



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

# Implicación de las ectoenzimas ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (familia CD39) en mecanismos de progresión del cáncer de endometrio

Aitor Rodríguez Martínez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



# IMPLICACIÓN DE LAS ECTOENZIMAS ECTONUCLEÓSIDO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASAS (FAMILIA CD39) EN MECANISMOS DE PROGRESIÓN TUMORAL DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

Memoria para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado en Biomedicina

**Aitor Rodríguez Martínez**

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

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

y

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)

Directores: **Dra. Mireia Martín Satué** y **Dr. Xavier Matias-Guiu Guia**

Barcelona, 2022



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la “Ayuda Predoctoral en Oncología-APRO2016” de la Junta Provincial de Barcelona de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC).

La investigación realizada ha contado con la financiación de las ayudas:

Fondo de Investigación en Salud (FIS), del Instituto de Salud Carlos III, referencias: PI18/00541, concedida a la Dra. Mireia Martín Satué y PI17/01527, concedida al Dr. Xavier Matias-Guiu.

Soporte a los Grupos Coordinados Clínicos de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), referencia GCTRA18014MATI, concedida al Dr. Xavier Matias-Guiu.

Este trabajo se ha llevado a cabo en la unidad de Histología del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut del Campus de Bellvitge de la Universitat de Barcelona y en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Bellvitge, en el Grup de Recerca en Càncer Ginecològic del Oncobell.



**IDI  
BELL**



**UNIVERSITAT DE  
BARCELONA**



# IMPLICACIÓN DE LAS ECTOENZIMAS ECTONUCLEÓSIDO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASAS (FAMILIA CD39) EN MECANISMOS DE PROGRESIÓN TUMORAL DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

Memoria presentada por Aitor Rodríguez para optar al título de Doctor  
por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado en Biomedicina

El doctorando:

Aitor Rodríguez Martínez

La directora y tutora:

Dra. Mireia Martín Satué

El director:

Dr. Xavier Matias-Guiu Guia



*A mi familia y amigos,*





# ÍNDICE



RESUMEN .....	15
ABREVIATURAS.....	19
INTRODUCCIÓN.....	25
1. El cáncer de endometrio .....	25
1.1 Clasificación del cáncer de endometrio.....	25
1.1.1 Clasificación histopatológica .....	25
1.1.2 Clasificación molecular .....	28
1.2 Heterogeneidad tumoral en el cáncer de endometrio .....	30
1.2.1 Patología molecular del cáncer de endometrio .....	31
1.3 Tratamiento del cáncer de endometrio.....	35
2. La señalización purinérgica.....	39
2.1 Receptores y señalización mediada por nucleótidos y nucleósidos extracelulares .....	40
2.2 Regulación de los niveles de ATP y adenosina extracelular: las ectonucleotidasas .....	43
2.2.1 Familia de las ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (CD39) .....	49
2.2.2 Familia de las nucleótido pirofosfatasas/fosfodiesterasas.....	51
2.2.3 Familia Ecto-5' nucleotidasa (CD73) .....	51
2.2.4 Familia de las fosfatasas alcalinas .....	52
2.3 Las ectonucleotidasas en el sistema reproductor femenino .....	52
3. La señalización purinérgica en el cáncer .....	56
3.1 La señalización purinérgica en el cáncer de endometrio.....	61
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	65
RESULTADOS .....	69
CAPÍTULO 1. Análisis de las ectoenzimas NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3, NPP3, CD73, CD26, ADA, PLAP y TNAP en tumores primarios de cáncer de endometrio .....	71
Introducción y Objetivos.....	73
Materiales y Métodos.....	74
Resultados .....	76
Discusión.....	82

CAPÍTULO 2. Caracterización del marcador de célula madre mesenquimal endometrial ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-2 (NTPDasa2/CD39L1) en carcinomas de endometrio de alto y bajo grado: pérdida de la expresión estromal en los fenotipos invasivos .....	89
CAPÍTULO 3. Las ectonucleotidasas de la familia ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (CD39) regulan la proliferación y la migración celular en el cáncer de endometrio: análisis histopatológico, celular y molecular de la NTPDasa3/CD39L3 .....	112
Introducción y Objetivos.....	113
Materiales y Métodos.....	114
Resultados .....	123
Discusión.....	134
CAPÍTULO 4. Caracterización de las ectonucleotidasas en oviductos humanos con una técnica mejorada que identifica simultáneamente la expresión proteica y la actividad enzimática in situ .....	141
CAPÍTULO 5. Los organoides derivados de células tumorales endometriales son herramientas útiles para el estudio de las enzimas de la familia ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (CD39) y para la validación de inhibidores enzimáticos .....	153
DISCUSIÓN.....	185
CONCLUSIONES.....	195
BIBLIOGRAFÍA.....	199
ANEXOS .....	225
ANEXO 1. <i>In situ identification of ectoenzymes involved in the hydrolysis of extracellular nucleotides</i> .....	225
ANEXO 2. Portada de la revista Histochemistry and Cell Biology, año 2018, volumen 149(3) .....	231

# RESUMEN



El cáncer de endometrio representa actualmente una patología compleja en cuanto a su diagnóstico y tratamiento. Es de gran importancia el estudio de nuevas vías para detectar las posibles alteraciones en los diferentes tipos de tumores de endometrio y, específicamente, en los tipos celulares que lo componen. El trifosfato de adenosina (ATP) y la propia adenosina acumulados en el microambiente tumoral, activan la cascada de señalización purinérgica, relacionada con diferenciación, proliferación, inflamación e inmunosupresión. Las ectonucleotidasas son ectoenzimas que modifican los niveles de nucleótidos por procesos de hidrólisis extracelular. La expresión aumentada de algunas de ellas, como el eje CD39-CD73, potencia un estado de inmunosupresión por acumulación de adenosina, favoreciendo la progresión tumoral. Dicho eje es diana de diversas inmunooncoterapias en las que se bloquea su actividad mediante anticuerpos para limitar la acumulación de adenosina. Sin embargo, CD39 y CD73 no son las únicas ectoenzimas presentes en los tumores, y en nuestro grupo de investigación, hemos caracterizado la expresión de las cuatro familias de ectonucleotidasas en el endometrio no patológico y también en la condición de endometriosis. La presente Tesis se centra en el estudio de estas enzimas en el cáncer de endometrio.

El objetivo de esta Tesis es esclarecer si la vía adenosinérgica puede valorarse como diana diagnóstica y/o terapéutica en el cáncer de endometrio. En concreto, los objetivos son, por un lado, determinar la expresión y actividad de las ectonucleotidasas en los diferentes tumores de endometrio, estudiando muestras humanas mediante inmunomarcaje y, por otro lado, generar modelos útiles para el estudio de las ectonucleotidasas en el contexto del cáncer de endometrio.

Los principales resultados apuntan al papel de dos de los miembros de la familia CD39, la NTPDasa2 y la NTPDasa3, en la progresión del cáncer de endometrio, presentando heterogeneidad en la expresión génica y proteica entre tipos y grados tumorales, con impacto en parámetros clínico-patológicos de la enfermedad. Hemos generado herramientas moleculares para sobreexpresar cada una de estas ectoenzimas en cultivos celulares de cáncer de endometrio tanto en dos como en tres dimensiones, siendo útiles para utilizar en ensayos funcionales y de testeo de inhibidores enzimáticos. Además, el análisis histocitopatológico y molecular demuestra que la NTPDasa3



disminuye en expresión en tumores avanzados y que su sobreexpresión en células tumorales disminuye, de manera generalizada, el potencial tumorigénico afectando vías relacionadas con proliferación y motilidad celulares.

# LISTA DE ABREVIATURAS



$\alpha\beta$ -meADP	alfa beta metilen ADP
AC	adenilil ciclasa o ciclasa de adenilato
ADA	adenosina desaminasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ado	adenosina
ADP	adenosina difosfato
AKT/PKB	proteína quinasa B
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
BCA	ácido bicinconínico
BCIP	fosfato de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl
CCC	carcinoma de células claras
CF	citometría de flujo
CHD4	<i>chromodomain helicase DNA binding protein 4</i>
CNH	número de copias alta
CNL	número de copias baja
CNT	transportador de nucleótidos concentrativo
DAB	diaminobencidina
DAG	diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCC	carbón recubierto de dextrano
DFS	supervivencia libre de enfermedad
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DPPIV	dipeptidil peptidasa IV
Ecto-5'-NT	ecto-5'-nucleotidasa
EdU	5-etinil-2'-desoxiuridina

---

EEC	carcinoma endometrial endometriode
ENT	transportador equilibrativo de nucleótidos
ER	receptor de estrógenos
ESGO	Sociedad Europea de Oncología Ginecológica
ESMO	Sociedad Europea de Oncología Médica
ESP	Sociedad Europea de Patología
ESTRO	Sociedad Europea por la Radioterapia y la Oncología
FACS	separación celular activada por fluorescencia
FBS	suero bovino fetal
FGFR2	receptor de tipo 2 del factor de crecimiento de fibroblastos
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetría
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FPKM	fragmentos por kilobase de transcrito por millón de fragmentos mapeados
GCAP	proteínas activadoras de la guanilil ciclasa
GFP	proteína verde fluorescente
gp130 <sup>RB13-6</sup>	glicoproteína 130
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HER-2/neu	receptor epidermal humano de tipo 2
HRP	peroxidasa de rábano
IAP	fosfatasa alcalina de tipo intestinal
IF	inmunofluorescencia
IHQ	inmunohistoquímica
IL	interleucina
IP3	inositol trifosfato
ITGB	integrina del grupo beta
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>
MAPKK/MEK	proteína quinasa quinasa activada por mitógeno
MLH	MutL proteína homóloga 1

---

MMP	metaloproteinasa de matriz
MMR	reparación de errores de coincidencia de ADN
MSH	MutS proteína homóloga 2
MSI	intestabilidad de microsátélites
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
N	nucleótido
NBT	nitroazul de tetrazolio
NDP	nucleótido difosfato
NGS	suero normal de cabra
NK	linfocito <i>natural killer</i>
NMP	nucleótido monofosfato
NMPc	nucleótido monofosfato cíclico
NPP	nucleótido pirofosfato fosfodiesterasa
NTP	nucleótido trifosfato
NTPDasa	nucleósido trifosfato difosfodiesterasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OS	supervivencia promedio
P/S	penicilina/estreptomicina
PARP	poli ADP ribosa polimerasa
PBS	tampón fosfato salino
PC-1	glicoproteína de membrana de células plasmáticas de tipo 1
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEA	feniletilamina
PFS	supervivencia libre de progresión
Pi	fosfato inorgánico
PIK3CA	subunidad catalítica alfa de fosfatidilinositol bisfosfato quinasa
PKC	proteína quinasa C
PLAP	fosfatas alcalina de tipo placentar
PLC	fosfolipasa C

POLE	polimerasa épsilon
POM	polioxometalato
PPADS	ácido piridoxalfosfatoazofenildisulfónico
PPi	pirofosfato inorgánico
PR	receptor de progesterona
ProMisE	clasificador de riesgo molecular proactivo para el cáncer de endometrio
PTEN	proteína fosfatasa y tensina homóloga
p-valor	valor de probabilidad
rpm	revoluciones por minuto
SC	carcinoma seroso
SCID	inmunodeficiencia combinada severa
SLC	<i>solute carrier</i>
SUSD2	<i>sushi domain containing 2</i>
TCGA	El Atlas del Genoma del Cáncer
TGF- $\beta$ 1	factor de crecimiento transformante beta 1
TNAP	fosfatas alcalina no específica de tejido
TPP	tiamina pirofosfato
Treg	linfocito T reguladora
UCEC	carcinoma de cuerpo uterino endometrial
UDP	difosfato de uridina
UTP	trifosfato de uridina
VNUT	transportador vesicular de nucleótidos
WB	western blot

# INTRODUCCIÓN





## 1. EL CÁNCER DE ENDOMETRIO

El cáncer de endometrio o carcinoma endometrial es la patología gineoncológica más común en Europa y Norte América y representa el cuarto tipo de cáncer más prevalente en los países occidentales. Actualmente, un 6 % de los diagnósticos y un 3 % de las muertes por cáncer se asocian al cáncer de endometrio. Se presenta mayormente en mujeres de más de 40 años, donde un 20 % de los casos totales ocurre en mujeres postmenopáusicas. La mayoría de los casos son de etiología esporádica, aunque un 5-10 % de los casos se asocia a formas hereditarias como el síndrome de Lynch (anteriormente conocido como cáncer colorectal no polipósico hereditario). Entre los factores de riesgo asociados a las formas esporádicas se encuentran la exposición a hormonas estrogénicas por síndrome de ovario poliquístico o tratamiento hormonal, la nuliparidad y el uso de tamoxifeno para el tratamiento del cáncer de mama (Kvåle et al. 1988; Neven and Vergote 1998a, b; Amant et al. 2005; Tafe et al. 2014).

El conocimiento patológico del cáncer de endometrio se remonta a la década de los 80, donde Bokhman describió inicialmente las dos entidades patogenéticas más comunes. En base a características histopatológicas se diferenció entre los carcinomas de tipo I o endometriode, con una moderada o alta diferenciación celular, invasión miometrial superficial y de buen pronóstico clínico y los carcinomas de tipo II o no-endometriode, con poca o nula diferenciación celular, profunda invasión miometrial, alta tasa de metástasis y de peor pronóstico (Bokhman 1983; Akhtar et al. 2019).

