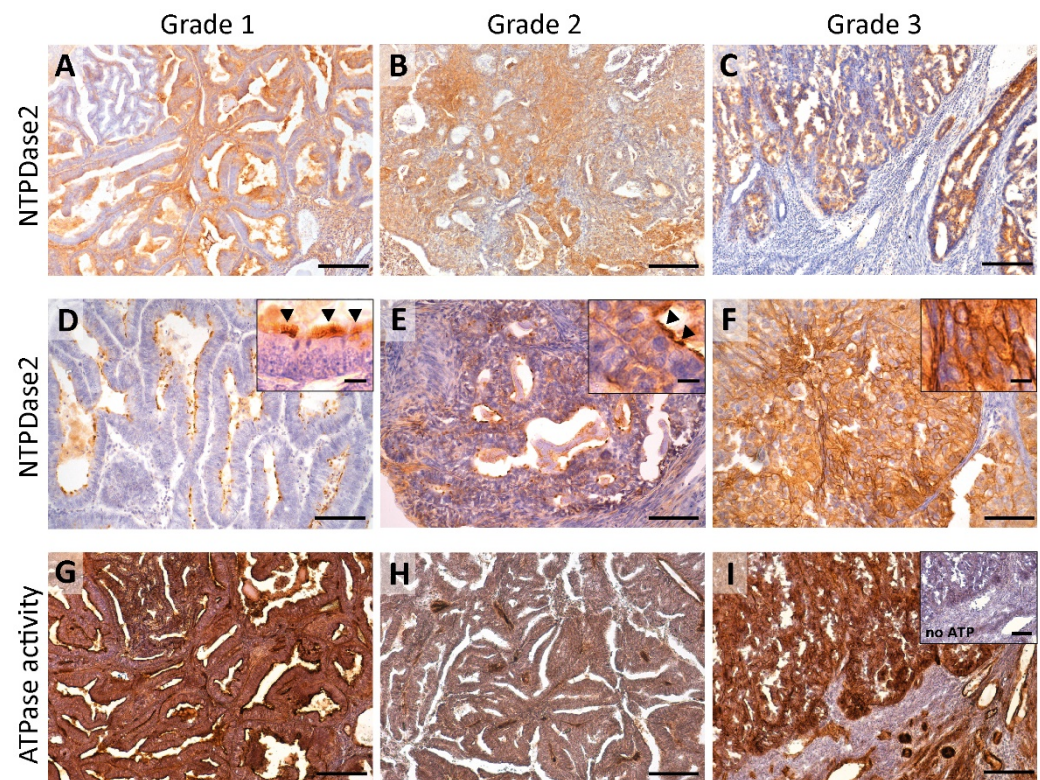
### 2.6. Statistical Analysis of Ectonucleotide Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) Presence

The predictive analytics software IBM SPSS Statistics v22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the creation of frequency tables with the presence or absence and the distribution of NTPDase2 in each tumor component as well as for grading and invasion features of EC.

## 3. Results

### 3.1. Expression of NTPDase2 in Tumor and Stromal Cells in Endometrial Carcinomas (ECs)

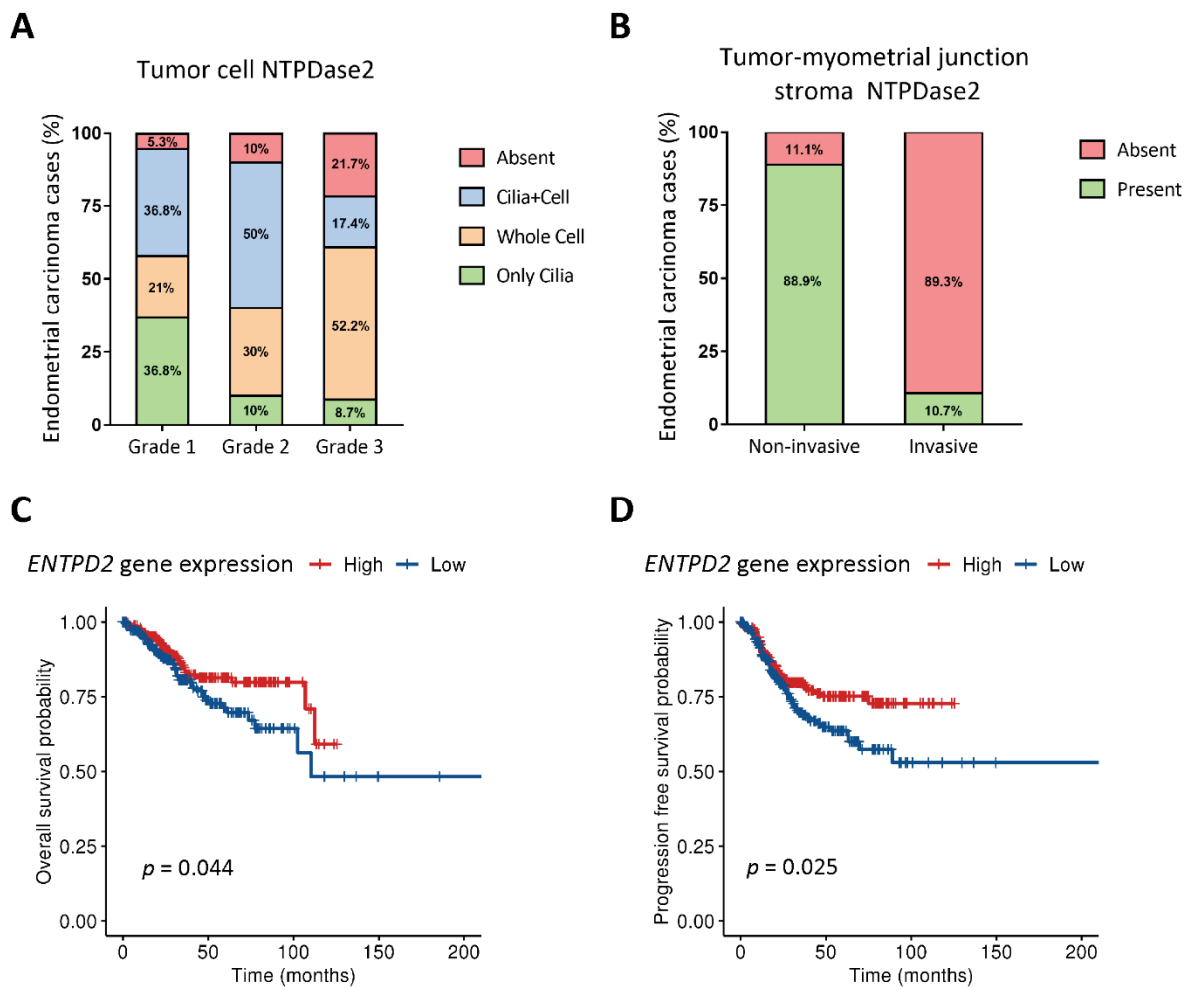
We measured the expression of NTPDase2 in ECs through immunohistochemical experiments with two different antibodies (Enzo Life Sciences and ectonucleotidases-ab.com). The presence of NTPDase2 was detected in the epithelium, the stroma, and some perivascular cells of the tumor (Figure 1). The results were the same with the two anti-NTPDase2 antibodies. ATPase activity showed a high level of coincidence with the immunohistochemical results of NTPDase2, although other members of the family present in the tissue, such as NTPDase1, might also account for this activity (Figure 1).



**Figure 1.** Immunohistochemistry  $\alpha$ -NTPDase2 (ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase-2) (A–F) and in situ enzyme ATPase activity (G–I) in ECs at different tumor grades (Grade 1, 2, 3). NTPDase2 expression was mainly observed in the tumor epithelial cells of ECs (A–F). For stroma labelling, please refer to Figures 3 and 7. Grade 1 ECs showed apical NTPDase2 label, in cilia of tumor ciliated epithelial cells (inset in D; arrowheads). In Grade 2 tumors, NTPDase2 was also mainly detected apically, usually in cilia (inset in E; arrowheads). Grade 3 tumors displayed a strong NTPDase2 label in the whole cell (F). In situ ATPase activity was strongly detected as dark brown deposits with a high level of coincidence with NTPDase2 immunodetection (G–I). Inset in (I) corresponds to the activity experiment performed in the absence of substrate. Scale bars are 200  $\mu$ m (A–C), (G–I), inset in (I), 100  $\mu$ m (D–F), 25  $\mu$ m for insets in (D–F).

### 3.1.1. Redistribution of NTPDase2 Expression with the Tumor Grade: From Containment to the Cilia to the Whole Tumor Cell

NTPDase2 was present in epithelial tumor cells but the number of tumors expressing the protein tended to decrease with the tumor grade; while 95% of grade 1 tumors expressed the protein, the percentage decreased to 78% in grade 3 tumors. However, the striking observation was the change in the subcellular distribution (Figure 2A). NTPDase2 expression was mainly detected in ciliated cells in low-grade ECs, as reported in non-tumor endometria, whereas the expression profile was generalized to the whole tumor cell membrane in high-grade ECs, a distribution not seen in non-tumor endometria. Intermediate patterns were found in grade 2. Percentages of each case are indicated in Figure 2A.



**Figure 2.** Percentage of EC cases with different pattern of NTPDase2 expression in tumoral epithelium (A) and in the stroma at the tumor-myometrial junctional zone (B). Low-grade tumors showed NTPDase2 expression mainly in cilia, while high-grade tumors lost this expression but increased the whole-cell distribution (A). NTPDase2 expression in grade 2 ECs was simultaneously present in both locations in 50% of cases (A). NTPDase2 labelling in the tumor-myometrial junction stroma was observed in most non-invasive EC cases, whereas invasive EC cases mostly lacked NTPDase2 (B). Kaplan–Meier curves of overall survival (OS) (C) and progression-free survival/disease-free survival (PFS/DFS) (D) probabilities extracted from The Cancer Genome Atlas uterine corpus endometrial carcinoma (TCGA-UCEC) cohort regarding *ENTPD2* gene expression showed a better clinical prognosis in high NTPDase2-bearing endometrial carcinomas. Log-rank test was used for comparison of the survival curves. OS: overall survival; PFS/DFS: progression-free survival/disease-free survival.

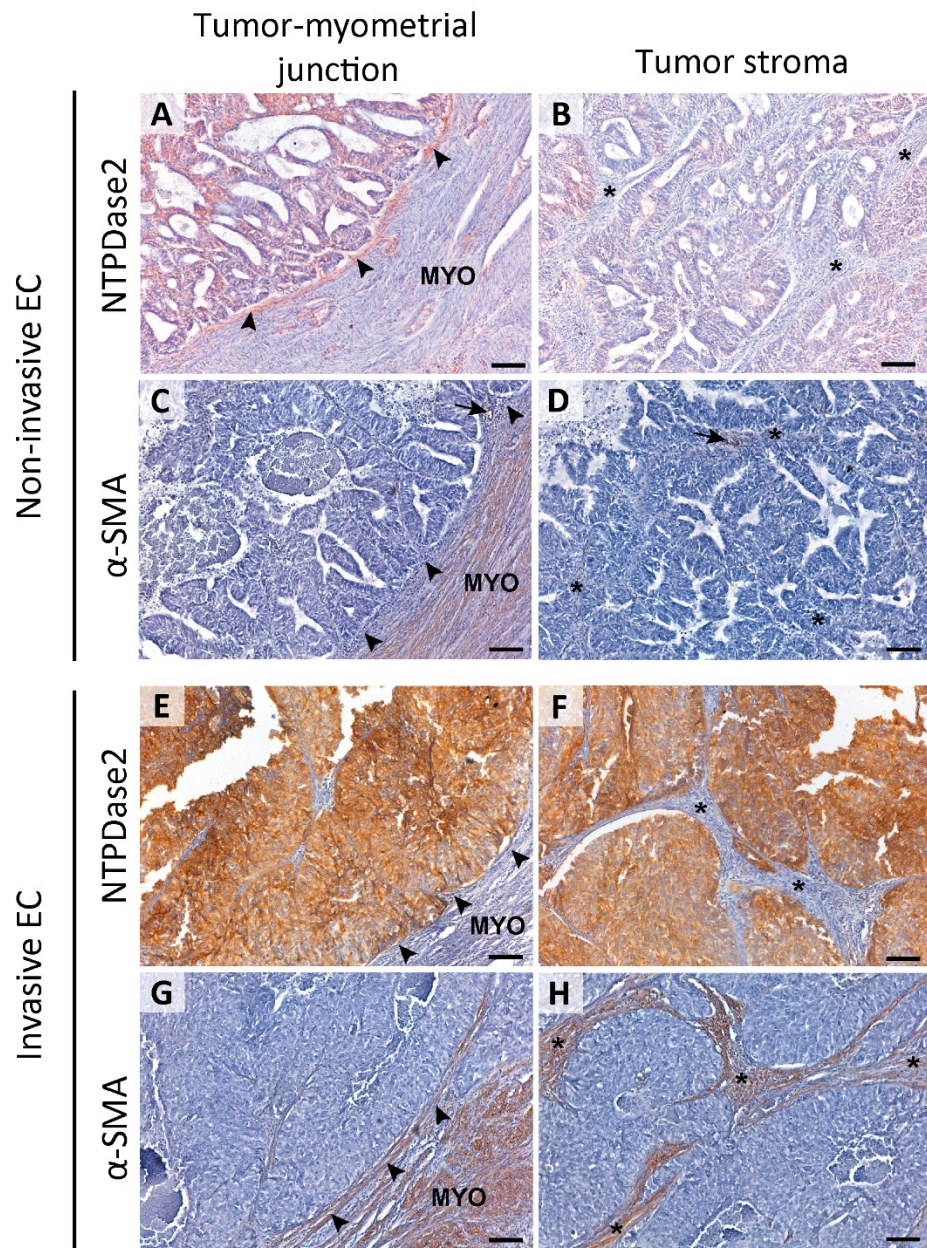
### 3.1.2. NTPDase2 Expression in the Stromal Component of Tumor: Changes during Tumor Progression

In the stroma, NTPDase2 expression was restricted to the transitional limit between the endometrial zone and the myometrium, known as the endometrial-myometrial junction. Interestingly, this expression varied depending on the tumor’s invasive phenotype.

Histological evaluation of the 57 ECs revealed 48 cases presenting invasive tumor glands in the myometrium and 9 cases with non-invasive patterns. In those 9 non-invasive tumors, we observed stromal NTPDase2 expression in endometrial-myometrial junction in 88.9% of cases (Figure 3A), all except one which was a grade 3 EEC. On the other hand, we confirmed that the myofibroblast marker  $\alpha$ -SMA was absent in stromal cells of non-invasive ECs, except in pericytes (Figure 3C,D). In contrast, 89.3% of invasive tumors did not present NTPDase2 label in the stroma near or in the myometrium (Figure 3E,F). The other 10.7% of cases had the stroma labeled. Most of these invasive EC cases showed



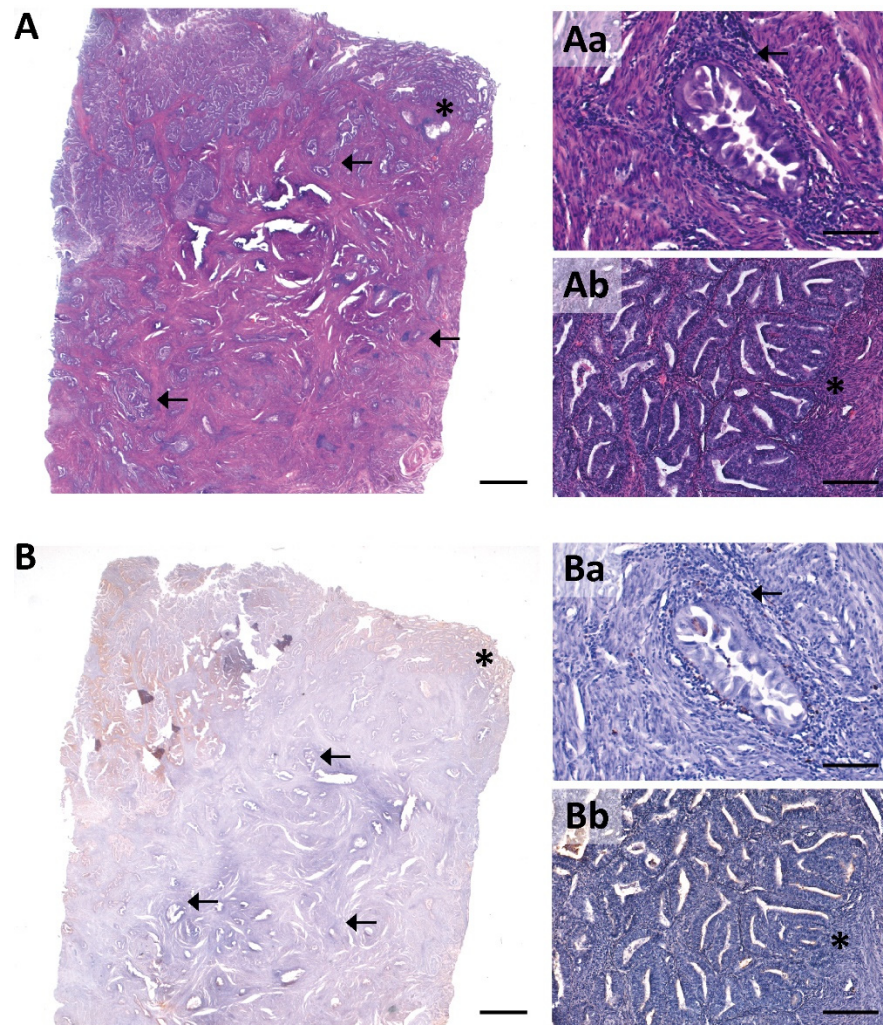
$\alpha$ -SMA expression in the stroma (Figure 3G,H). NTPDase2 relative expression results are represented in Figure 2B.



**Figure 3.** Immunolocalization of NTPDase2 and  $\alpha$ -SMA in the stroma of non-invasive (A–D) and invasive ECs (E–H). NTPDase2 was immunodetected in the stromal cells located in the tumor-myometrial junction (A; arrowheads) of non-invasive EC, but not in the rest of the stroma (B; \* asterisks). In these tumors,  $\alpha$ -SMA expression was not detected either in tumor-myometrial junction stroma (C; arrowheads) or in the rest of the stroma (D; \* asterisks), except in pericytes enveloping some vessels (C,D; arrows). In invasive EC, the absence of NTPDase2 expression in stroma was generalized in the tumor-myometrial junction (E; arrowheads) as well as in the rest of the stroma (F; \* asterisks). Conversely, the immunodetection of  $\alpha$ -SMA was extended to tumor-myometrial junction (G; arrowheads) as well as to the rest of the stroma (H; \* asterisks). Scale bars are 100  $\mu$ m. MYO: myometrium.