En las últimas décadas se ha profundizado en el estudio histopatológico y molecular de los tumores para establecer sistemas de clasificación más precisos, teniendo en cuenta características fenotípicas y genotípicas. A continuación, se detallan.

### 1.1 Clasificación del cáncer de endometrio

#### 1.1.1 Clasificación histopatológica

Inicialmente, los dos tipos descritos por Bokhman se agruparon en carcinomas de tipo endometriode (tipo I) y de tipo no-endometriode (tipo II) y, aunque esta clasificación es útil, no era suficiente debido a la elevada heterogeneidad que presenta el cáncer de

endometrio. La Organización Mundial de la Salud (OMS), describió un sistema de categorización histológica del cáncer de endometrio (*WHO System for Histologic Categorization of Endometrial Cancer*) con criterios para el diagnóstico histológico e inmunohistoquímico de 5 tipos de tumores de endometrio (Kurman et al. 2014; WHO Classification Of Tumours Editorial 2020). A continuación, se resumen los tipos histológicos, cuatro de los más frecuentes resumidos en la Figura I1.

Carcinoma endometriode (*EEC*, del inglés *endometrioid endometrial carcinoma*). Representa el 75-80 % de los casos diagnosticados. Se caracterizan por tener un patrón glandular o sólido en los grados más avanzados, siendo los más diferenciados a nivel histológico. Las células tumorales presentan una moderada actividad mitótica atípica además de bajo nivel de pleomorfismo nuclear. Suelen ser tumores sensibles a hormonas (estrógenos y progestágenos). Los *EEC* se subclasifican según el grado tumoral mediante el *International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging system* teniendo en cuenta principalmente la arquitectura tumoral y la atipia nuclear. Estos dos parámetros además tienen asociación con el pronóstico de la enfermedad. Se establecen tres tipos de *EEC*, detallados en la Tabla I1 (Shepherd 1989; Zaino et al. 1995; Parkash and Carcangiu 1997).

Grado	% patrón sólido	Atípia nuclear
EEC 1	< 5 %	+
EEC 2	6-50 %	++
EEC 3	> 50 %	+++

Tabla I1. Subclasificación *FIGO* de los carcinomas endometrioides de endometrio en base al grado tumoral. Se describen tres entidades, *EEC* de grado 1, *EEC* de grado 2 y *EEC* de grado 3 según la cantidad de patrón sólido tumoral (%) y la atipia nuclear. *FIGO*: *federation of International gynecology and obstetrics*, *EEC*: *endometrioid endometrial carcinoma*.

Carcinoma seroso (*SC*, del inglés *serous carcinoma*). Representa un 10 % de los casos diagnosticados. Histológicamente se caracterizan por tener un patrón papilar o glandular con frecuente presencia de pólipos endometriales. Las células tumorales presentan alto grado de atipia nuclear con bastantes figuras mitóticas, definiendo los

núcleos celulares como de alto grado. Las células presentan bordes serrados a diferencia de las que componen los carcinomas endometrioides que tienen un borde suave. No suelen responder a los estrógenos y a los progestágenos (Abeler and Kjørstad 1990; Soslow 2013).

Carcinoma de célula clara (CCC, del inglés *clear cell carcinoma*). Representa menos del 5 % de los casos diagnosticados. Histológicamente se presenta en patrones glandulares, papilares y difusos. Las células tumorales se caracterizan por ser morfológicamente columnares, cuboidales o poligonales con citoplasma eosinofílico y muy claro con núcleo marcado y moderadamente atípico. No tienen expresión de los receptores para estrógenos o progestágenos (Silverberg and De Giorgi 1973; Fadare et al. 2013).

Otras entidades, como el carcinosarcoma, el carcinoma dediferenciado y los carcinomas mixtos, presentan estructuras con predominio de componente endometriode de alto grado, adyacente a áreas sarcomatosas o de dediferenciación epitelial también consideradas de alto grado. Son tipos de cáncer de endometrio muy agresivos y de pronóstico desfavorable (Soslow 2013; Murali et al. 2019; Huvila et al. 2021).

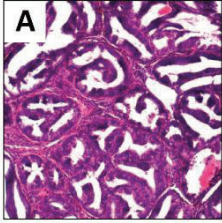
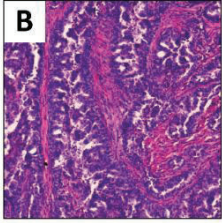
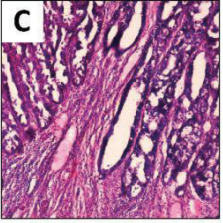
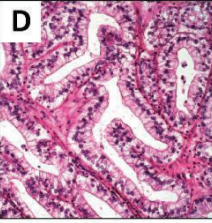
				
Tipo histológico	Endometriode	Endometriode	Seroso	Célula clara
Grado histológico	Bajo grado	Alto grado	Alto grado	Alto grado
Pronóstico	Favorable	Desfavorable	Desfavorable	Desfavorable
Marcadores IHQ				
ER/PR	+	+/-	+/-	-
P53 <sup>WT</sup>	+	+/-	-	+/-
P53 <sup>mut</sup>	+	+/-	+	+/-
PTEN	+/-	+/-	+	+

Figura 11. Clasificación histopatológica de los cuatro principales tipos histológicos de cáncer de endometrio. A Carcinoma endometriode de bajo grado con patrón glandular. B Carcinoma endometriode de alto grado con moderada desdiferenciación glandular. C Carcinoma seroso donde se observa el patrón papilar de las glándulas tumorales. D Carcinoma de célula clara, se observa una alta diferenciación celular no detectada en otros tipos de cáncer de endometrio. *IHQ*: *inmunohistoquímica*, *ER/PR*: *estrogen receptor/progesterone receptor*, *wt*: *wild type*, *mut*: *mutated*, *PTEN*: *phosphatase and tensin homolog protein*. Imágen adaptada de (Murali et al. 2014; WHO Classification Of Tumours Editorial 2020).

### 1.1.2 Clasificación molecular

Las técnicas de secuenciación masiva del genoma de pacientes han permitido la obtención de gran cantidad de marcadores moleculares e histológicos, que han sido útiles para determinar ciertas diferencias entre los tumores antes descritos en base a una serie de características genéticas y mutacionales. El diagnóstico molecular, por lo tanto, tiene como objetivos mejorar el diagnóstico patológico tradicional del cáncer de endometrio, aumentando la detección de lesiones pre-cancerosas y servir de guía para aplicar tratamientos según la tipología (lo que se conoce como medicina personalizada). El grupo de investigación del Atlas Genómico del Cáncer (*TCGA*, del inglés *The Cancer Genome Atlas*) desarrolló un análisis genómico en 373 cánceres de endometrio estableciendo una serie de alteraciones genéticas comunes en algunos tumores (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013). Además de presentar patrones mutacionales similares entre algunos tipos, el estudio de la supervivencia y de la progresión de la enfermedad en las pacientes, desarrollado en el estudio *ProMisE* (del inglés, *Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer*), también indica una

gran utilidad de la clasificación molecular en establecer parámetros clínico-patológicos aplicables tanto en el diagnóstico como en el desarrollo de terapias dirigidas y ensayos clínicos (Talhouk et al. 2015, 2017). Esta nueva clasificación agrupa los tumores de endometrio en 4 tipos moleculares según la presencia de mutaciones en la polimerasa épsilon (POLE), la carga mutacional de *TP53* y la presencia de inestabilidad de microsatélites (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013; Talhouk et al. 2015, 2017). A continuación, se describen las características principales de los 4 tipos moleculares de cáncer de endometrio.

**POLE ultramutados** (*POLE ultra-mutated*). Presenta mutaciones somáticas en el dominio exonucleasa de la ADN-polimerasa épsilon que resulta en alta tasa de mutación. La mayoría de los tumores corresponden a carcinomas endometrioides de alto y bajo grado, pero con buen pronóstico y baja tasa de recidivas. Representa un 4-12 % de los diagnósticos (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013; León-Castillo et al. 2020).

**Inestabilidad de microsatélites** (*microsatellite instability, MSI*). Presenta hipermutaciones en el sistema de reparación por apareamiento erróneo (*mismatch repair system, MMR*). La mayoría de los tumores corresponden a endometrioides de alto y bajo grado, pero, a diferencia de los POLE, son tumores con mal pronóstico y moderada recidiva. Representa un 23-36 % de los diagnósticos y un 2 % de los casos están relacionados con el Síndrome de Lynch. Presenta frecuentes mutaciones en los genes *PTEN* y *PIK3CA* (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013; Stelloo et al. 2017; McAlpine et al. 2018).

**Estabilidad de microsatélites o CNL** (número de copias baja – *microsatellite stable or copy number low CNL*). No presenta mutaciones en proteínas POLE, p53 ni *MMR*, pero presenta alta tasa de mutación en el gen *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina). La mayoría corresponden a tumores endometrioides, más de la mitad de bajo grado con alta expresión de receptores de estrógenos y progestágenos. Es un tipo de tumor con buen pronóstico. Representa un 30-60 % de los diagnósticos (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013; Huvila et al. 2021).

**p53 mutado o CNH** (número de copias alta – *p53 mutated or copy number high CNH*). Presenta alta tasa de copias de alteraciones somáticas en el gen *TP53*. Corresponde en su totalidad a tumores de tipo seroso y carcinomas mixtos y a estados avanzados de carcinomas endometrioides de grado 3. Presenta un mal pronóstico clínico con alta tasa de recidiva. Representa un 8-24 % de los diagnósticos (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013).

Existe una dificultad evidente a la hora de clasificar los tumores de alto grado (endometrioides de grado 3 principalmente), presentando una alta variabilidad interobservacional en el momento del diagnóstico histopatológico. Estudios recientes han demostrado la similitud clínico-patológica entre tumores endometrioides de alto grado y tumores no endometrioides (Liang and Zhang 2021). Esto provoca un solapamiento frecuente entre los tipos histológicos y el grado tumoral dificultando el diagnóstico e influyendo en la elección del tratamiento y, por ende, en la progresión clínica de la enfermedad (Gilks et al. 2013; Murali et al. 2014; Yen et al. 2020). En la Figura 12 se esquematiza la asociación existente entre la clasificación histológica y la molecular del cáncer de endometrio.

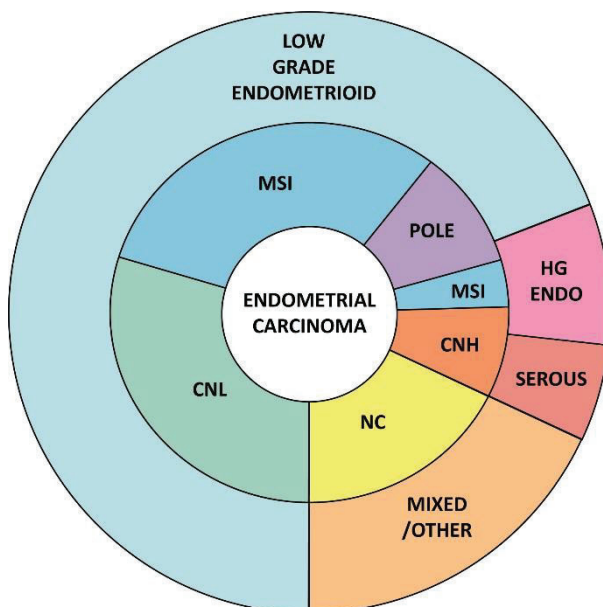


Figura 12. Asociación entre las clasificaciones histológica y molecular del cáncer de endometrio. El círculo exterior muestra los tipos histológicos de cáncer de endometrio: endometrioides de bajo grado (*low grade endometrioid*), endometrioides de alto grado (*HG endo*), seroso (*serous*) y mixtos (*mixed/other*). El círculo interior hace referencia a los tipos moleculares: POLE ultramutado (*POLE*), inestabilidad de microsatélites (*MSI*), y los grupos de bajo y alto número de copias (*CNL*, *CNH*). Se observa que hay un tipo de tumores que no comparten ninguna característica molecular y no son clasificables en ningún tipo (*NC*, *non-classified*). Adaptado de Yen TT et al 2020.

## 1.2 Heterogeneidad tumoral en el cáncer de endometrio

En base a lo mencionado anteriormente se pone de manifiesto el alto grado de heterogeneidad intertumoral que presenta el cáncer de endometrio tanto a nivel morfológico como genético con diferentes tipos histológicos y moleculares, respectivamente. A nivel genético se han caracterizado las mutaciones más frecuentes en los dos tipos principales de cáncer de endometrio: los endometrioides suelen presentar mutaciones en los genes *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1*, *ARID1A*, *K-RAS* y *FGFR2*, mientras que los tumores serosos y aproximadamente un 25 % de los endometrioides de alto grado, presentan mutaciones en los genes *TP53*, *PIK3CA*, *ARID1A* y *CHD4* (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013).

### 1.2.1 Patología molecular del cáncer de endometrio

Las alteraciones genéticas frecuentemente detectadas en cáncer corresponden a mutaciones de ganancia de función o sobreexpresión de oncogenes que estimulan la proliferación celular, y a mutaciones de pérdida de función, con o sin sobreexpresión de genes supresores tumorales que, en su forma no mutada, bloquean los mecanismos de proliferación celular (Vogelstein and Kinzler 2004). En el cáncer de endometrio existe una gran variedad de alteraciones genéticas principalmente en genes que codifican proteínas de superficie y de transducción de señales relacionadas con los mecanismos de carcinogénesis y progresión tumoral (Lax 2004).