Desmoplasia, frequently reported in invasive endometrial cancer and often presenting abundant inflammatory infiltrate, was observed in the 43 invasive EC tumors studied here. In these tumors, NTPDase2 staining was absent (88.4%) or barely detected (11.6%) in desmoplastic stromal cells wrapping the infiltrating nests with desmoplasia (Figure 4).

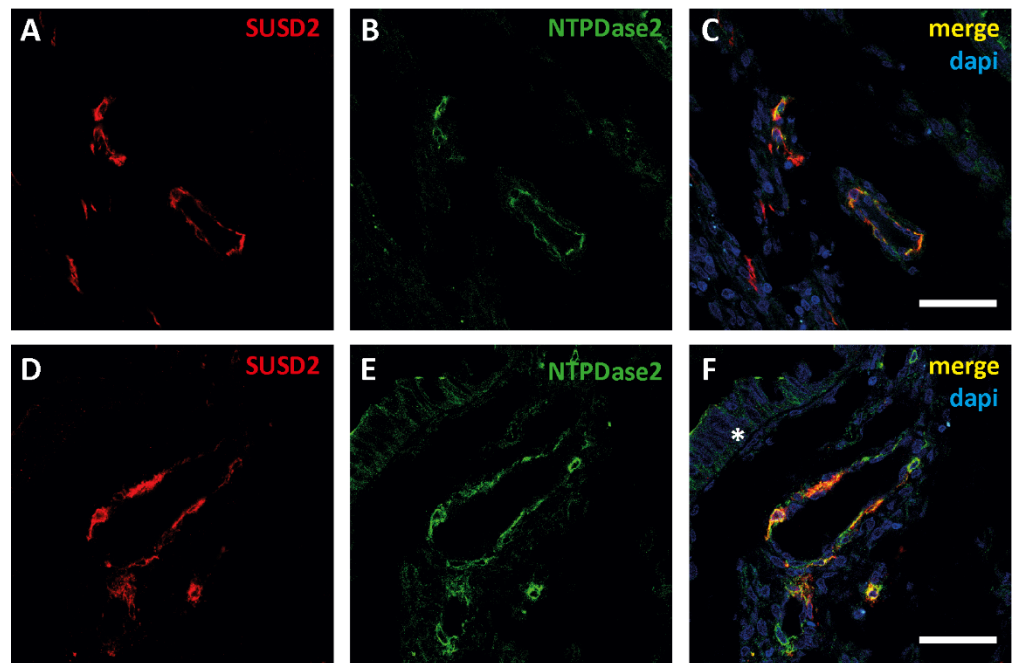


**Figure 4.** Consecutive sections of an invasive EC with haematoxylin and eosin staining (**A**) and NTPDase2 immunolabeling (**B**). Desmoplasia in the myometrium appeared as a reactive stromal tissue surrounding the invasive glands with immune cell infiltration (**Aa**; arrow). NTPDase2 was absent in the desmoplastic stromal cells (**Ba**; arrow). **Ab** is a detail of the tumor-myometrial junctional zone. The lack of NTPDase2 was also patent in the stromal tissue of this zone (**Bb**; \* asterisk). Scale bars are 1 mm (**A,B**), 200  $\mu$ m (**Ab,Bb**) and 100  $\mu$ m (**Aa,Ba**).

### 3.1.3. NTPDase2<sup>+</sup>/SUSD2<sup>+</sup> (Sushi Domain Containing 2) Perivascular Cell Population: Endometrial Mesenchymal Stem Cells (eMSCs) Are also Present in ECs

NTPDase2 expression was also observed in a population of cells surrounding some vessels in both the tumor and the myometrium. In the non-pathological endometrium, this population of perivascular eMSCs positive for SUSD2 and NTPDase2 has already been described [7]. The double labelling with anti-SUSD2 and anti-NTPDase2 confirmed the perivascular colocalization of these two proteins in endometrial tumors (Figure 5).



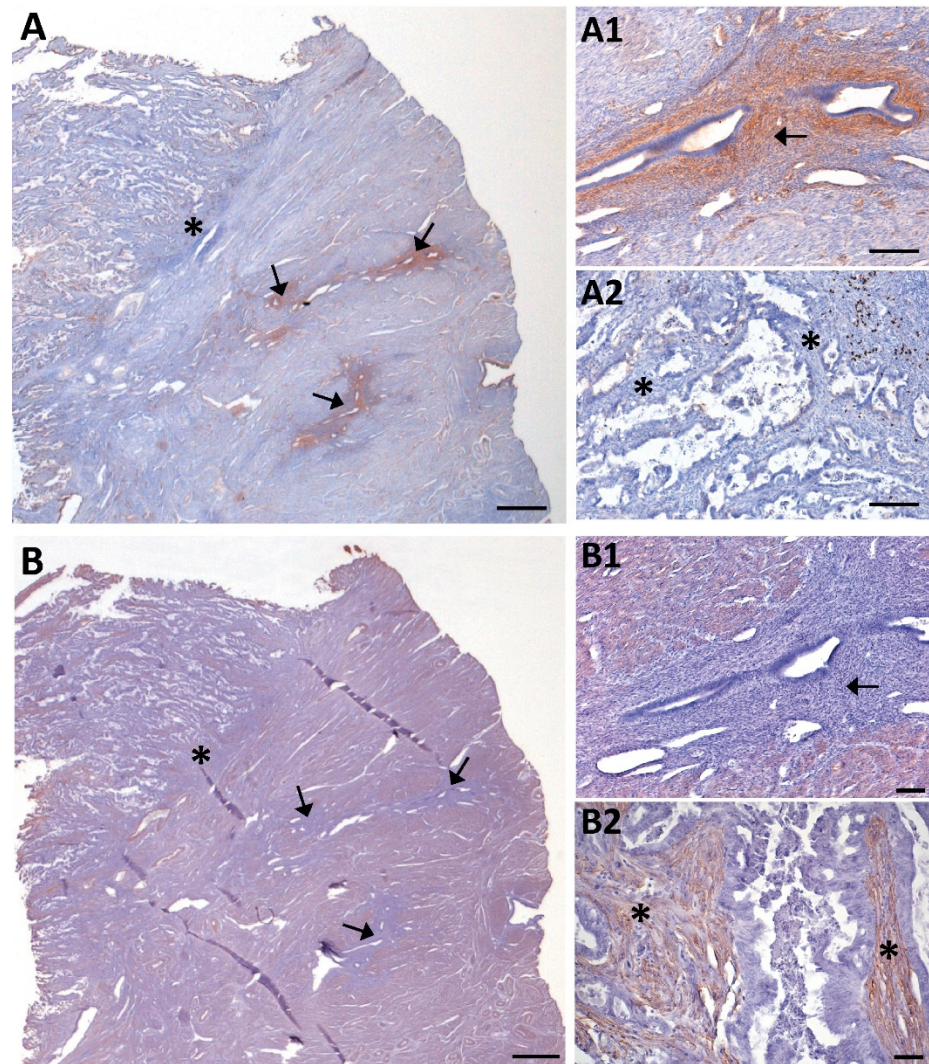


**Figure 5.** Confocal fluorescence images of different zones of a section of an EC sample with antibodies against sushi domain containing 2 (SUSD2, red, **A,D**) and NTPDase2 (green, **B,E**). Merged images (yellow, **C,F**) show the colocalization of SUSD2 with NTPDase2 in cells surrounding blood vessels in the tumor. Moreover, NTPDase2 was also detected in the tumor cells (**F**, \* asterisk). Nuclei were labeled with DAPI (blue, **C,F**). Scale bars are 50  $\mu$ m.

#### 3.1.4. Coexistence of Adenomyosis and Endometrial Polyps with ECs: Comparison of NTPDase2 Expression in Tumor and Non-Tumor Tissues

Adenomyotic lesions, arising from the basal layer of the endometrium, and endometrial polyps, are a good illustration of NTPDase2 expression in the non-tumoral endometrial tissue of patients.

Adenomyotic lesions were detected in 8 cases of the recruited ECs, 7 being invasive tumors (Supplementary Figure S1). Six of these invasive ECs coexistent with adenomyotic lesions presented expression of NTPDase2 in the endometrial stromal cells of the adenomyotic lesion, but not in the desmoplastic stromal cells located in the invasive front (Figure 6A). In contrast,  $\alpha$ -SMA was immunodetected in the desmoplastic stromal cells of invasive front but not in endometrial stromal cells of the adenomyotic lesions (Figure 6B). The only case of invasive tumor that lacked NTPDase2 staining in desmoplastic stromal cells was also devoid of NTPDase2 staining in the stromal and perivascular cells of the adenomyotic lesion.



**Figure 6.** NTPDase2 (A) and  $\alpha$ -SMA (B) immunolabeling of consecutive sections of a case of invasive EC coexistent with adenomyotic lesions (arrows). (A1,A2) and (B1,B2) are details of (A) and (B) respectively. Adenomyosis in the myometrium appeared as non-pathologic endometrial glands surrounded by endometrial stroma expressing NTPDase2 (A1; arrow). Conversely,  $\alpha$ -SMA was not detected in the endometrial stromal cells of adenomyotic lesions (B1; arrow). NTPDase2 was not expressed in the stroma of the tumor (A2; \* asterisks), while  $\alpha$ -SMA was present (B2; \* asterisks). Scale bars are 1 mm (A,B), 100  $\mu$ m (A1,A2,B1) and 50  $\mu$ m (B2).