Las mutaciones de ganancia de función en oncogenes, como *KRAS* (del inglés, *Kirsten rat sarcoma*), son frecuentes en un 10-30 % los cánceres de endometrio, y específicamente, en los de tipo endometriode. *KRAS* mutado actúa mediante activación de señales de proliferación y diferenciación celular por la vía de las MAPK y de la vía de PI3K/AKT (Caduff et al. 1995; Banno et al. 2014). Además, la existencia de mutaciones en *KRAS* detectada en lesiones premalignas como la hiperplasia endometrial incide en su función en mecanismos de iniciación tumoral (Sasaki et al. 1993).

HER-2/neu (del inglés, *human epidermal receptor 2*) es una proteína tirosina-kinasa altamente sobreexpresada en un 9-30 % de los carcinomas no-endometrioides (Berchuck et al. 1991). Su sobreactivación promueve la proliferación y la supervivencia tumorales



mediante la activación de las dos vías anteriormente mencionadas (Cully et al. 2006). Este mecanismo es compartido por la PIK3CA (del inglés, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*), observándose la vía PI3K/AKT frecuentemente alterada por mutaciones activadoras de PIK3CA en un 24-36 % de los cánceres. La alteración en PIK3CA se ha relacionado con el grado de agresividad tumoral en el cáncer de endometrio (Salvesen et al. 2009).

Otros genes de tirosina kinasas que promueven el crecimiento celular, como el *FGFR2* (del inglés, *fibroblast growth factor receptor 2*), también presenta mutaciones en un 12 % de los cánceres de endometrio. Además, se ha comprobado que el bloqueo selectivo de la actividad de este receptor inhibe el crecimiento celular in vitro (Dutt et al. 2008). Es evidente, pues, que la amplia variedad de alteraciones en diferentes proteínas kinasas en el cáncer de endometrio convierte a estas enzimas en potenciales dianas para el diseño de terapias antitumorales.

Mutaciones en el gen *CTNNB1* resultan en acumulación nuclear y citoplasmática de la proteína  $\beta$ -catenina, implicada en varios procesos de diferenciación celular, mantenimiento de la arquitectura tisular y migración y metástasis. Un 14-44 % de los cánceres de endometrio presenta alteraciones en  $\beta$ -catenina con una presencia homogénea en diferentes áreas del tumor, indicando un rol en etapas iniciales de la tumorigénesis. De hecho, se encuentran formas mutadas en hiperplasias endometriales atípicas, consideradas lesiones premalignas de los carcinomas endometrioides (Moreno-Bueno et al. 2002; Llobet et al. 2009).

Las mutaciones en genes supresores tumorales son frecuentes en el cáncer de endometrio. Uno de los más estudiados es *PTEN* (del inglés, *phosphatase and tensin homolog*), con mutaciones somáticas y hipermetilación del promotor en un 25-83 % de tumores, principalmente en endometrioides en un 37-61 % de ellos (Llobet et al. 2009); también se han identificado en casos de hiperplasia endometrial (Maxwell et al. 1998). La inactivación de *PTEN* promueve la proliferación y se relaciona con procesos de supervivencia y migración celulares (Tamura et al. 1998; Cully et al. 2006).

Los fenotipos de inestabilidad de microsatélites hacen referencia a los tumores con mutaciones en los genes del sistema *MMR* como *MLH-1*, *MSH-2*, *MSH-6* o *PMS2*,

observadas en un 25-30 % de casos de cáncer de endometrio (Risinger et al. 1993; Caduff et al. 1996). La inactivación por hipermetilación de *MLH-1* y la consecuente adquisición de alta tasa mutacional se ha detectado también en hiperplasia endometrial. Por lo tanto, las alteraciones en PTEN y MLH-1 son descritas como eventos tempranos en el desarrollo tumoral del cáncer de endometrio, ya que son detectables en lesiones premalignas (Esteller et al. 1999; Llobet et al. 2009).

p53 es una proteína que induce apoptosis o arresto del ciclo celular en respuesta a ADN dañado. La alteración de la función de p53 produce carga mutacional elevada y la inhibición de la apoptosis, aumentando la supervivencia celular (Vogelstein and Kinzler 1992). Las mutaciones en p53 son frecuentes en muchos tipos de cáncer y en el cáncer de endometrio de tipo seroso se observan en torno al 90 % de los casos. Además, existe una correlación entre *TP53* mutado y expresión positiva de p53 por inmunohistoquímica (Ambros et al. 1995a; Feng et al. 2005). También se observan en lesiones consideradas precursoras de los carcinomas uterinos serosos, como el carcinoma intraepitelial in situ (Ambros et al. 1995b; Hou et al. 2014). En cambio, resulta infrecuente observar mutaciones o sobreexpresión de p53 en tumores endometrioides de bajo grado y en casos de hiperplasia atípica (Sherman et al. 1995; Tashiro et al. 1997). Se ha detectado la expresión inmunohistoquímica de p53 en zonas de endometrio no tumoral adyacentes al carcinoma seroso, pero no en el caso del carcinoma endometrioide (Zhang et al. 2009). Por ello p53 se ha propuesto como un evento temprano en el desarrollo de tumores de tipo seroso y como un evento tardío en la progresión tumoral de los tipos endometrioides (Lax et al. 2000; Zheng et al. 2011).

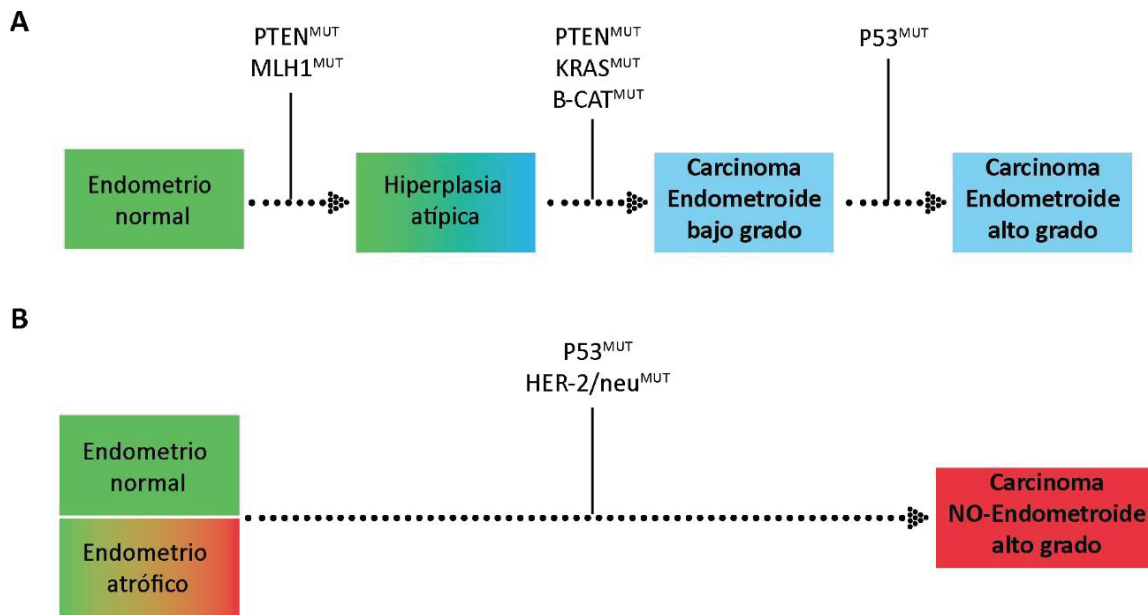


Figura I3. Mutaciones genéticas frecuentemente observadas en la carcinogénesis del cáncer de endometrio de tipo endometriode (A) y no-endometriode (B). Las mutaciones en PTEN o en proteínas del sistema de reparación por apareamiento erróneo como MLH1 son frecuentes en las lesiones premalignas del endometrio, en cambio, mutaciones en KRAS o p53 se observan más bien en los procesos de malignidad y progresión tumoral del carcinoma endometriode. Los carcinomas no endometrioides, incluyendo el seroso como más representativo, presentan elevadas mutaciones en p53 y HER-2/neu implicadas en la carcinogénesis. Adaptado de Banno et al. 2014.

Las diferentes mutaciones que pueden presentarse, por ejemplo, en los casos con p53 mutado detectado por tinción inmunohistoquímica, también se pueden acompañar de heterogeneidad intratumoral, es decir, es posible encontrar diferentes patrones de expresión para una proteína en un mismo tumor. Es posible identificar clones con patrones citológicos (células columnares, mucinosas o escamosas), histológicos (patrón glandular, papilar o sólido) o genéticos (lo que se conoce como *cell clones*) diversos en un mismo tumor (Matias-Guiu and Prat 2013; Gatus et al. 2018). En el caso de p53 se hace evidente en el estudio de los carcinomas endometrioides de alto grado con *TP53* mutado y expresión de p53, mayormente en zonas altamente desdiferenciadas y con elevada expresión del marcador de proliferación Ki-67. Como diferencia, este fenómeno no se observa en tumores endometrioides de bajo grado. Por ello, como ya se ha mencionado, mutaciones con alta expresión de p53 se asocian a la adquisición de fenotipos malignos en los carcinomas endometrioides (Feng et al. 2005). Además, se sabe que las células tumorales del frente mio-invasivo tienen una expresión de proteínas de transición epitelio-mesénquima (*EMT*) distinta a la de las células de la

---

superficie del tumor, favoreciendo patrones migratorios en algunos grupos celulares (Montserrat et al. 2012; Gatus et al. 2018).

Si existe heterogeneidad tanto inter como intratumoral, los mecanismos de crecimiento y progresión tumoral también pueden ser muy diversos en el contexto del cáncer de endometrio. En la Figura I3 se recogen las mutaciones más frecuentes en las distintas etapas de la carcinogénesis y progresión del cáncer de endometrio. Conocer las principales vías moleculares alteradas que determinan heterogeneidad espaciotemporal e intertumoral y su estudio de clinicopatológico, puede derivar en la elección y diseño de tratamientos más personalizados para tratar de evitar resistencias y efectos secundarios y mejorar, así, el pronóstico de la enfermedad (Yin et al. 2019). La presente tesis doctoral pretende estudiar si la vía purinérgica/adenosinérgica presenta alteraciones en los tumores de endometrio y si es posible valorarla como diana de estudio para el diagnóstico o el desarrollo de nuevas terapias para el cáncer de endometrio.

### 1.3 Tratamiento del cáncer de endometrio

La supervivencia asociada a los tumores en estados iniciales con tratamiento quirúrgico es elevada, en torno al 95 %, en cambio, los tumores más avanzados presentan una supervivencia a los 5 años que oscila entre un 15 y un 17 %. Además, un 4 % de los casos esporádicos se da en mujeres menores de 40 años que quieren preservar la fertilidad (Lee et al. 2007). En 2016 y en 2020 se publicaron unas guías para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del cáncer de endometrio elaborada por patólogos, oncólogos y ginecólogos expertos en el tema, la *ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer Diagnosis, Treatment and Follow-up*, y la *ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma*, respectivamente. En la guía se hace referencia a todos los factores asociados y a tener en cuenta para una correcta gestión del cáncer de endometrio, que se pueden englobar en cuatro puntos clave: la prevención y el diagnóstico, el tratamiento quirúrgico, el tratamiento adyuvante y la presencia de enfermedad avanzada o recurrente. También se categoriza el riesgo de invasión linfocelular y

pélvica con implicaciones directas en la selección del tratamiento adyuvante más conveniente (Colombo et al. 2016; Concin et al. 2021).

La estadificación tumoral (*staging*) es uno de los parámetros principales en la elección del tratamiento. Este sistema clasifica el cáncer según la extensión del tumor (T), la infiltración hacia los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M), aunque también hace alusión al estadiaje patológico determinado por biopsias pre o post tratamiento quirúrgico (Freeman et al. 2012). Los diferentes estadios del cáncer de endometrio se resumen en:

Estadio I, T1, N0, M0. El tumor se confina en el útero, con extensión o no de las glándulas cervicales, pero sin extensión al tejido conectivo adyacente.

Estadio IA, T1a, N0, M0. El tumor se confina al endometrio, con extensión <50 % del miometrio.

Estadio IB, T1b, N0, M0. El tumor se confina al endometrio, con extensión >50 % del miometrio.

Estadio II, T2, N0, M0. El tumor se extiende más allá del cuerpo del útero, principalmente al estroma cervical, pero sin extensión en otros órganos extra-uterinos.

Estadio III, T3, N0, M0. El tumor se extiende a localizaciones extrauterinas, pero sin llegar al recto o la vejiga urinaria.

Estadio IIIA, T3a, N0, M0. El tumor se extiende hacia la superficie externa uterina (serosa) y hacia la trompa uterina u ovarios.

Estadio IIIB, T3b, N0, M0. El tumor se extiende hacia la vagina y a los tejidos que rodean el útero (parametrio).

Estadio IIIC, Tn, N1/N2, M0. El tumor ha adoptado cualquier extensión y ha invadido los ganglios linfáticos pélvicos (N1) o los ganglios linfáticos para-aórticos (N2).

Estadio IVA, Tn, Nn, M0. El tumor ha adoptado cualquier extensión con invasión linfovascular con extensión en el recto o la vejiga.

Estadio IVB, Tn, Nn, M1. El tumor se metastatiza hacia los ganglios linfáticos inguinales, el omento u otros órganos distantes como el pulmón, el hígado o los huesos.

### *Tratamiento quirúrgico*

El tratamiento quirúrgico representa la primera aproximación terapéutica en la mayoría de los casos. El principal procedimiento es la retirada del útero y el cérvix mediante

histerectomía simple o total, abdominal o vaginal. Cuando hay afectación del parametrio, se procede a una histerectomía radical donde se retira el útero, el parametrio, el ligamento uterosacral y la parte superior de la vagina. A veces, la histerectomía se realiza juntamente con una salpingo-ooforectomía bilateral, que implica la retirada de las trompas uterinas y los ovarios, normalmente en pacientes postmenopáusicas. En las pacientes con tumores de estadio I menores de 45 se recomienda valorar la salpingo-ooforectomía para preservar la fertilidad. Estos dos procedimientos han avanzado en cuanto a su abordaje, y ambos se han adaptado a la realización mediante laparoscopia, o cirugía mínimamente invasiva, robótica, asociada una menor duración de la cirugía, menor dolor y sangrado y mejor recuperación.

También se abordan otros aspectos necesarios para el estadiaje del tumor, y en muchas ocasiones, se realiza una disección de los ganglios linfáticos pélvicos y para-aórticos para comprobar la invasión de células tumorales hacia esas localizaciones o simplemente para la retirada de estos. Esta opción se realiza normalmente cuando hay evidencia mediante diagnóstico por imagen de invasión linfática. Si no hay evidencias, se realiza un mapeo del ganglio linfático centinela juntamente con histerectomías en estadios iniciales y consiste en la adición de verde de indocianina en la zona para-tumoral. El colorante migrará a los ganglios linfáticos pélvicos si hay conexión tumoro-linfática. En los casos negativos no se procede a la disección nodular. Estudios recientes demuestran la mayor precisión del mapeo linfático en el diagnóstico de metástasis frente a la linfadenectomía en el estadiaje tumoral. Otros procedimientos que se realizan en las histerectomías son lavados peritoneales con salino para posterior análisis de células tumorales, omentectomías para la retirada del tejido graso abdominal infiltrado y procedimientos de citorreducción tumoral, en los casos que el tumor haya invadido el abdomen (Rodriguez et al. 2013; Rossi et al. 2017; Angeles et al. 2018; Tanaka et al. 2018; Casarin et al. 2018).

#### *Tratamiento adyuvante con radioterapia y quimioterapia*

Los cánceres de endometrio de estadio I son tratados en su gran mayoría con cirugía. En estadios II, III y IV, considerados de riesgo medio-alto, es necesario un tratamiento denominado adyuvante basado en procedimientos de radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia que, después de la cirugía, intervienen en la

eliminación de las células tumorales y la consiguiente citoreducción del tumor (Colombo et al. 2016; van den Heerik et al. 2021). La braquiterapia vaginal resulta una buena opción para las pacientes con histerectomía con retirada de la parte superior del cérvix, ya que se introduce el material radioactivo locoregionalmente. Se diferencian dos procedimientos, con dosis bajas de radiación (*LDR*, del inglés *low dose radiation brachytherapy*) y con dosis altas de radiación (*HDR*, del inglés *high dose radiation brachytherapy*). Ésta última presenta ventajas al disminuir el tiempo de estancia hospitalaria ya que se puede administrar semanalmente. La radioterapia con rayo externo convencional (en inglés *external beam radiotherapy*) en cambio se adopta en pacientes con extensión tumoral pélvica. El uso de radioterapia pélvica se restringe a aquellas pacientes con alto riesgo de recurrencia locoregional para garantizar al máximo el riesgo de toxicidad asociada a radioterapia (Creutzberg and Nout 2011; Ngu et al. 2021). La quimioterapia basada en platinos y taxoles incrementa la supervivencia de las pacientes post-histerectomía. Estos fármacos antineoplásicos actúan como agentes alquilantes (platinos y antraciclinas) o como desestabilizadores de los microtúbulos (taxoles) (Jordan and Wilson 2004; Wang and Lippard 2005). En los tumores en estados iniciales, pero de histología avanzada, como los serosos o los carcinosarcomas, se utilizan fármacos antineoplásicos como el carboplatino y el paclitaxel en monoterapia. En los de estadio II y III se suelen realizar combinaciones de fármacos, normalmente se administran dosis de carboplatino+paclitaxel o cisplatino+doxorubicina. En los tumores más avanzados y de muy alto riesgo, el número de fármacos se amplía, pudiéndose hacer terapia combinada añadiendo la ifosfamida a los fármacos anteriores. En estos casos, se recomienda valorar el uso de terapias dirigidas o inmunoterapias (Humber et al. 2007).

#### *Tratamiento adyuvante con terapia dirigida*

El conocimiento de las alteraciones moleculares tiene como uno de sus objetivos el desarrollo de terapias dirigidas contra vías celulares alteradas en el cáncer de endometrio. Estas terapias se basan en un bloqueo selectivo de la función de algunas proteínas esenciales para el desarrollo del tumor, actuando a nivel de la célula tumoral. En los últimos años se han estudiado diversas terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer de endometrio, siendo las principales dianas las vías de señalización relacionadas

con la integridad del ADN, la proliferación y la invasión celulares (Yen et al. 2020). Deben explorarse nuevas dianas, ya que las pacientes con cáncer metastásico o recurrente con tratamiento de primera línea fallido tienen pocas alternativas terapéuticas, siendo la quimioterapia un tratamiento limitado en eficacia (MacKay et al. 2020).

Las terapias más desarrolladas se basan en la inhibición de la vía PIK3/AKT/mTOR, mayormente en pacientes con inactivación de PTEN o con mutación en *PIK3CA* o *KRAS* (Barra et al. 2019). Las moléculas más prometedoras son los inhibidores de mTOR, como el temsirolimus, con eficacia parcial (Oza et al. 2011), aunque en combinación con inhibidores de aromatasas la tasa de respuesta aumenta (Slomovitz et al. 2015). El bevacizumab, un agente antiangiogénico, ha demostrado eficacia en tratamiento dual con inhibidores de mTOR (Alvarez et al. 2013). Algunos inhibidores de AKT han sido testados con relativa eficacia, como por ejemplo MK2206 (Myers 2013). La gran mayoría de las terapias dirigidas se encuentran en investigación preclínica, en modelos celulares. Los inhibidores de PARP han demostrado sensibilidad terapéutica en líneas de cáncer de endometrio con inactivación en PTEN (Dedes et al. 2010). La combinación de inhibidores de PI3K y MAPKK/MEK han sido testados en células con mutaciones en *PTEN* y *KRAS* con resultados prometedores (Shoji et al. 2012). En células tumorales con amplificaciones de *HER-2/neu* y mutaciones en *PIK3CA*, principalmente relacionado con los carcinomas serosos, los inhibidores duales de mTOR junto con inhibidores de PI3K han demostrado eficacia in vitro e in vivo (English et al. 2013; Lopez et al. 2014).

Un conocimiento más profundo, celular y molecular de los diferentes fenotipos de las células tumorales endometriales ha de permitir precisar las vías que presentan alteraciones y que, por tanto, serán más susceptibles de terapias. En este sentido, la señalización purinérgica, la vía de generación de adenosina, o vía adenosinérgica, ha demostrado tener un papel relevante en el cáncer, que será revisado más adelante en esta memoria. Sin embargo, la falta de estudios sobre los mecanismos de la señalización purinérgica en el cáncer de endometrio, pone de manifiesto la necesidad de nuevos estudios como la presente tesis doctoral.



## 2. LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA

El trifosfato de adenosina (ATP), es una molécula de vital importancia puesto que es la fuente primaria de energía y participa en procesos enzimáticos que mantienen la homeostasis y el correcto funcionamiento de las células. Dentro de las células, juega, por tanto, un papel esencial. La primera evidencia del ATP extracelular como molécula con actividad señalizadora se describió en el sistema nervioso en la década de los 50 (Holton and Holton 1954). No fue hasta 1972, cuando el profesor Geoffrey Burnstock lo describió como un neurotransmisor en “nervios purinérgicos”, con capacidad de secreción de ATP (Burnstock 1972). Además, en 1978 se hizo una primera descripción de dos posibles receptores que actuarían mediante acoplamiento del ATP extracelular, los receptores de tipo P2, y los de tipo P1, sensibles al producto de hidrólisis del ATP, la adenosina. A partir de los 90, se han venido realizando numerosos estudios sobre la función del ATP extracelular no solo en el sistema nervioso, sino en una gran diversidad de sistemas, tejidos y tipos celulares, estableciendo las bases de lo que se conoce como señalización purinérgica (Khakh and Burnstock 2009).

Ésta se define como a la señalización mediada por ATP (y otros nucleótidos) y su principal producto de hidrólisis, la adenosina, mediante su unión a receptores P2 y P1 respectivamente, que participa en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Algunos de ellos son la contracción muscular, la nocicepción del dolor, la angiogénesis, la trombosis o la regulación del sistema inmunitario en respuestas inmediatas, aunque también tiene efectos en respuestas tardías, como en la proliferación y la diferenciación celulares, la migración y en algunas enfermedades inflamatorias y neoplásicas (Burnstock and Verkhratsky 2010; Burnstock 2016). Los niveles de nucleótidos y nucleósidos están regulados por transportadores de membrana y también por ectoenzimas con capacidad de hidrolizar ATP (y ADP y AMP) hasta adenosina (Pastor-Anglada et al. 2005; Burnstock 2006; Yegutkin 2014; Pastor-Anglada and Pérez-Torrás 2018).

## 2.1. Receptores de nucleótidos y nucleósidos

Las fuentes de ATP extracelular son diversas aunque en un inicio se atribuyó a la secreción mediante exocitosis de gránulos de neuronas, células de la médula adrenal y plaquetas (Gordon 1986). Actualmente se sabe que la presencia de ATP en el espacio extracelular se debe a dos mecanismos. (i) Uno, fisiológico, por procesos de liberación no líticos y regulados por exocitosis vesicular dependiente de calcio mediante el transportador vesicular de nucleótidos (*VNUT* del inglés *vesicular nucleotide transporter*) (Praetorius and Leipziger 2009; Lazarowski 2012), y por canales conductores de ATP como las panexinas y las conexinas. Estos dos tipos de proteínas de membrana forman canales con selectividad para iones y pequeñas moléculas, especialmente el ATP. El elevado gradiente de concentración de nucleótidos entre el interior y el exterior celulares, junto a la capacidad de cruzar las uniones de tipo gap (Goldberg et al. 1999), hace que el ATP tienda a salir de la célula en condiciones fisiológicas mediante la activación de panexinas y conexinas (Lohman and Isakson 2014). (ii) Otro, por efecto de alteraciones de la membrana, muerte y lisis celular por desregulación osmótica, deprivación de nutrientes o daño tisular. Estos fenómenos constituyen uno de los procesos más importantes de acumulación de ATP extracelular en situaciones patológicas (Grygorczyk et al. 2021).

Una vez en el espacio extracelular, los nucleótidos y nucleósidos determinan diferentes posibles respuestas dependiendo del receptor activado. Los receptores de tipo P2X son ionotrópicos, canales iónicos activados por ligando. Se activan exclusivamente por el ATP mediante la salida de potasio y la entrada de sodio y calcio en la célula en respuestas moderadamente rápidas de milisegundos. Se han descrito 7 tipos ( $P2X_{1-7}$ ) compuestos por multisubunidades heteroméricas que forman un poro selectivo con dos dominios transmembrana hidrofóbicos (Ralevic and Burnstock 1998). Los receptores P2X producen respuestas regulando el tono vascular, los procesos trombóticos, la inflamación y participan activamente en los mecanismos de respuesta al dolor, entre otros (Schmid and Evans 2019).

Los receptores de tipo P2Y son metabotrópicos acoplados a proteínas G y, por lo tanto, activan segundos mensajeros para la generación de una respuesta celular. Los receptores  $P2Y_{1,2,4,6}$  se asocian a proteínas Gq, que activan la fosfolipasa C (PLC)

umentando la concentración de calcio y diacilglicerol (DAG) con activación de la proteína quinasa C (PKC). En cambio, los receptores P2Y<sub>12,13,14</sub> se acoplan a proteínas Gi con directa inhibición de la adenilil ciclasa (AC) y disminución de los niveles de AMP cíclico (AMPC). El receptor P2Y<sub>11</sub> se acopla únicamente a proteínas Gs produciendo aumento de AC y niveles de AMPC. Además del tipo de proteína G acoplada, los receptores P2Y difieren farmacológicamente entre ellos por su afinidad a varios nucleótidos. Se agrupan en: (i) receptores que tienen afinidad por nucleótidos de adenina, como el ATP (P2Y<sub>1,2,4,11</sub>) y el ADP (P2Y<sub>1,12,13</sub>); (ii) receptores que tienen afinidad por los nucleótidos de uridina, como el UTP (P2Y<sub>1,4,6</sub>) y el UDP (P2Y<sub>6,14</sub>); y, (iii) receptores que tienen afinidad a nucleótidos de uridina acoplados a monosacáridos como la UDP-glucosa o la UDP-galactosa (P2Y<sub>14</sub>) (Ralevic and Burnstock 1998; von Kügelgen 2006). A parte de funcionar perfectamente como monómeros, se conoce la interacción entre alguno de los receptores, como por ejemplo entre P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> en las plaquetas (Anderson et al. 2020). La activación de los receptores P2Y interviene en la agregación plaquetaria, la vasodilatación, la diferenciación celular, el control del flujo iónico en epitelios y en la transmisión del dolor (von Kügelgen 2006).