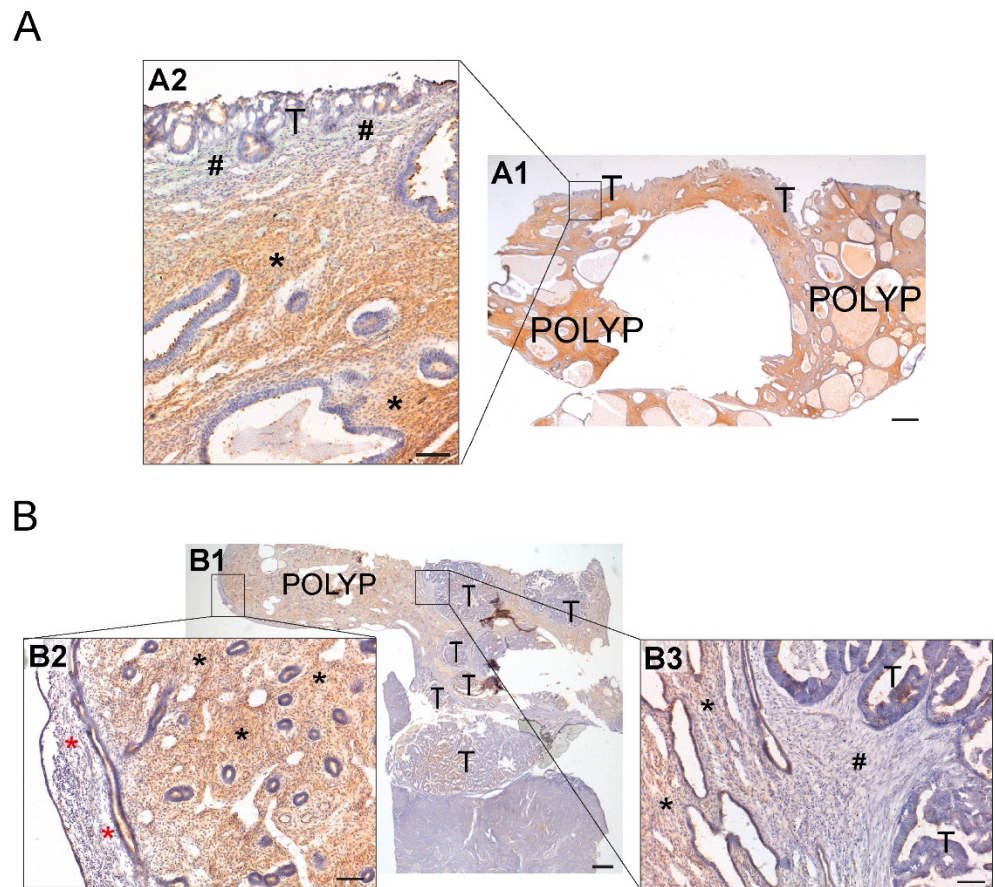
Additionally, NTPDase2 was detected along the entire length of the cilia of endometrial ciliated cells in adenomyotic lesions (Supplementary Figure S2). We also detected perivascular labeled NTPDase2 in some of these adenomyotic lesions (Supplementary Figure S2).

In the only case in which we found the coexistence of non-invasive EC with adenomyosis, we detected NTPDase2 expression in both the adenomyotic stroma and the stromal cells of the endometrial–myometrial junction.

Finally, we also studied two cases with coexistence of invasive ECs, one serous carcinoma and one EEC (grade 1), with endometrial polyps. NTPDase2 expression in the endometrial polyp glands was limited to the cilia of ciliated cells (as in non-pathological endometrium), while endometrial tumor cells presented an apical expression of NTPDase2 and lacked cilia. As expected, NTPDase2 expression was also detected in stromal cells of endometrial polyps, as described in the basal part of the non-tumoral endometrium. Conversely, the invasive stroma and/or desmoplastic stroma enwrapping invasive tumor glands did not present NTPDase2 labeling. NTPDase2 expression was also detected in



some perivascular cells in endometrial polyps. The two analyzed cases are included in Figure 7.



**Figure 7.** Immunodetection of NTPDase2 in two cases of ECs coexisting with endometrial polyps (endometrial non-tumoral tissue) (A,B). (A1) Invasion of endometrial polyp by serous carcinoma. Invasive tumor cells (T) appeared surrounded by stromal cells lacking NTPDase2 (A2; # pound signs), while endometrial stromal cells of endometrial polyp showed NTPDase2 label (A2; \* asterisks). (B1) Invasion of endometrial polyp by grade 1 endometrioid endometrial carcinoma (EEC). Image (B2) shows the functional layer of endometrium with a negative stroma for NTPDase2 (\* red asterisks). NTPDase2 was immunodetected in the endometrial stroma of endometrial polyp (B2,B3; \* black asterisks). Desmoplastic stroma surrounding invasive endometrial tumor cells did not show NTPDase2 label (B3; # pound sign). Scale bars are 1 mm (A1,B1) and 100 μm (A2,B2,B3). T: tumor cells; POLYP: endometrial polyp.

### 3.1.5. Overall-Survival Probability and Progression-Free Survival: Patients with High Levels of NTPDase2 Show a Better Prognosis for EC

Kaplan–Meier for overall-survival probability and the progression-free survival ratios were calculated for a cohort of patients diagnosed with endometrial carcinoma of endometrium from TCGA. Gene analysis revealed two groups: cases with high and those with low *ENTPD2* expression. We compared the survival probabilities of the two groups (Figure 2C,D).

A significantly increased overall survival probability was observed in the high *ENTPD2* EC group compared with the low *ENTPD2* expression ECs. The log rank analysis showed statistically significant differences with a *p*-value of 0.044, indicating that there was an influence of the *ENTPD2* expression in the prognosis of endometrial carcinoma patients.

Disease-free survival probability was also higher in the high *ENTPD2* expression group. The log rank analysis showed statistically significant differences with a *p*-value of 0.025, suggesting that high *ENTPD2* expression accounts for longer disease-free survival periods.

#### 4. Discussion

The purinergic system is the extracellular signaling pathway, mediated by nucleotides and nucleosides, involved in the control of multiple physiological and pathological processes, including proliferation, differentiation, motility, migration, cell death, and immunological response [5,6,10]. These events are essential components of neoplastic transformation, tumor generation, and cancer progression. Therefore, the large number of emerging studies on purinergic signaling in the cancer context is not surprising [24,31]. The study of ectonucleotidases, the specialized nucleotide-hydrolyzing enzymes that regulate the levels of extracellular ATP, has become crucial to our understanding of endometrial homeostasis in health and disease.

EC is the most frequent of the malignant tumors of the female genital tract with an important intertumoral heterogeneity, depending on histological and molecular types, and also intratumoral, due to the different cell components within the same tumor [32,33]. The study of the protein expression profile of EC, including the study of ectonucleotidases, contributes to the improvement of the diagnosis and tumor staging and, in consequence, the clinical management of patients [34].

In the present study we have characterized the expression of NTPDase2, in both the epithelial and the stromal component, of low- and high-grade ECs. NTPDase2 distribution was recently reported in non-pathological endometrium, with expression in three different locations without changes along the cycle or with menopause. Epithelial location was restricted to the cilia of epithelial ciliated cells, while stromal expression exclusively matched the basalis. Finally, NTPDase2 is also a marker of the perivascular SUSD2<sup>+</sup> eMSC population [7].

In the epithelial component of the tumor, low-grade ECs (grade 1) displayed a similar pattern of NTPDase2 expression to that of the non-tumoral endometrium, exclusively staining the cilia [7]. The presence of cilia in endometrial tumors is not unusual and has been related mostly with better differentiated tumors [35], which is consistent with these results. High-grade tumors (grade 3) changed the pattern of NTPDase2 expression, acquiring a predominant whole-cell staining, which is never observed in the non-tumoral endometrial epithelium. Grade 2 ECs showed an intermediate pattern, with expression of NTPDase2 simultaneously in both locations, reflecting a transitional state. Finally, a number of grade 3 tumors lose NTPDase2 expression. This coincides with the decreased CD73 expression reported in tumor cells of ECs [27]. Our results indicate a possible involvement of NTPDase2 in tumor progression and malignancy in EC, as observed in other cancers. In hepatocellular carcinoma, for example, NTPDase2 promotes tumor growth and the maintenance of myeloid-derived suppressor cells, allowing cancer cells to escape immune surveillance by suppressing T cells in mice [36]. In gliomas, where there is low NTPDase2 activity, the enzyme restores favored tumor progression and spreading in a rat model [37,38].

In terms of the stroma of tumors, the analysis of NTPDase2 expression revealed a relevant finding of importance for diagnosis. NTPDase2 stromal expression, when present, is limited to the tumor stroma at the endometrial–myometrial junction. Importantly, there is loss of expression in correlation with the acquisition of an invasive phenotype, independently of the histological type or even the grade. Therefore, tumors with non-invasive phenotype have NTPDase2<sup>+</sup> stroma, while tumors that invade the myometrium mostly lose expression. Remarkably, invasive EC samples with non-invasive areas showed NTPDase2 expression, specifically, in these zones.

As mentioned, in the non-pathological endometrium, NTPDase2 has been described as a marker of basalis since its expression is restricted to this layer, without changes along the menstrual cycle. Normal endometrial homeostasis depends on the integrity of the endometrial–myometrial junction, the area of intimate contact between the deepest part of the basalis and the myometrium, and alterations in the endometrial–myometrial junctional zone (e.g., changes in thickness) can lead to disorders such as endometriosis, adenomyosis, and even cancer [39–41].

Moreover, tumor invasion involves crosstalk between tumor epithelial and stromal cells [42–46]. Therefore, the loss of stromal NTPDase2 expression at the endometrial–myometrial junction might be involved in modifications of the invasive ability of endometrial tumor cells. A clear example of how stromal NTPDase2 expression can influence the behavior of epithelium is found in liver, under normal conditions. Expression of NTPDase2 by portal fibroblasts inhibits activation of basolateral P2Y receptors expressed by bile duct epithelia, downregulating bile duct proliferation. The loss of expression of NTPDase2 in portal fibroblasts triggers bile ductular hyperproliferation, while there is also a transdifferentiation in portal fibroblasts, which change to myofibroblast-like cells, in biliary fibrosis and cirrhosis [47,48]. In fact, it has been suggested that the loss of NTPDase2 is the earliest event in myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts [49]. Based on the results shown here and in accordance with the literature, loss of stromal NTPDase2 expression in tumors, with the acquisition of a myofibroblast-like phenotype, might well be a necessary change to promote myometrial invasion [50–52]. In line with this, we confirmed that tumor stromal cells acquire a myofibroblast-like phenotype ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) exclusively in invasive ECs. This  $\alpha$ -SMA staining in stromal cells accompanying the invasive foci in the myometrium matched the lack of NTPDase2 expression in these cells. These results support the hypothesis of a loss of NTPDase2 as an early event in the transdifferentiation to a myofibroblast-like phenotype.

Several studies have examined the presence of myofibroblast-like cells in stroma of invasive tumors [51–54]. It has been suggested that there exist two heterogenic populations of cancer-associated fibroblasts (CAFs) in tumoral stroma: type I (without expression of  $\alpha$ -SMA), which limits tumor growth [55], and type II (with upregulated expression of  $\alpha$ -SMA and vimentin), which promotes angiogenesis and metastasis of the tumor [46,55]. Based on the results shown here, it seems that type I CAFs are mainly present in non-invasive ECs, while the stroma of invasive ECs is mainly composed of type II CAFs ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>). Previous studies in EC established that type II CAFs ( $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) trigger proliferation, migration, and invasion of endometrial tumoral cells as well as in vivo tumorigenesis [56,57]. Further studies are needed to elucidate the precise role of NTPDase2 in EC progression and invasiveness.

Our results point to the usefulness of NTPDase2 as a marker of tumor invasion in EC, especially in cases in which EC coexists with other endometrial disorders, such as adenomyosis, which occasionally hampers the assessment of parameters of tumor invasion [58]. When a myometrial invasion statement might be challenging due to the presence of adenomyosis foci [59,60], the use of NTPDase2 expression might help to overcome this limitation, since adenomyosis retains the expression while invasive (and desmoplastic) tumor areas of the sample do not. Other markers have been studied with the purpose of differentially labeling invasive and non-invasive tumor stroma and adenomyotic stroma. CD10 is a broadly used marker of endometrial stroma but does not distinguish between different invasive phenotypes [61–64]. More recently, interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1/CD225) has been identified as a stromal marker differentially labeling the stroma depending on the invasive phenotype [64]. The expression pattern of IFITM1 is very similar to that presented here for NTPDase2 although IFITM1 labels the whole stroma.

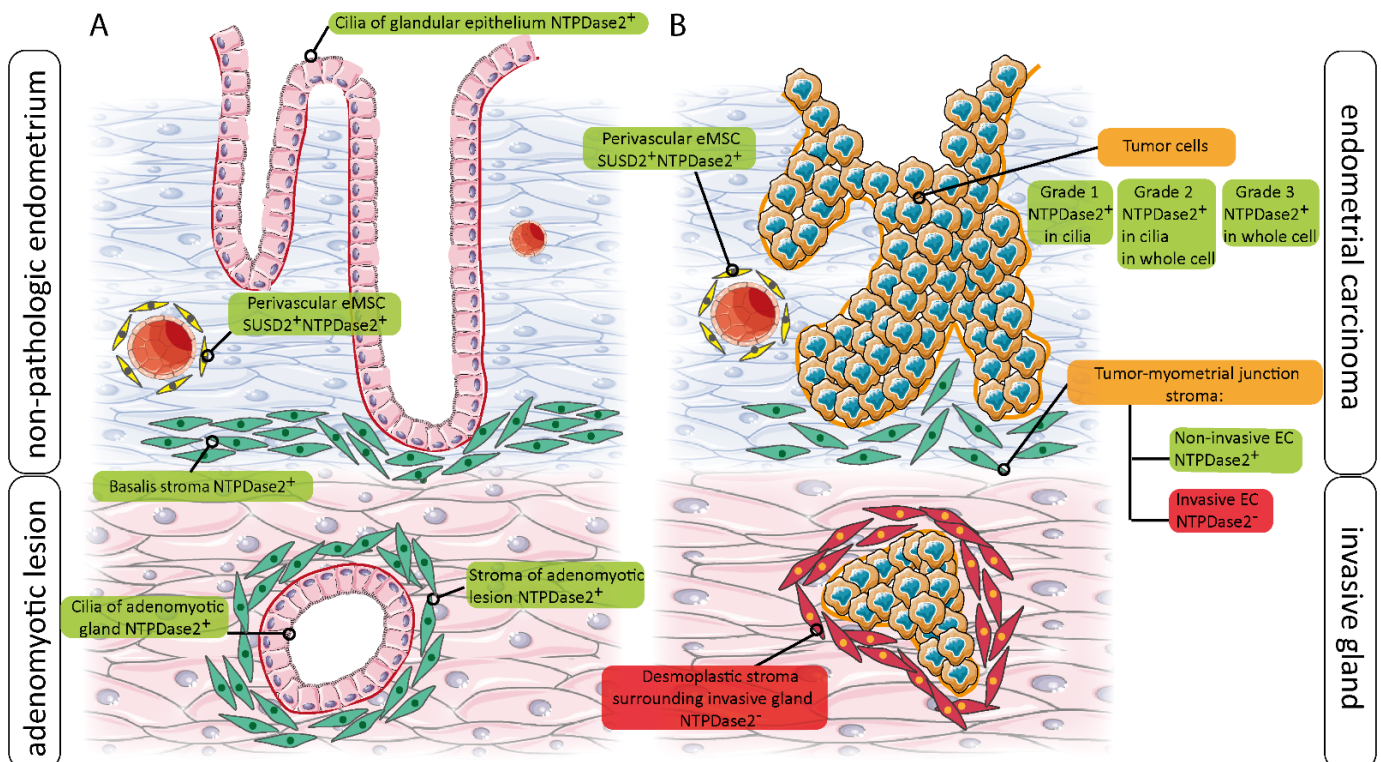
In addition, our results of NTPDase2 expression in adenomyotic lesions and endometrial polyps match our previously published description of NTPDase2 expression in endometrial samples without cancer pathology, where NTPDase2 was found in the cilia of ciliated cells and in stromal cells [7]. Moreover, we show here that the perivascular SUSD2<sup>+</sup>/NTPDase2<sup>+</sup> eMSCs population is also present in ECs.

Finally, the conclusions of the study of the *ENTPD2* gene expression profile in 527 ECs included in TCGA were in line with the analysis at the protein level, specially at the stroma. There are two groups with clinical impact in relation to high or low levels of *ENTPD2* expression. High *ENTPD2* levels in EC patients significantly correlated with a better prognosis and longer-disease free survival, displaying higher OS and PFS ratios. This co-



incides with the decrease in protein expression in the stroma of invasive tumors, with a worse prognosis.

A graphical summary is shown in Figure 8, where the distribution and expression changes of NTPDase2 in non-pathological, adenomyotic, and tumor endometria are described. This summary clearly shows that stem cell markers, such as NTPDase2, can be expressed in other cell types.



**Figure 8.** Schematic representation of NTPDase2 changes of expression in relation to non-tumoral endometrium (non-pathologic, and adenomyotic tissue) (A) and in the invasive and non-invasive ECs (B).

### 5. Conclusions

This is the first report of NTPDase2 expression in ECs, with changes matching different invasive phenotypes. The analysis of the NTPDase2 expression at the endometrial–myometrial junction evidences its potential use as a marker to differentiate between non-invasive, NTPDase2+ stroma, and invasive, desmoplastic NTPDase2- stroma. Adenomyosis foci and endometrial polyps are also clearly NTPDase2+. The loss of NTPDase2 coinciding with acquisition of  $\alpha$ -SMA expression in invasive stromal cells opens up a promising new field of study in ECs.

Furthermore, we confirmed that the SUSD2+/NTPDase2+ eMSC population is retained in EC.

The cell pathways in which NTPDase2 is involved in EC are in need of deciphering. Its activity might influence the final balance of available nucleotides in the tissue microenvironment, as in the case of proinflammatory extracellular ATP in endometriosis [7].



**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jpm11050331/s1>, Supplementary Figure S1: Haematoxylin and eosin staining in a case of invasive EC coexistent with adenomyosis, Supplementary Figure S2: NTPDase2 immunodetection in adenomyotic lesion from a case of EC coexistent with adenomyosis.