El nucleósido extracelular por excelencia, la adenosina, ejerce una potente señalización mediante la unión a los receptores P1, metabotrópicos, acoplados a proteínas G. Se clasifican en cuatro tipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. La activación de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> y la proteína G<sub>i/o</sub> produce la inhibición de AC, disminuyendo los niveles del AMPC; en cambio, los receptores A<sub>2</sub> y la proteína G<sub>s</sub> activan AC y, por lo tanto, aumentan los niveles de AMPC. Los receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> también activan a la PLC, aumentando el inositol trifosfato (IP3) y el DAG promoviendo la movilización de calcio intracelular y activación de PKC. En algunas localizaciones el receptor A<sub>1</sub> actúa sobre canales de potasio y el receptor A<sub>2A</sub>, sobre canales de calcio tipo P. Las diferencias existentes entre los receptores A<sub>2</sub> residen en la afinidad en sus regiones de unión, el receptor A<sub>2A</sub> con una alta afinidad y el receptor A<sub>2B</sub> con baja afinidad (Bruns et al. 1986; Guo et al. 2021). En la Figura I4 se representan a modo de esquema algunos de los elementos relacionados con la señalización extracelular por ATP y adenosina.

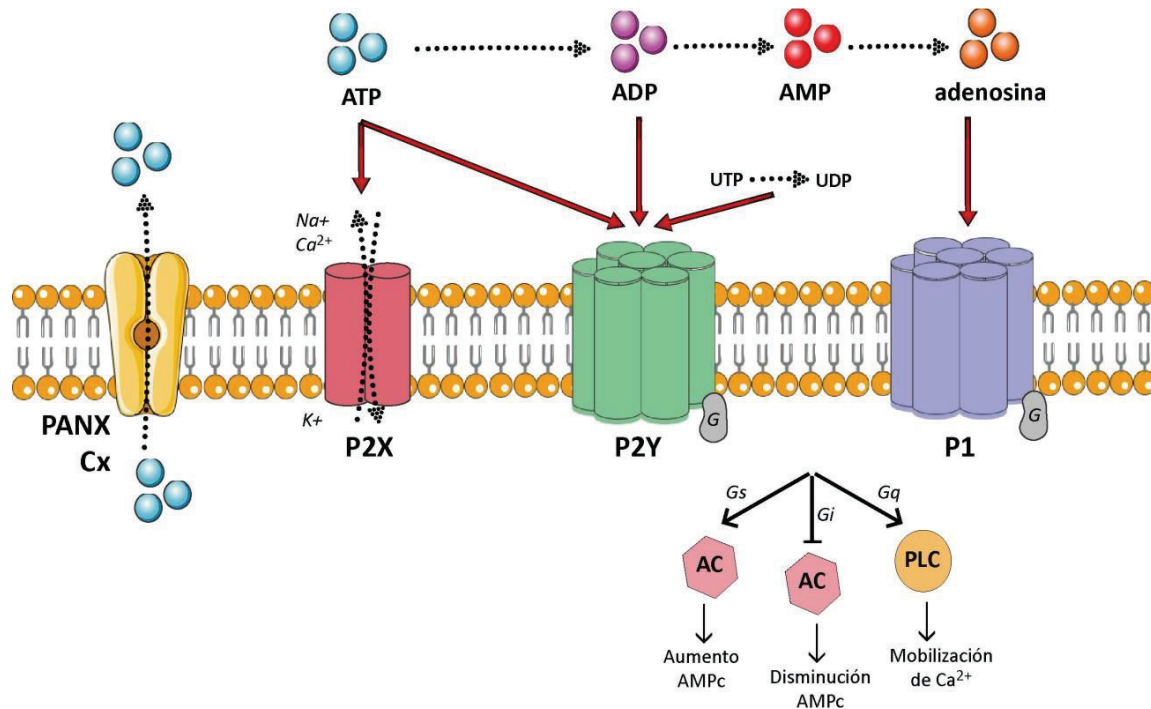


Figura 14. Representación de los receptores implicados en la señalización celular mediada por nucleótidos y nucleósidos extracelulares y su actividad biológica. Abreviaturas: PANX: panexinas; Cx: conexinas; AC: adenilil ciclasa; PLC: fosfolipasa C; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; G: proteína G. Fuente: elaboración propia. Se ha usado el software Adobe Illustrator (Adobe Inc., 2019. *Adobe Illustrator*, disponible en: <https://adobe.com/products/illustrator>).

Una vez los nucleótidos y nucleósidos realizan su función señalizadora, estos deben ser retirados del espacio extracelular rápidamente. Este proceso resulta en un complejo sistema de transportadores y enzimas tanto intra como extracelulares que proporcionan unos niveles estables de nucleótidos y nucleósidos, manteniendo la homeostasis extracelular. En los siguientes apartados se hace un recopilatorio de los principales elementos implicados en este proceso.

## 2.2 Regulación de los niveles de ATP y adenosina extracelular: las ectonucleotidasas

El control del equilibrio extracelular entre los nucleótidos y los nucleósidos resulta esencial en el mantenimiento de respuestas fisiológicas relacionadas con la señalización purinérgica. Por lo tanto, los niveles extracelulares de ATP, ADP, AMP y adenosina, sufrirán variaciones dependiendo de las necesidades celulares. Alteraciones en estos sistemas de regulación provocarán situaciones patológicas, algunas relacionadas con procesos inflamatorios y de inmunosupresión, entre otras.

Las ectonucleotidasas realizan su acción hidrolítica extracelularmente como proteínas de membrana o como proteínas solubles. Se hallan ampliamente expresadas y son activas en la mayoría de los tejidos y tipos celulares estudiados. Se conocen 4 familias de ectonucleotidasas compuestas por varios miembros que difieren en especificidad de sustrato y estructura. Su expresión es heterogénea en el organismo, es decir, dependiendo del tipo celular se expresará un subtipo u otro de ectonucleotidasa y, además, en diferentes combinaciones. Su función principal es la hidrólisis secuencial del ATP y sus derivados (ADP, AMP), con formación final de adenosina. También se han descrito enzimas intracelulares de estas familias (Yegutkin 2014).

La familia de las ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (ENTPDasas) o familia de CD39, representan a un grupo de ectoenzimas con 8 miembros, siendo 4 los localizados en la superficie celular: NTPDasa 1 (CD39), NTPDasa2 (CD39L1), NTPDasa3 (CD39L3) y NTPDasa8 que hidrolizan el ATP extracelular a ADP, y el ADP a AMP. También tienen la capacidad de hidrolizar nucleótidos de uridina tri- y difosfato (UTP y UDP). Las ectonucleótido pirofosfatasas/fosfodiesterasas (ENPPs, del inglés *ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases*) hidrolizan mayormente ATP a AMP, liberando pirofosfato inorgánico, con 3 miembros de membrana NPP1, NPP2 y NPP3. Finalmente, la familia de las 5'-nucleotidasas, con un único miembro anclado en la membrana, la ecto-5'-nucleotidasa, más conocida como CD73, que realiza la etapa final de hidrólisis de los nucleótidos monofosfato hasta adenosina. Esta enzima, por lo tanto, es la limitante en la generación y acumulación de adenosina extracelular. La familia de las fosfatasas alcalinas (APs, del inglés *alkaline phosphatases*), son un grupo con varios miembros muy heterogéneos en cuanto a expresión y muy versátiles en cuanto a especificidad de sustrato. Dos de las más estudiadas son la forma placentaria PLAP (del inglés *placental-like alkaline phosphatase*) y la forma no específica de tejido TNAP (del inglés *tissue-nonspecific alkaline phosphatase*); hidrolizan nucleótidos tri-, di- y monofosfato de adenina con liberación de fosfato inorgánico (Yegutkin 2008, 2014). En la Figura 15 se representan las 4 familias de ectonucleotidasas, indicando el nombre de sus miembros de membrana y sus actividades hidrolíticas.

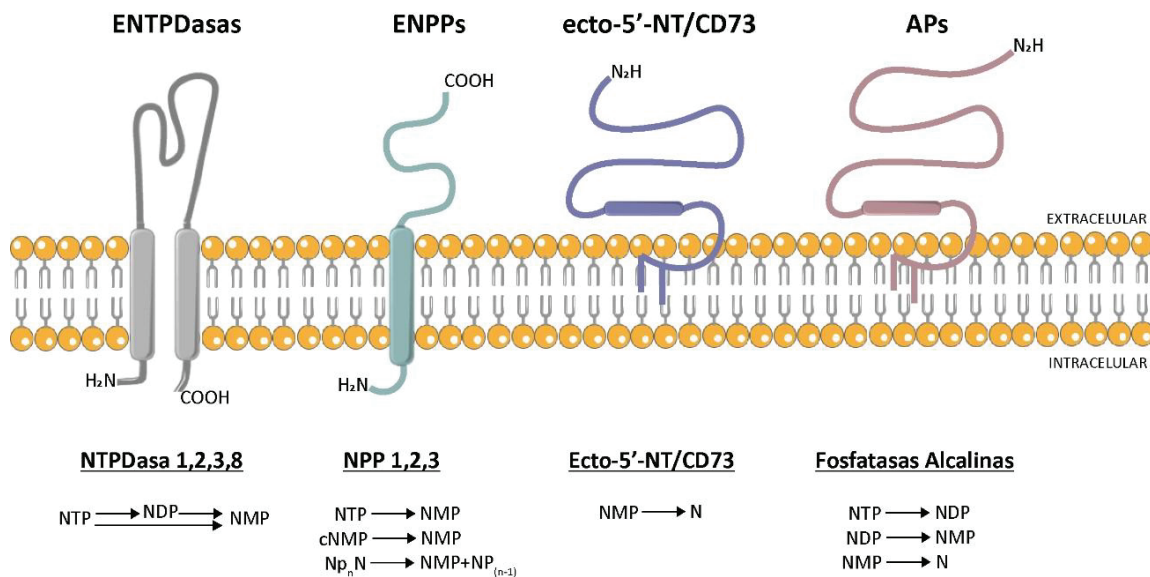


Figura 15. Representación de las diferentes familias de ectonucleotidasas y sus miembros presentes en la membrana celular. Imagen adaptada de Martín-Satué M et al., 2019. Abreviaturas: NTP: nucleótido trifosfato; NDP: nucleótido difosfato; NMP: nucleótido monofosfato; cNMP: nucleótido monofosfato cíclico; N: nucleósido. Fuente: elaboración propia. Se ha usado el software Adobe Illustrator (Adobe Inc., 2019. *Adobe Illustrator*, disponible en: <https://adobe.com/products/illustrator>).

El control final de la generación de adenosina a partir de ATP lo ejercen las enzimas CD73 y las fosfatasas alcalinas. Sin embargo, el nivel de nucleósidos extracelulares también se controla mediante transportadores, los llamados transportadores concentrativos, CNT, (del inglés *concentrative nucleoside transporters*) y equilibrativos, ENT, (del inglés *equilibrative nucleoside transporters*), también conocidos como SLC28 y SLC29 (del inglés *solute carrier*), respectivamente. Los CNT participan en la captación unidireccional de nucleósidos hacia el interior celular mediante difusión dependiente de sodio, en cambio, los transportadores ENT, captan o expulsan los nucleósidos por difusión facilitada en función del gradiente (Farré et al. 2004; Pastor-Anglada et al. 2005). La inactivación de la adenosina ectoenzimática además es posible gracias a la acción de la adenosina desaminasa (ADA). ADA es una enzima intracelular con capacidad de transformar la adenosina en inosina, pero, en asociación con la proteína de membrana dipeptidil/peptidasa IV (CD26), o en su forma soluble, también actúa extracelularmente (Yegutkin 2008). Otro de los mecanismos que utiliza ADA para formar inosina es por acoplamiento a receptores de adenosina, normalmente A<sub>1</sub> o A<sub>2B</sub> (Pacheco et al. 2005).

Una de las características que hace de interés el estudio de estas enzimas de membrana es la posibilidad de detección de la actividad enzimática asociada usando técnicas colorimétricas y técnicas histoquímicas y citoquímicas in situ (Yegutkin 2014). La técnica colorimétrica más utilizada consiste en la determinación del fosfato inorgánico generado en la reacción de hidrólisis de nucleótidos como el ATP por parte de células en cultivo, homogenados celulares o de tejidos, o ectoenzimas purificadas. Para estos experimentos se utiliza el colorante verde de malaquita que reacciona con el fosfato inorgánico pudiendo realizarse mediciones colorimétricas que varían en función de la cantidad de fosfato (Lanzetta et al. 1979).