**Author Contributions:** A.R.-M. and C.T. contributed equally to the design and execution of the experiments and contributed to the original draft preparation. A.V. and X.M.-G. performed the histopathologic diagnoses; J.M.P. contributed to the *in silico* studies; J.S. generated the antibodies against human NTPDase2; M.M.-S. conceived the study and contributed to writing, reviewing, and editing the manuscript; I.G.d.A. gave technical support; M.E.F.-M. and J.P., visited the patients included in the study, made the clinical diagnoses, and performed the surgery to obtain the samples; J.M.P., X.M.-G. and M.M.-S. contributed to funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (grants number: PI18/00541 to M.M.-S., PI17/01527 to J.M.P.), co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-“a Way to Build Europe”-//FONDOS FEDER “una manera de hacer Europa”, and by La Marató de TV3 (project 201919-33 to JMP). X.M.-G. received support from AECC (Asociación Española Contra el Cáncer; GCTRA18014MATI). J.S. received support from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and was the recipient of a “Chercheur National” research award from the Fonds de recherche du Québec—Santé (FRQS). A.R.-M. is the recipient of a PhD fellowship from the AECC (Asociación Española Contra el Cáncer).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the ethics committee for clinical investigation of Bellvitge University Hospital (Protocol code: PR179/18; date of approval: 9 May 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We thank CERCA Programme (Generalitat de Catalunya) for institutional support, Tom Yohannan for language editing, and Serveis Científics i Tecnològics (Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona) for technical support. We are grateful to the women who donated their samples for the study and to the endometriosis association Endo&Cat for supporting the project.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, collection, analyses, or interpretation of data, writing of the manuscript, or the decision to publish the results.

## References

1. Gargett, C.E.; Schwab, K.E.; Deane, J.A. Endometrial stem/progenitor cells: The first 10 years. *Hum. Reprod. Update* **2016**, *22*, 137–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tempest, N.; Maclean, A.; Hapangama, D.K. Endometrial Stem Cell Markers: Current Concepts and Unresolved Questions. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3240. [[CrossRef](#)]
3. Chan, R.W.; Schwab, K.E.; Gargett, C.E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.* **2004**, *70*, 1738–1750. [[CrossRef](#)]
4. de Miguel-Gómez, L.; López-Martínez, S.; Francés-Herrero, E.; Rodríguez-Eguren, A.; Pellicer, A.; Cervelló, I. Stem Cells and the Endometrium: From the Discovery of Adult Stem Cells to Pre-Clinical Models. *Cells* **2021**, *10*, 595. [[CrossRef](#)]
5. Yegutkin, G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 473–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Burnstock, G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2016**, *371*, 20150422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Trapero, C.; Vidal, A.; Rodríguez-Martínez, A.; Sevigny, J.; Ponce, J.; Coroleu, B.; Matias-Guiu, X.; Martín-Satue, M. The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: A novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells. *Purinergic Signal.* **2019**, *15*, 225–236. [[CrossRef](#)]
8. Trapero, C.; Vidal, A.; Fernández-Montoli, M.E.; Coroleu, B.; Tresserra, F.; Barri, P.; Gómez de Aranda, I.; Sevigny, J.; Ponce, J.; Matias-Guiu, X.; et al. Impaired Expression of Ectonucleotidases in Ectopic and Eutopic Endometrial Tissue Is in Favor of ATP Accumulation in the Tissue Microenvironment in Endometriosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Masuda, H.; Anwar, S.S.; Bühring, H.J.; Rao, J.R.; Gargett, C.E. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplant.* **2012**, *21*, 2201–2214. [[CrossRef](#)]