Además, la actividad enzimática también se puede poner de manifiesto en células y en cortes histológicos de tejido, siendo muy útil para definir los tipos celulares que llevan a cabo la hidrólisis de nucleótidos en un determinado tejido. La distribución de la actividad de las ectonucleotidasas puede caracterizarse mediante la incubación de secciones de tejido congeladas (histoquímica) o células fijadas (citoquímica) con nitrato de plomo [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ] y diferentes sustratos de las ectonucleotidasas. El ATP, ADP y otros NTP y NDP se añaden para medir las reacciones derivadas de las NTPDasas. El AMP se añade para la evaluación de la actividad de ecto-5'-NT/CD73. Otros sustratos sintéticos, como el nitroazul tetrazolio (NBT, del inglés *nitroblue tetrazolium*) y el fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP, del inglés *bromo-chloro-indolyl phosphate*) se utilizan para determinar la actividad de las fosfatasas alcalinas. En la actividad de las NPPs el sustrato que se usa es la tiamina pirofosfato (TPP, del inglés, *thiamine pyrophosphate*). El fosfato liberado en la hidrólisis precipita como fosfato de plomo (PbP) en las localizaciones donde ha habido hidrólisis de ATP. La posterior incubación con sulfuro de amonio [ $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ ], da lugar a sulfuro de plomo (PbS), de color marrón, visible con el microscopio óptico. Esta técnica se desarrolló en los años 50 por Wachstein y Meisel para caracterizar histoquímicamente las fosfatas hepáticas (Wachstein and Meisel 1957). De los estudios derivados, se estableció al método como tinción de Wachstein-Meisel o técnica del fosfato libre.

Además, estas técnicas permiten la caracterización de inhibidores de las actividades ectonucleotidasas. Uno de los más estudiados es un potente inhibidor de la actividad AMPásica de CD73, el alfa-beta ADP-metileno ( $\alpha\beta\text{meADP}$ , del inglés *alpha,beta-*

*methylene-ADP*), estudiado como un posible agente terapéutico al inhibir la generación de adenosina extracelular en el cáncer (Bhattarai et al. 2015), fenómeno que se revisará más adelante. Los análogos del ATP y otros compuestos no derivados de éste, como la suramina, o los polioxometalatos (POM) y el PPADS (del inglés, *pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid*), también inhibidor de algunos receptores P2X, se usan como inhibidores de NTPDasas, con un poder selectivo variable entre ellas (Al-Rashida et al. 2017).



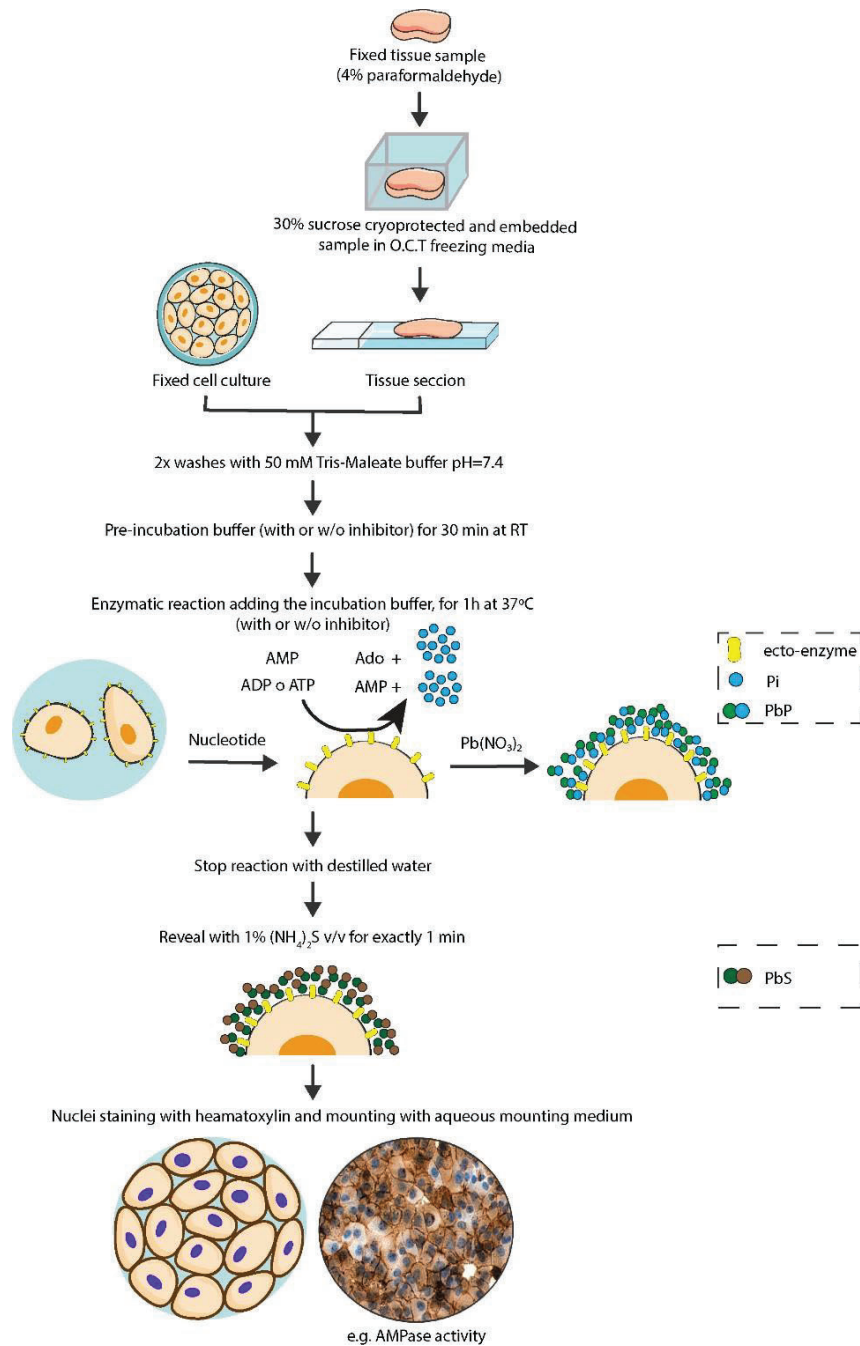


Figura I6. Esquema que incluye los pasos principales del método basado en fosfato de plomo para la detección de la actividad ecto-nucleotidasa. Abreviaturas: Pi: fosfato inorgánico. Imagen obtenida de Martín-Satué M et al 2019, incluida en el anexo.

Todas estas técnicas han sido de gran utilidad en el establecimiento de las bases de la señalización purinérgica en el control del ATP extracelular como neuromodulador en el sistema nervioso murino (Langer et al. 2008). En el contexto del grupo de investigación en el que se ha elaborado esta tesis, las ectonucleotidasas han sido caracterizadas en el

sistema reproductor femenino y masculino, murino y humano, en términos de expresión y actividad enzimática (Aliagas et al. 2010, 2013, 2014; Trapero et al. 2019b).

La presente tesis doctoral aporta mejoras metodológicas en la identificación de las ectonucleotidasas en tejido, que han permitido la detección simultánea de la expresión y actividad hidrolítica de las ectonucleotidasas, combinando inmunofluorescencia con la técnica histoquímica *in situ*, en una misma muestra. La técnica se desarrolló inicialmente en trompa uterina humana y su uso se ha aplicado después en los estudios de cáncer de endometrio aquí presentados. Los detalles metodológicos se incluyen en los Capítulos 4 y 5 y en el Anexo 1 de esta tesis doctoral.

### 2.2.1 Familia de las ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (NTPDasas)

Las NTPDasas conforman una familia de ectoenzimas con 8 miembros, cuatro de ellas, la NTPDasa1, la NTPDasa2, la NTPDasa3 y la NTPDasa8, localizadas en la superficie celular, con un dominio catalítico extracelular. La NTPDasa5 y la NTPDasa6 presentan una localización intracelular, aunque por mecanismos de expresión heteróloga se induce la secreción de sus formas solubles. Los últimos dos miembros, la NTPDasa4 y la NTPDasa7 son exclusivamente intracelulares, y realizan su actividad básicamente en el lumen de varios orgánulos, como el aparato de Golgi, los lisosomas o las vacuolas autofágicas, donde se sitúa el dominio catalítico. Suelen ensamblarse en formas homooligoméricas, principalmente en dímeros y tetrámeros de membrana que confiere mayor capacidad hidrolítica. Estas ectoenzimas presentan dos dominios transmembrana que confieren estabilidad y especificidad de sustrato al dominio catalítico extracelular mediante cambios conformacionales en los monómeros. Las diferencias de especificidad de sustrato y de intermediarios generados es lo que caracteriza a cada subtipo de NTPDasa. Así, la NTPDasa1 hidroliza eficientemente ATP (y ADP) a AMP, con poca acumulación de ADP. En cambio, la acción ATPásica de la NTPDasa2, inicialmente denominada ecto-ATPasa, genera grandes cantidades de ADP y poco AMP. La NTPDasa3 es menos selectiva y produce niveles similares de ADP y AMP en presencia de ATP (Robson et al. 2006; Zimmermann et al. 2012).

La expresión de las NTPDasas es constitutiva en múltiples tejidos humanos. El primer miembro en caracterizarse fue la NTPDasa1, inicialmente denominada ectoapirasa y posteriormente CD39, dando nombre a la familia. En esta memoria, a partir de aquí, se utilizará, a menudo, CD39 para hacer referencia a NTPDasa1. Está muy expresada en el sistema vascular, tanto en el endotelio como en el músculo liso asociado (Robson et al. 2005) y también se expresa de modo abundante en células del sistema inmunitario, como en las NK (del inglés, *natural killer*), monocitos, células dendríticas y en linfocitos T reguladores (T<sub>reg</sub>). Debido a esta expresión, se le considera un elemento clave, junto con CD73, en fenómenos de inmunosupresión mediada por adenosina (Dwyer et al. 2007; Deaglio et al. 2007), que se verán más adelante.

La NTPDasa2 se ha identificado en la adventicia de los vasos sanguíneos, en las papilas gustativas y en el tejido conectivo (Robson et al. 2005; Bartel et al. 2006). Se ha relacionado con zonas del cerebro de ratón adulto con capacidad neurogénica, como las zonas subventriculares de los ventrículos laterales y en el giro dentado del hipocampo (Braun et al. 2003). También se le atribuye una expresión astrocítica relacionada con la homeostasis de ciertas células madre neuronales adulta en humanos (Wink et al. 2003). En el endometrio ha sido identificada en una subpoblación de células madre estromales (Trapero et al. 2019b).

La NTPDasa3 se ha identificado en el sistema nervioso, en las neuronas con expresión de la hipocretina-1/orexina-A y en neuronas del ganglio dorsal y sus proyecciones centrales. La alta expresión en zonas como el tálamo, el hipotálamo y en la médula oblongada la convierte en la principal responsable de la homeostasis del ATP en estas regiones. Junto con CD73 se le atribuye un papel en el control de la transmisión mediada por nucleótidos de los circuitos nociceptivos (Belcher et al. 2006). Además, tiene expresión en diversos epitelios, como en las vías respiratorias, el riñón, el hígado y en diferentes órganos del sistema reproductor femenino y masculino (Lavoie et al. 2010, 2011). Es la principal ectoenzima en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans pancreáticos, y aunque se le ha atribuido un papel en la secreción de insulina, se ha comprobado que la delección de NTPDasa3 incrementa el metabolismo basal, produciendo una mejor tolerancia a la glucosa sin afectar los niveles de insulina en estudios *knockout* para NTPDasa3 (Syed et al. 2013; Sandhu et al. 2021).

### 2.2.2 Familia de las ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa (NPPs)

Las NPPs conforman una familia de siete enzimas transmembrana de tipo II (NPP1-3) con un dominio extracelular catalítico y de tipo I (NPP4-7), con capacidad de hidrólisis de diferentes sustratos, entre ellos, el ATP. También existen formas solubles de las NPP en algunos tejidos. Las NPP1-3 son enzimas con capacidad de hidrolizar sustratos naturales con enlaces fosfodiéster como los oligonucleótidos o la esfingomielina en ambientes ligeramente alcalinos, pero también actúan sobre sustratos artificiales o sintéticos como el p-nitrofenil 5'-timidina monofosfato (p-Nph-5'-TMP). Los nucleótidos di y trifosfato, la nicotinamida adenina dinucleótido, el flavín adenín dinucleótido, los azúcares de UDP y el sustrato artificial tiamina pirofosfato (TPP) son las moléculas clásicas hidrolizables por las NPP1-3. Estas enzimas, por lo tanto, no tienen la capacidad de hidrolizar AMP (Goding et al. 2003; Yegutkin 2014).

Las NPP de tipo II son las más ampliamente distribuidas. La NPP1 fue la primera en caracterizarse en el sistema inmunitario como *plasma cell antigen 1* o PC-1 por su expresión en células plasmáticas y linfocitos murinos. En humanos se expresa también en hueso y cartílago, corazón, hígado, placenta y testículo. Tiene una importante función en el riñón con expresión limitada en los túbulos contorneados distales (Yano et al. 1987; Huang et al. 1994). La NPP2, también denominada autotaxina, se encuentra localizada en tejido neuronal, placenta, ovarios e intestino delgado. En modelos murinos se le ha atribuido un papel importante en diferentes estadios de maduración de los oligodendrocitos (Lee et al. 1996; Fuss et al. 1997). NPP3, o gp130<sup>RB13-6</sup>, fue descrita previamente como factor importante en la diferenciación astrocítica, ya que se detecta en astrocitos naïves, pero pierde expresión en los maduros. Está relacionada con activación de los basófilos, aumentando sus niveles en basófilos activados. También se encuentra en la próstata, en el útero y el colon (Blass-Kampmann et al. 1997; Jin-Hua et al. 1997).

### 2.2.3 Familia Ecto-5'-nucleotidasa o CD73

La familia 5'-nucleotidasa tiene un único miembro de membrana, la ecto-5'-nucleotidasa, o CD73, que es la enzima limitante en la generación de adenosina extracelular. CD73 es una glicoproteína unida a la membrana mediante glicosil fosfatidil

inositol; hidroliza de modo muy eficiente AMP extracelular, generando adenosina. Aunque la forma más estudiada es la unida a membrana, existen dos formas solubles de CD73 con diferente especificidad de sustrato (Zimmermann 1992).

La forma de membrana se presenta en forma de dímero, necesario para su función hidrolítica en numerosos tejidos. Se expresa en la mayoría de los epitelios. Entre otras funciones, CD73 participa en el mantenimiento de la permeabilidad endotelial y epitelial, e influye en el transporte de iones y secreción de fluidos. Es importante también en la generación de adenosina derivada de situaciones hipóxicas celulares, influyendo en la respuesta a la hipoxia y facilitando la adaptación celular a ésta (Gnaiger 2001). Dada su fina actividad y su expresión, CD73 es objeto de numerosos estudios encaminados en disminuir o inhibir su actividad hidrolítica, en particular en el campo de la inmuno-oncología, que se revisará más adelante (Colgan et al. 2006).

#### 2.2.4 Familia de las fosfatasas alcalinas

Las fosfatasas alcalinas son ectoenzimas de membrana muy versátiles en cuanto a especificidad de sustrato. Son glicoproteínas diméricas que precisan de iones zinc y magnesio para realizar la hidrólisis de una gran variedad de compuestos con uniones monofosfato. Las fosfatasas alcalinas, como su nombre indica, responden con mayor actividad en medio alcalinos, a pH entre 9.3 y 10.3, aunque siguen siendo activas en un pH fisiológico. También hay formas solubles, con localizaciones intracelulares, siendo las más importantes las formas microsomales, nucleares y en el aparato de Golgi. Las fosfatasas alcalinas catalizan la hidrólisis principalmente de monoésteres de ácido fosfórico, entre los que encontramos al ATP, ADP, AMP, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato y el propio pirofosfato inorgánico (PPi). Existen otros sustratos más complejos que se encuentran de forma natural en el organismo como el 5'-piridoxal fosfato o vitamina B5 o la fosfoetanolamina (PEA, del inglés *phosphoethanolamine*) (Simko 1991).

En humanos existen dos grupos principales de fosfatasas alcalinas de membrana diferenciadas básicamente por su distribución tisular: (i) las fosfatasas alcalinas no específicas de tejido (TNAP, del inglés *tissue non-specific alkaline phosphatase*) y (ii), las fosfatasas alcalinas específicas de tejido. En este segundo grupo encontramos a la

fosfatasa alcalina placentaria o (PLAP, del inglés *placental-like alkaline phosphatase*), a la fosfatasa alcalina de célula germinal (GCAP, del inglés *germ-cell alkaline phosphatase*) y a la fosfatasa alcalina intestinal (IAP, del inglés *intestinal alkaline phosphatase*) (Buchet et al. 2013). Las funciones de las fosfatasas alcalinas, por lo tanto, estarán determinadas por la tipología tisular y celular donde se encuentran expresadas. La TNAP tiene una función clara en procesos de mineralización ya que se encuentra muy expresada en tejido óseo, además de hígado y riñón. TNAP además es una enzima muy activa en la zona neuronal ventricular y subventricular durante el desarrollo embrionario, zonas relacionadas con un alto nivel de proliferación celular. PLAP, por su distribución, es esencial en el control del crecimiento fetal, ya que su síntesis se induce en las células sincitiotrofoblásticas placentarias que permiten la transferencia de nutrientes al feto. En varios tipos de cáncer, sobretodo del aparato reproductor tanto femenino como masculino se han detectado niveles elevados de PLAP (Buchet et al. 2013; Zaher et al. 2020).

### **2.3 Las ectonucleotidasas en el sistema reproductor femenino**

Algunos elementos de la vía purinérgica participan activamente en la función de los sistemas reproductores tanto femenino como masculino. De hecho, el ATP y la adenosina extracelular ejercen funciones clave en la reproducción. En el sistema reproductor masculino, el ATP tiene un papel crucial en los procesos fisiológicos dependientes de contracción muscular, como es el caso de la erección, por relajación del tejido cavernoso, y la eyaculación, por contracción de la musculatura del conducto deferente, por su unión a receptores de tipo P2Y y P2X, respectivamente (Sneddon and Westfall 1984; Wu et al. 1993). El ATP también regula los procesos de espermatogénesis y de capacitación espermática, donde las células de Sertoli y las células germinales difieren entre sí en la expresión de los receptores para ATP con niveles fluctuantes durante el proceso de maduración, como por ejemplo P2X<sub>2</sub> (Glass et al. 2001).

En el sistema reproductor femenino, el ATP regula la secreción mucosa de las glándulas cervicales (Gorodeski 1995), e inicia y mantiene la contracción miometrial (Hutchings et al. 2009). La adenosina también participa en los procesos de capacitación espermática

(Minelli et al. 2004), en los procesos post-implantacionales (Blackburn et al. 1992) y en el control del tono miometrial (Gillman and Pennefather 1998).

La mayoría de ectonucleotidasas explicadas se han detectado en el endometrio humano sin patología, algunas con expresión fluctuante durante el ciclo menstrual. Las fosfatasas alcalinas, tanto PLAP como TNAP, se expresan en el epitelio glandular y luminal endometrial con disminución de los niveles en la fase secretora. NPP1 y NPP3 se localizan también en el epitelio endometrial, aunque con expresión complementaria entre ciclos. Ecto-5'-NT o CD73 presenta heterogeneidad en su expresión con altos niveles en el endometrio. Se expresa en el epitelio glandular y en el estroma, donde adopta altos niveles en la fase secretora. En cuanto a las NTPDasas, se conoce la expresión de la NTPDasa1 en las células estromales endometriales juntamente con CD73. Además, también se localiza en el endotelio de los vasos miometriales. La NTPDasa3 se expresa homogéneamente en el epitelio glandular y luminal, así como en la capa muscular de las arterias espirales. La Figura 17 identifica la localización de las ectonucleotidasas en el endometrio no patológico.

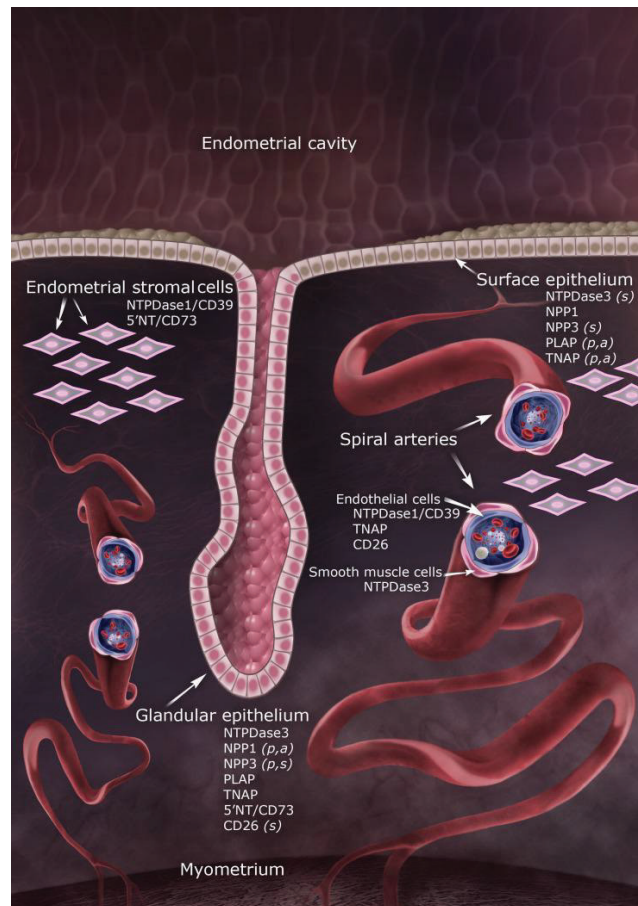


Figura 17. Representación de las diferentes familias de ectonucleotidasas expresadas en el endometrio no patológico. Se muestra la expresión en el epitelio glandular, en el estroma y en las arterias espirales que irrigan el endometrio. Además, se indica en qué fase del ciclo se expresa la ectonucleotidasa (*p*: proliferativo; *s*: secretor; *a*: atrófico). La imagen se ha obtenido de Aliagas E et al 2013.

Recientemente, estudios de nuestro grupo, incluidos en la tesis doctoral de la Dra. Carla Trapero y publicados en la revista *Purinergic Signalling* (Trapero et al. 2019b), han descifrado la expresión de NTPDasa2 en el endometrio no patológico. La falta de herramientas moleculares había dificultado su identificación previa. NTPDasa2 se expresa en el epitelio endometrial, tanto de superficie como glandular, en particular en las células ciliadas. En el estroma, NTPDasa2 se localiza en la capa basal y también siguiendo un patrón periglandular y perivascular. Como se ha comentado, la NTPDasa2 se ha relacionado con los nichos de células madre neuronales y, en el endometrio, se ha detectado su presencia en la subpoblación de células madre mesenquimales endometriales perivasculares con expresión de *sushi domain-containing protein 2*



(SUSD2)(Gargett et al. 2016), con posibles funciones en la homeostasis de estas células (Trapero et al. 2019b).

Resulta evidente la relación entre las ectonucleotidasas y el mantenimiento de una correcta homeostasis endometrial. Se pone de manifiesto la necesidad de estudio de la señalización purinérgica en patologías endometriales, con posibles alteraciones en la expresión y actividad de las ectonucleotidasas, como en el caso de la endometriosis. En esta patología, con un importante componente inflamatorio, se ha detectado una disminución de la expresión estromal del eje CD39-CD73, con tendencia a acumular ATP, cuyas propiedades proinflamatorias favorecerían los síntomas de la enfermedad (Trapero et al. 2019a; Trapero and Martín-Satué 2020). En el cáncer de endometrio, estudios previos que se abordarán en los siguientes apartados, demuestran la implicación de las ectonucleotidasas en la enfermedad.

### **3. LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA EN EL CÁNCER**

El estudio del ATP y la adenosina representa actualmente un objetivo en la investigación biomédica por su implicación en los procesos de progresión tumoral y su potencial terapéutico, basado en el bloqueo selectivo de sus receptores o de las enzimas que los regulan. La concentración de ATP extracelular en condiciones fisiológicas se sitúa en el rango nanomolar y se regula de modo eficiente por la acción de las ectonucleotidasas. En la mayoría de los tumores, la concentración de ATP se eleva al rango micromolar (Pellegatti et al. 2008), principalmente por procesos de estrés tisular que conducen a la muerte celular, ejerciendo una potente señalización. Para contrarrestar los efectos deletéreos de este aumento, las células tumorales suelen presentar mayor actividad de las ectonucleotidasas, incrementando la hidrólisis del ATP y acumulando, entonces, adenosina en el microambiente tumoral, cuyo efecto inmunosupresor favorece el crecimiento tumoral (Zimmermann 2016; Di Virgilio and Adinolfi 2017; Faas et al. 2017).

Los nucleótidos en los tumores ejercen un rol dual: (i) actúan como señalización autocrina entre las células tumorales afectando directamente a la fisiología tumoral en términos de proliferación y crecimiento, y (ii) regulan la respuesta inmunitaria

antitumoral (Campos-Contreras et al. 2020). La activación de los receptores P2Y y P2X ejerce diferentes funciones en el cáncer. El receptor P2Y<sub>2</sub>, cuya expresión está elevada en varios tumores (Greig et al. 2003), promueve la proliferación tumoral mediante activación por ATP o UTP (Tu et al. 2000). Uno de los más estudiados en cáncer es el receptor P2X<sub>7</sub>, relacionado con mecanismos de inducción de apoptosis (Schneider et al. 2006). Incrementos en los niveles de P2XR<sub>7</sub> se han observado en tumores de mama, ovario (Vázquez-Cuevas et al. 2014; Amoroso et al. 2016) y colorectal (Zhang et al. 2019), aunque en otros tipos, como el cáncer de próstata, se han encontrado formas no funcionales de P2X<sub>7</sub>, pudiendo modular negativamente la apoptosis tumoral (Slater et al. 2004). En cánceres de endometrio P2X<sub>7</sub> está disminuido, bloqueando la apoptosis y favoreciendo la consecuente supervivencia de las células tumorales (Li et al. 2006). El receptor P2X<sub>7</sub> en los tumores también está expresado por las células del sistema inmunitario como macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. Su activación por ATP induce la secreción de las interleucinas IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-18 activando la proliferación, diferenciación y activación inmunitaria y promoviendo un estado proinflamatorio y antitumoral (Labasi et al. 2002; Pizzirani et al. 2007; Adinolfi et al. 2019). El ATP extracelular además funciona como mecanismo autocrino de activación de la función citotóxica de los linfocitos (Redegeld et al. 1991; Yip et al. 2009).