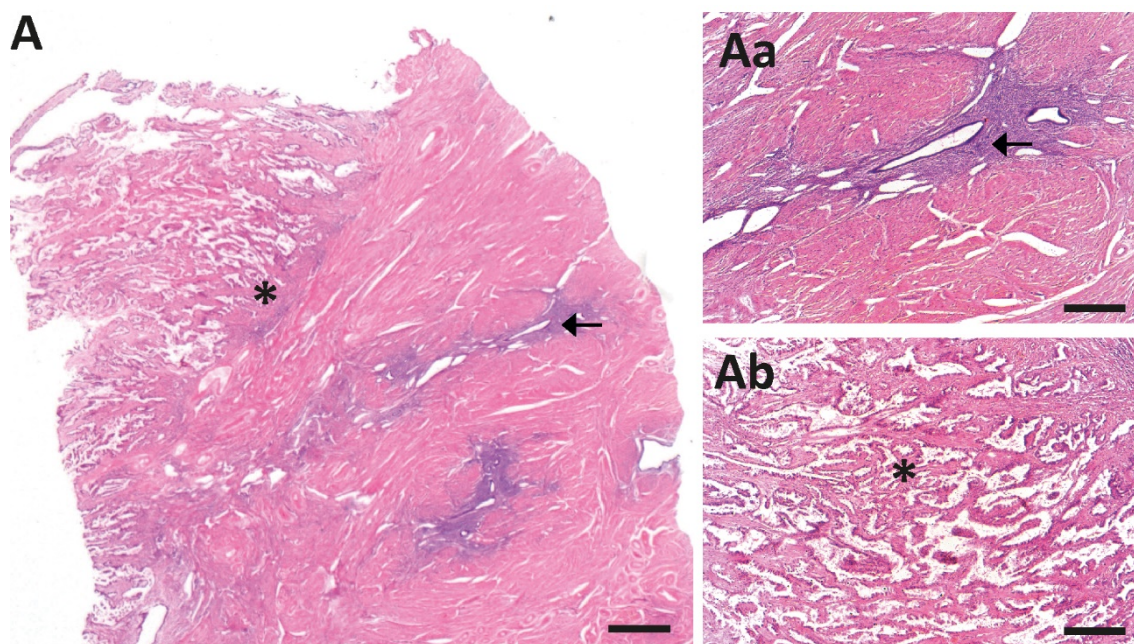
10. Scarfi, S. Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J. Stem Cells* **2014**, *6*, 153–162. [[CrossRef](#)]
11. Roszek, K.; Wujak, M. How to influence the mesenchymal stem cells fate? Emerging role of ectoenzymes metabolizing nucleotides. *J. Cell Physiol.* **2018**, *234*, 320–334. [[CrossRef](#)]
12. Zippel, N.; Limbach, C.A.; Ratajski, N.; Urban, C.; Luparello, C.; Pansky, A.; Kassack, M.U.; Tobiasch, E. Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 884–900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Coppi, E.; Pugliese, A.M.; Urbani, S.; Melani, A.; Cerbai, E.; Mazzanti, B.; Bosi, A.; Saccardi, R.; Pedata, F. ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2007**, *25*, 1840–1849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ferrari, D.; Gulinelli, S.; Salvestrini, V.; Lucchetti, G.; Zini, R.; Manfredini, R.; Caione, L.; Piacibello, W.; Ciciarello, M.; Rossi, L.; et al. Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Exp. Hematol.* **2011**, *39*, 360–374.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.M.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, E359–E386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Matias-Guiu, X.; Prat, J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology* **2013**, *62*, 111–123. [[CrossRef](#)]
17. Soslow, R.A.; Tornos, C.; Park, K.J.; Malpica, A.; Matias-Guiu, X.; Oliva, E.; Parkash, V.; Carlson, J.; McCluggage, W.G.; Gilks, C.B. Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of the International Society of Gynecological Pathologists. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2019**, *38* (Suppl. 1), S64–S74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Bergamin, L.S.; Braganhol, E.; Zanin, R.F.; Edelweiss, M.I.; Battastini, A.M. Ectonucleotidases in tumor cells and tumor-associated immune cells: An overview. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 959848. [[CrossRef](#)]
19. Pellegatti, P.; Raffaghello, L.; Bianchi, G.; Piccardi, F.; Pistoia, V.; Di Virgilio, F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. de Andrade Mello, P.; Coutinho-Silva, R.; Savio, L.E.B. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1526. [[CrossRef](#)]
21. North, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 1013–1067. [[CrossRef](#)]
22. Wang, Q.; Wang, L.; Feng, Y.H.; Li, X.; Zeng, R.; Gorodeski, G.I. P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *287*, C1349–C1358. [[CrossRef](#)]
23. Li, X.; Zhou, L.; Feng, Y.H.; Abdul-Karim, F.W.; Gorodeski, G.I. The P2X7 receptor: A novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2006**, *15*, 1906–1913. [[CrossRef](#)]
24. Li, X.; Qi, X.; Zhou, L.; Catera, D.; Rote, N.S.; Potashkin, J.; Abdul-Karim, F.W.; Gorodeski, G.I. Decreased expression of P2X7 in endometrial epithelial pre-cancerous and cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **2007**, *106*, 233–243. [[CrossRef](#)]
25. Colas, E.; Perez, C.; Cabrera, S.; Pedrola, N.; Monge, M.; Castellvi, J.; Eyzaguirre, F.; Gregorio, J.; Ruiz, A.; Llauro, M.; et al. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 2435–2444. [[CrossRef](#)]
26. Aliagas, E.; Vidal, A.; Texido, L.; Ponce, J.; Condom, E.; Martin-Satue, M. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 509027. [[CrossRef](#)]
27. Bowser, J.L.; Blackburn, M.R.; Shipley, G.L.; Molina, J.G.; Dunner, K., Jr.; Broadus, R.R. Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 220–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Aliagas, E.; Vidal, A.; Torrejon-Escribano, B.; Taco Mdel, R.; Ponce, J.; de Aranda, I.G.; Sevigny, J.; Condom, E.; Martin-Satue, M. Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal.* **2013**, *9*, 227–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wachstein, M.; Meisel, E.; Niedzwiedz, A. Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead-adenosine triphosphate technique. *J. Histochem. Cytochem.* **1960**, *8*, 387–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Villamonte, M.L.; Torrejon-Escribano, B.; Rodriguez-Martinez, A.; Trapero, C.; Vidal, A.; Gomez de Aranda, I.; Sevigny, J.; Matias-Guiu, X.; Martin-Satue, M. Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity. *Histochem. Cell Biol.* **2018**, *149*, 269–276. [[CrossRef](#)]
31. Gorodeski, G.I. Purinergic Signalling in the Reproductive System. *Auton. Neurosci.* **2015**, *191*, 82–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gatus, S.; Cuevas, D.; Fernández, C.; Roman-Canal, B.; Adamoli, V.; Piulats, J.M.; Eritja, N.; Martin-Satue, M.; Moreno-Bueno, G.; Matias-Guiu, X. Tumor Heterogeneity in Endometrial Carcinoma: Practical Consequences. *Pathobiology* **2018**, *85*, 35–40. [[CrossRef](#)]
33. Silva, C.; Pires-Luís, A.S.; Rocha, E.; Bartosch, C.; Lopes, J.M. Phenotypic Intratumoral Heterogeneity of Endometrial Carcinomas. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2018**, *37*, 154–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hutt, S.; Tait, A.; Ellis, P.; Michael, A.; Butler-Manuel, S.; Chatterjee, J. The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: A literature review. *Acta Oncol.* **2019**, *58*, 342–352. [[CrossRef](#)]
35. Hendrickson, M.R.; Kempson, R.L. Ciliated carcinoma—a variant of endometrial adenocarcinoma: A report of 10 cases. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **1983**, *2*, 1–12. [[CrossRef](#)]
36. Chiu, D.K.; Tse, A.P.; Xu, I.M.; Di Cui, J.; Lai, R.K.; Li, L.L.; Koh, H.Y.; Tsang, F.H.; Wei, L.L.; Wong, C.M.; et al. Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Braganhol, E.; Morrone, F.B.; Bernardi, A.; Huppel, D.; Meurer, L.; Edelweiss, M.I.; Lenz, G.; Wink, M.R.; Robson, S.C.; Battastini, A.M. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1434–1442. [[CrossRef](#)]
38. Braganhol, E.; Zanin, R.F.; Bernardi, A.; Bergamin, L.S.; Cappellari, A.R.; Campesato, L.F.; Morrone, F.B.; Campos, M.M.; Calixto, J.B.; Edelweiss, M.I.; et al. Overexpression of NTPDase2 in gliomas promotes systemic inflammation and pulmonary injury. *Purinergic Signal.* **2012**, *8*, 235–243. [[CrossRef](#)]
39. Tanos, V.; Balami, S.; Lingwood, L. Junctional zone endometrium alterations in gynecological and obstetrical disorders and impact on diagnosis, prognosis and treatment. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2019**, *31*, 418–427. [[CrossRef](#)]
40. Huang, M.; Li, X.; Guo, P.; Yu, Z.; Xu, Y.; Wei, Z. The abnormal expression of oxytocin receptors in the uterine junctional zone in women with endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2017**, *15*, 1. [[CrossRef](#)]
41. Rasmussen, C.K.; Hansen, E.S.; Dueholm, M. Two- and three-dimensional ultrasonographic features related to histopathology of the uterine endometrial-myometrial junctional zone. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2019**, *98*, 205–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wald, O.; Izhar, U.; Amir, G.; Kirshberg, S.; Shlomai, Z.; Zamir, G.; Peled, A.; Shapira, O.M. Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: Role in non-small cell lung cancer tumor proliferation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2011**, *141*, 1503–1512. [[CrossRef](#)]
43. Lis, R.; Touboul, C.; Halabi, N.M.; Madduri, A.S.; Querleu, D.; Mezey, J.; Malek, J.A.; Suhre, K.; Rafii, A. Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells induces a background dependent pro-metastatic transcriptomic profile. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*, 59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M.I.; Koutsopoulos, A.; Mendrinos, S.; Sivridis, E. The metabolic interactions between tumor cells and tumor-associated stroma (TAS) in prostatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 1284–1289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Kitadai, Y. Cancer-stromal cell interaction and tumor angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Microenviron.* **2010**, *3*, 109–116. [[CrossRef](#)]
46. Akatsu, Y.; Takahashi, N.; Yoshimatsu, Y.; Kimuro, S.; Muramatsu, T.; Katsura, A.; Maishi, N.; Suzuki, H.I.; Inazawa, J.; Hida, K.; et al. Fibroblast growth factor signals regulate transforming growth factor- $\beta$ -induced endothelial-to-myofibroblast transition of tumor endothelial cells via Elk1. *Mol. Oncol.* **2019**, *13*, 1706–1724. [[CrossRef](#)]
47. Jhandier, M.N.; Kruglov, E.A.; Lavoie, E.G.; Sévigny, J.; Dranoff, J.A. Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22986–22992. [[CrossRef](#)]
48. Yu, J.; Lavoie, E.G.; Sheung, N.; Tremblay, J.J.; Sévigny, J.; Dranoff, J.A. IL-6 downregulates transcription of NTPDase2 via specific promoter elements. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *294*, G748–G756. [[CrossRef](#)]
49. Kruglov, E.A.; Nathanson, R.A.; Nguyen, T.; Dranoff, J.A. Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *290*, G765–G771. [[CrossRef](#)]
50. Otranto, M.; Sarrazy, V.; Bonté, F.; Hinz, B.; Gabbiani, G.; Desmoulière, A. The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh. Migr.* **2012**, *6*, 203–219. [[CrossRef](#)]
51. De Wever, O.; Mareel, M. Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 55–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kawashiri, S.; Tanaka, A.; Noguchi, N.; Hase, T.; Nakaya, H.; Ohara, T.; Kato, K.; Yamamoto, E. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* **2009**, *31*, 1346–1353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Orimo, A.; Tomioka, Y.; Shimizu, Y.; Sato, M.; Oigawa, S.; Kamata, K.; Nogi, Y.; Inoue, S.; Takahashi, M.; Hata, T.; et al. Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3097–3105.
54. Alpizar-Alpizar, W.; Laerum, O.D.; Christensen, I.J.; Ovrebø, K.; Skarstein, A.; Høyer-Hansen, G.; Ploug, M.; Illemann, M. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Is Confined to Tumor-Associated Myofibroblasts and Is Increased With Progression in Gastric Adenocarcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* **2016**, *64*, 483–494. [[CrossRef](#)]
55. Augsten, M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 62. [[CrossRef](#)]
56. Teng, F.; Tian, W.Y.; Wang, Y.M.; Zhang, Y.F.; Guo, F.; Zhao, J.; Gao, C.; Xue, F.X. Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *J. Hematol. Oncol.* **2016**, *9*, 8. [[CrossRef](#)]
57. Subramaniam, K.S.; Tham, S.T.; Mohamed, Z.; Woo, Y.L.; Mat Adenan, N.A.; Chung, I. Cancer-associated fibroblasts promote proliferation of endometrial cancer cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68923. [[CrossRef](#)]
58. Ali, A.; Black, D.; Soslow, R.A. Difficulties in assessing the depth of myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2007**, *26*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Hernandez, E.; Woodruff, J.D. Endometrial adenocarcinoma arising in adenomyosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1980**, *138*, 827–832. [[CrossRef](#)]
60. McCluggage, W.G. Pathologic Staging of Endometrial Carcinomas: Selected Areas of Difficulty. *Adv. Anat. Pathol.* **2018**, *25*, 71–84. [[CrossRef](#)]
61. Toki, T.; Shimizu, M.; Takagi, Y.; Ashida, T.; Konishi, I. CD10 is a marker for normal and neoplastic endometrial stromal cells. *Int. J. Gynecol. Pathol.* **2002**, *21*, 41–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Srodon, M.; Klein, W.M.; Kurman, R.J. CD10 immunostaining does not distinguish endometrial carcinoma invading myometrium from carcinoma involving adenomyosis. *Am. J. Surg. Pathol.* **2003**, *27*, 786–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Nascimento, A.F.; Hirsch, M.S.; Cviko, A.; Quade, B.J.; Nucci, M.R. The role of CD10 staining in distinguishing invasive endometrial adenocarcinoma from adenocarcinoma involving adenomyosis. *Mod. Pathol.* **2003**, *16*, 22–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Busca, A.; Djordjevic, B.; Giassi, A.; Parra-Herran, C. IFITM1 Is Superior to CD10 as a Marker of Endometrial Stroma in the Evaluation of Myometrial Invasion by Endometrioid Adenocarcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **2016**, *145*, 486–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

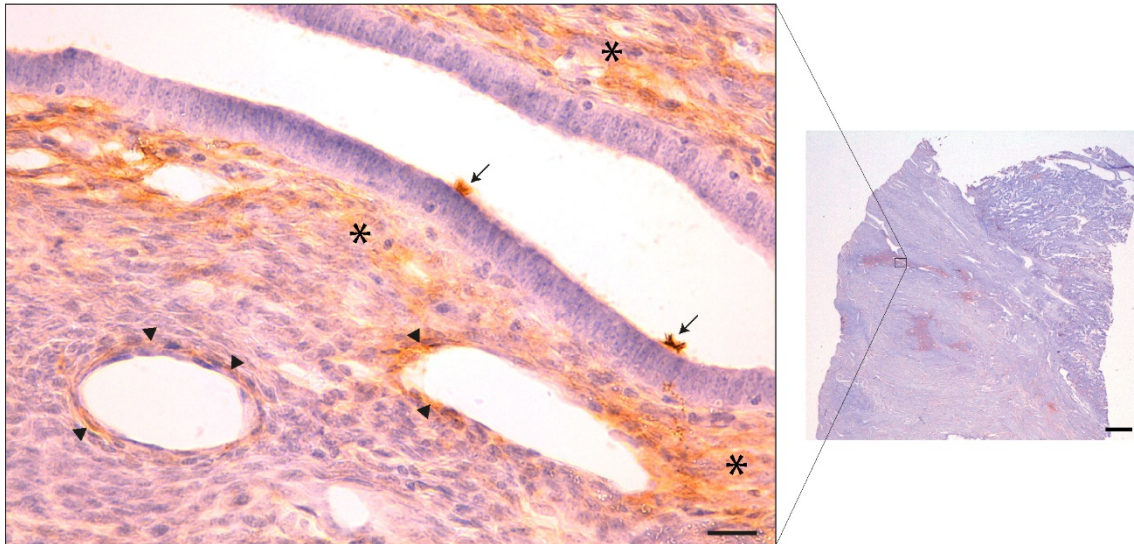


## Material suplementari 1



**Supplementary Figure 1.** Haematoxylin and eosin staining in a case of invasive EC coexistent with adenomyosis. Adenomyotic lesions are composed of endometrial glands and highly cellular stroma, and for this reason, these foci appeared mainly dyed with haematoxylin (Aa; arrow). Conversely, tumor stroma is less cellular and more fibrotic (desmoplastic), with greater affinity for eosin (Ab; asterisk). Scale bars are 1 mm (A) and 100  $\mu$ m (Aa,Ab).

Material suplementari 2



**Supplementary Figure 2.** NTPDase2 immunodetection in adenomyotic lesion from a case of EC coexistent with adenomyosis. NTPDase2 label is present in the cilia of endometrial ciliated cells (arrows), in the stroma (asterisks), and in perivascular cells of adenomyotic lesion (arrowheads). Scale bars are 1 mm and 20  $\mu$ m (detail).





# AGRAÏMENTS

*"Com vagi jo i ho trobi... [...]"*

*"No trobaries aigua al mar."*

Lluïsa Candela



## AGRAÏMENTS

Arribar a escriure els agraïments em fa adonar-me'n que queda poquet. No ha sigut gens fàcil però he tingut la sort d'estar envoltada de molta gent que m'ha ajudat i m'ha donat l'escalf per seguir endavant, i és per això que possiblement els agraïments haurien de ser l'apartat més llarg de la tesi. Tot i això, i ja sabeu que em costa moltíssim, intentaré ser breu.

En primer lloc, agrair a les **pacients** que han participat en els estudis inclosos en la tesi, amb especial menció a l'**Associació d'Afectades d'Endometriosis de Catalunya (EndoCat)**. Moltes gràcies per la participació i pel vostre suport en el projecte. Desitjo que aquesta petita pedreta que he posat en la recerca en l'endometriosis serveixi per estar més a prop d'aconseguir la cura o una millora exponencial.

A la directora de la meva tesi, la **Dra. Mireia Martín Satué**, moltes gràcies per totes i cada una de les oportunitats que m'has donat, per la confiança, pels consells, per tot el que m'has ensenyat i per fer-me sentir que el projecte era meu. I ara a la Mireia, més enllà de la feina, moltes gràcies per les vegades que t'has reunit amb mi per aconsellar-me i animar-me, per creure en mi quan ni jo mateixa ho feia i per sentir que tenia una mare en el laboratori. Crec que ja saps ho agraïda que estic i tota l'estima que et tinc, i no segueixo perquè seria massa "ñoñi"...

Al **Dr. Xavier Matias-Guiu**, el mecenes de la meva tesi i de la meva carrera professional. Ara ja sí em podràs dir Dra. Traperó! Mil gràcies per totes les oportunitats que m'has donat, la veritat que gràcies a treballar amb tu estic plena d'experiències, he après moltíssim i a dia d'avui estic preparada per treballar en molts escenaris diferents. Espero poder seguir complint més reptes nous que m'ofereixis i estar a l'alçada de les noves oportunitats que segur que vindran. Gràcies per tota la confiança i el recolzament.

A l'estimadíssima **Inmaculada Gómez de Aranda**, madre mía Inma, que paciencia has tenido (y tienes) conmigo. Me has enseñado todo desde cero. Me siento tan afortunada de haber trabajado contigo, de verdad, no me imagino estos años sin ti. Esa alegría, ese cariño, esa luz, tanta ayuda, esa mantita... Lo que parece mentira es que he aprendido muchísimas cosas de ti, de hecho, una parte enorme de todo lo que sé, como por ejemplo el arte de hacer filtros, pero sigo sin tener gracia contando chistes... no lo entiendo. Lo dicho, muchísimas gracias por todo y ya sabes que t'estimo molt.

Al **Dr. Joan Blasi**, ja saps que la mare de la ciència és la paciència, però per aguantar-me a mi encara et cal molta més! Com em ric quan t'explico les meves coses i els *cotilleos*... Moltes gràcies per tot Joan, per resoldre'm tots els dubtes tècnics i existencials que em sorgeixen en el laboratori, per sempre pensar en mi quan cal un exalumne de la carrera i per tenir sempre unes paraules d'ànim preparades. Espero un dia gaudir tant de la ciència com ho fas tu!

Al **Dr. Benjamin Torrejón**, el meu *sensei* de la Histologia i de la microscòpia en general. Gràcies per ensenyar-me una i una altra vegada com funcionen els microscopis, editar imatges, les barres d'escala... i sobretot gràcies per fer-me riure tant i tant sempre! Ets el millor, amb samarretes de

Kukuxumusu i sense, encara que em vas posar un B baix en una pràctica d'histo, que sàpigues que jo no m'oblido...

Moltes gràcies al **Dr. August Vidal** per totes les vegades que has tret uns minutets, que no et sobren, per resoldre els meus dubtes. Gràcies per tanta ajuda, per les bones idees i per ensenyar-me tanta histopatologia.

Al **Dr. Carles Solsona**, bona gent i no només per ser gracienc! Moltes gràcies Carles per totes les oportunitats que m'has donat. Ha estat un plaer treballar al teu costat. Aprofita que ara comença la millor etapa!

Al **Dr. Artur Llobet**, moltes gràcies per tota l'ajuda rebuda aquests anys.

Als ginecòlegs de l'Hospital de Bellvitge i de l'Hospital Dexeus que han participat en el projecte, en especial a la **Dra. Eulalia Fernández**, moltes gràcies per tota la informació i la implicació en el projecte. Sempre recordaré el primer congrés que vaig assistir i que va ser gràcies a tu.

Al **Dr. Lluís Jover**, gràcies per tot el que em vas ensenyar. Vas aconseguir que tingués petites nocions de bioestadística, però ens ha faltat temps per aconseguir que li perdés la por. Una abraçada molt forta.

A tots els meus **companys de laboratori**, en especial al meu compi de grup, l'Aitor Rodríguez. Gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat, se que m'emporto la teva amistat i la del Pablo i que hi sereu sempre que us necessiti, moltíssimes gràcies als dos. Aneu pensant com ho celebrarem! A l'Ernest, no hem pogut coincidir gaire aquests últims mesos, però gràcies per tots els missatges de *whatsapp* d'ànims. A la Mercè, la Ceci, la Beatrice, la Marta... moltíssimes gràcies a totes per les xerrades a l'hora del dinar quan podíem baixar a la 1a planta i per tots els moments viscuts aquests anys. Al Jonathan, el meu excompi de despatx, gràcies infinites per totes les converses, conspiracions per dominar el món i els infinits consells tan necessaris per mi. També hi ha molta gent que ha passat pel laboratori aquests anys, que han deixat bonics records i els hi tinc molta estima, com la Maria i la Marina. Margalida, un anyet en el laboratori es va fer curt però va ser suficient per saber que vals mil, gràcies per ser-hi.

I al meu entorn fora del laboratori. A les meves amigues del màster, les verduleres, gràcies **Ainhoa, Paola, Romina, Neus i Miraldy**. Encara que repartides per diferents ciutats i països seguim ben unides i heu fet que tota la tesi fos molt més fàcil, gràcies per fer-me desconnectar i per estar sempre al meu costat, sou les millors. I Ainhoa, gràcies per la quantitat de menjar i sucre que hem compartit per aconseguir sobreviure al doctorat i no caure en un atac d'ansietat.

Als meus companys de la universitat, al **Boix**, a la **Claudia** i en especial a l'**Oriol**! Uri gràcies per ser un dels millors amics que es pot tenir, segur que "la gotita" et fa arribar ben lluny perquè t'ho mereixes.

I a la meva família. **Enric** aquests mesos t'has guanyat el cel! Merci per cuidar-me i estimar-me tant, per fer-me riure i recarregar-me d'energia positiva. Ets el millor company d'aventures que

es pot tenir. No ho podria haver aconseguit sense tu, ets increïble. Gràcies als **Nurios**, a la **Clara**, a la **Chary et al.**, a la **Marga**, als meus **tiets**, a les meves **cosines i cosins**, a la **Leire** i la **Saida**... gràcies per tota l'estima i el sentiment d'orgull que m'heu fet arribar sempre, és genial poder comptar amb tots vosaltres quan cal celebrar coses, però també quan les coses es posen més complicades. A la **Carmeta**, la meva còmplice, la meva fan número u i molt més que una àvia. I sobretot, a qui he d'agrair-ho tot és als **meus pares**, saber que us tinc al meu costat ho torna tot molt més fàcil. La mama, la reina dels petons i les grans solucions. El papa, de poques paraules però abraçades que ho arreglen tot. Gràcies per tot l'amor que em doneu cada dia, pel suport incondicional i per ser els millors pares del món. Espero arribar ben lluny per omplir-vos d'orgull i tornar-vos tota la felicitat que em feu sentir. Com sempre és un bon moment per fer-ho, no perdré l'oportunitat de recordar-vos que us estimo molt.

A tots, infinites gràcies.