Está claro que el ATP tiene un rol en el crecimiento tumoral. Las células tumorales para compensar los altos niveles de ATP extracelular, y por ende evadir la respuesta inmunitaria proinflamatoria antitumoral, aumentan la expresión de las ectonucleotidasas, en especial del tándem CD39-CD73 (Häusler et al. 2011; Bastid et al. 2015) que hidrolizan secuencialmente y de modo muy eficiente el ATP, convirtiéndolo en adenosina, cuyos niveles aumentan en el microambiente tumoral. La adenosina puede actuar directamente sobre la célula tumoral, donde se ha comprobado que incrementa el potencial metastásico por activación del receptor A<sub>2B</sub> (Mittal et al. 2016). Otro de los receptores P1 activados en las células tumorales es el A<sub>1</sub>, que ejerce una potente señalización proliferativa en gliomas (Huang et al. 2016), melanomas (Liu et al. 2020) y en tumores de mama (Mirza et al. 2005).

De hecho, el eje CD39-CD73 también se encuentra aumentado en muchas células inmunitarias del microambiente tumoral, específicamente en los linfocitos Treg (Deaglio

et al. 2007; Borsellino et al. 2007; Shi et al. 2019). En este contexto, la sobreexpresión del eje confiere al microambiente tumoral una acumulación progresiva de adenosina por acción de los Treg que ejercen una potente inmunosupresión por la activación de sus receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ . Estos receptores también son activados en células dendríticas, promoviendo una acumulación intracelular de AMPc con inhibición de la proliferación y la actividad antitumoral (Huang et al. 1997; Ohta et al. 2006). En los linfocitos T citotóxicos, activan la apoptosis, disminuyen la proliferación e inhiben la secreción de interferones de tipo  $\gamma$  y  $\alpha$  promoviendo un fenotipo que se conoce como exhausto, con poca capacidad antitumoral (Shi et al. 2019). La adenosina, además, inhibe la secreción de IL-2 (Csóka et al. 2008), contrariamente al ATP (Loomis et al. 2003), e induce la secreción de citocinas inmunosupresoras como la IL-10 (Haskó et al. 1996). En la Figura 18 se muestran los principales efectos de la sobreexpresión del eje CD39-CD73 en la respuesta inmunitaria antitumoral.

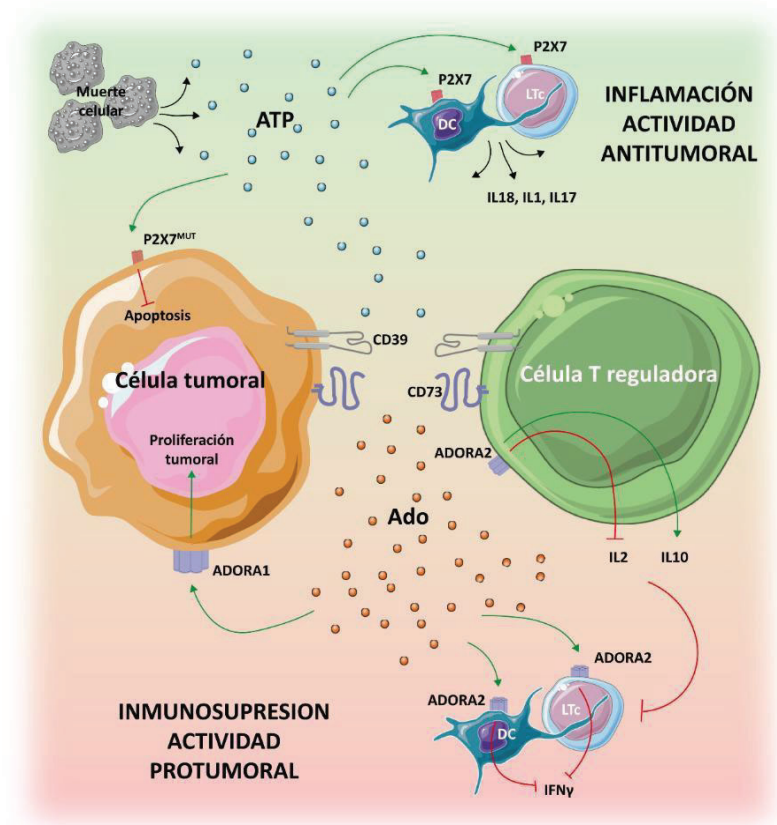


Figura 18. Representación de los efectos extracelulares del ATP y la adenosina en el microambiente tumoral. El ATP es acumulado en el microambiente tumoral a consecuencia del estrés celular y puede aumentar mucho sus niveles por la lisis de las células tumorales. Uno de los efectos directos es promover una señalización antitumoral e inflamatoria por secreción de interleucinas activadoras de la respuesta inmunitaria. La expresión del eje CD39-CD73 tanto en las células tumorales como en los linfocitos Treg, provoca la hidrólisis de ATP y acumulación de adenosina. La adenosina, disminuye la respuesta inmunitaria antitumoral por acción de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  en las Treg, células dendríticas (DC) y linfocitos T citotóxicos (LTc), disminuyendo la secreción de IL-2 e IFN $\gamma$  y aumentando la de IL-10, con propiedades antiinflamatorias. Además, la adenosina actúa en los receptores ADORA1 tumorales promoviendo la proliferación de las células tumorales. Formas mutantes de P2X $_7$  también son responsables de una disminución de la muerte por apoptosis en la célula tumoral. Imagen de elaboración propia. Se ha usado el software Adobe Illustrator (Adobe Inc., 2019. *Adobe Illustrator*, disponible en: <https://adobe.com/products/illustrator>).

En resumen, CD39 y CD73 actuarían promoviendo el crecimiento y la supervivencia celular mediante una modulación de la respuesta antitumoral. Sin embargo, los efectos derivados de los cambios de expresión de las ectonucleotidasas en las células tumorales son variados y dependen del tipo de tumor. Un aumento de expresión de CD73 se relaciona con peor pronóstico y agresividad tumoral en el cáncer vesícula (Xiong et al. 2014), gástrico (Lu 2013), leucemias linfoblásticas crónicas (Serra et al. 2011) y en el cáncer de mama triple negativo (Loi et al. 2013). Ensayos in vitro han demostrado además que promueve la invasión, migración y adhesión de las células tumorales, pudiendo ser por mecanismos no relacionados con su actividad AMPásica (Wang et al. 2008; Sadej and Skladanowski 2012). En células tumorales endometriales, CD73 se ha propuesto como un posible gen supresor tumoral, ya que su pérdida o bloqueo selectivo induce la progresión tumoral incrementando los niveles de TGF- $\beta$ 1 (Kurnit et al. 2021) y remodelando el citoesqueleto de actina afectando la migración e invasión celulares (Bowser et al. 2016). De hecho, CD73 se ha propuesto como un elemento clave en la regulación de la función e integridad de muchos epitelios (Bowser and Broaddus 2016). CD39 ha sido menos estudiada en los tumores ya que su expresión únicamente se ha detectado en el componente estromal e inmunitario del tumor, pero no en la célula tumoral. Se ha detectado expresión en líneas celulares de tumores de ovario (Häusler et al. 2011), con niveles similares a CD73, y en otros tipos de cáncer (Bastid et al. 2015).

El eje CD39-CD73 es el más estudiado, pero no son las únicas ectonucleotidasasa cuyos niveles se hallan alterados en el cáncer y ya se han diseñado terapias para su bloqueo en algunos tumores. Así, NPP1 y NPP3 se han detectado incrementadas en cánceres del conducto biliar, en cáncer de colon y astrocitomas (Yano et al. 2003; Yano 2004; Aerts et al. 2011). Además, se utiliza la expresión de NPP3 como diana terapéutica en un tipo de carcinoma de células renales refractario con altos niveles de esta ectoenzima; en estos casos la estrategia consiste en el uso de anticuerpos conjugados con fármacos antineoplásicos como la monometil auristatina F (Doñate et al. 2016). ADA y su receptor de anclaje en membrana DPPiV/CD26, se han detectado en altos niveles en suero de pacientes con carcinomas escamosos orales, en linfomas anaplásicos de célula grande y en subpoblaciones celulares de linfomas de Hodgkin y no-Hodgkin (Carbone et al.

1994; Kameoka et al. 2006; Kelgandre et al. 2016) y se han propuesto como biomarcadores de progresión de enfermedad. Las ectonucleotidasas de la familia de las fosfatasas alcalinas se han relacionado con tumores del tracto reproductor tanto masculino como femenino, con expresión de PLAP en tumores de ovario y de TNAP en los carcinomas testiculares in situ y germinales (Roelofs et al. 1999; Orsaria et al. 2016).

### 3.1 Las ectonucleotidasas en el cáncer de endometrio

No hay muchos estudios sobre la señalización purinérgica en el cáncer de endometrio. Se conoce la actividad del eje CD39-CD73 en los dos tipos histológicos más frecuentes de cáncer de endometrio, el endometrioides y el seroso, donde CD39 se expresa junto a CD73 en el microambiente de estos tumores. CD73, se expresa también en el epitelio tumoral (Aliagas et al. 2014; Bowser et al. 2016; Kurnit et al. 2021). Por otro lado, la expresión disminuida de DPP4/CD26 en tumores de endometrio (Khin et al. 2003) contribuiría a mantener reducida la hidrólisis de adenosina extracelular. Estos datos indican que, en el estroma de estos tumores, concurren los eventos necesarios para mantener niveles aumentados de adenosina compatibles con sus efectos inmunosupresores.

En las células tumorales el papel de las ectonucleotidasas parece estar más relacionado con fenómenos como la supervivencia, proliferación y capacidad de migración e invasión celulares. En esta tesis estudiamos el perfil de hidrólisis de ATP en el componente epitelial en el cáncer de endometrio, teniendo en cuenta la heterogeneidad intra e intertumoral.



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





Dados los antecedentes explicados en la introducción sobre la participación de la señalización purinérgica, en particular de las ectonucleotidasas, en el cáncer de endometrio, en esta Tesis hemos profundizado en el estudio del papel de las ectonucleotidasas en esta patología, analizando tejido tumoral humano, cultivos celulares, organoides y modelos de tumorigénesis en ratón.

La hipótesis de la tesis es que la expresión diferencial de las ectonucleotidasas en el cáncer de endometrio influye en el fenotipo tumoral; se espera que su mejor conocimiento contribuya a mejorar el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. De aquí se proponen los 2 objetivos principales:

**1. Analizar la expresión de diferentes miembros de las familias de ectonucleotidasas en tumores primarios humanos de endometrio, tanto en el componente tumoral como en el estroma** (Capítulos 1, 2 y 3). Los objetivos parciales derivados son:

1.1 Determinar la expresión en las ectonucleotidasas en diferentes tipos de tumores primarios de endometrio.

1.2 Determinar los parámetros clínicopatológicos asociados a los niveles de expresión de las ectonucleotidasas en el cáncer de endometrio.

1.3. Analizar las consecuencias funcionales de la sobreexpresión de NTPDasa3 en células de cáncer de endometrio en cultivos celulares y en un modelo de tumorigénesis en ratón.

**2. Mejorar las herramientas de estudio de las ectonucleotidasas humanas** (Capítulos 4 y 5). Los objetivos parciales derivados son:

2.1 Desarrollar la metodología de estudio que permita detectar simultáneamente la proteína y su actividad enzimática en cortes histológicos.

2.2 Poner a punto un modelo celular en 3D en cultivos de células de cáncer de endometrio y adaptar para su estudio la metodología de detección.



Esta Tesis está organizada en cinco capítulos de resultados que corresponden a: 2 artículos publicados, 1 manuscrito finalizado para enviar a revisar para su publicación, 2 manuscritos en el proceso final de redacción. Se incluye también un anexo que corresponde a un capítulo de un libro de metodología directamente relacionado con la Tesis, en que el doctorando es co-autor.

Capítulo 1. Título: Análisis de las ectoenzimas NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3, NPP3, CD73, CD26, ADA, PLAP y TNAP en tumores primarios de cáncer de endometrio. Este trabajo ha sido llevado a cabo por el doctorando, primer autor del manuscrito resultante, en proceso de redacción.

Capítulo 2. Título: Caracterización del marcador de célula madre mesenquimal endometrial ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-2 (NTPDasa2/CD39L1) en carcinomas de endometrio de alto y bajo grado: pérdida de la expresión estromal en los fenotipos invasivos. Este capítulo corresponde a la publicación: **Journal of Personalized Medicine** 2021;11(5):331. doi: 10.3390/jpm11050331. *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*. El doctorando es primer autor del artículo (co-autoría).

Capítulo 3. Título: Las ectonucleotidasas de la familia ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (CD39) regulan la proliferación y la migración celular en el cáncer de endometrio: análisis histopatológico, celular y molecular de la NTPDasa3/CD39L3. Este artículo no se ha utilizado para la realización de otra Tesis doctoral. El doctorando ha tenido un papel principal en el diseño experimental del trabajo, en la ejecución y análisis de los experimentos descritos en el artículo.

Capítulo 4. Título: Caracterización de las ectonucleotidasas en oviductos humanos con una técnica mejorada que identifica simultáneamente la expresión proteica y la actividad enzimática in situ. Este capítulo corresponde a la publicación: **Histochemistry and Cell Biology**, 2018 149(3):269-276. doi: 10.1007/s00418-017-1627-8. *Characterization of ecto-nucleotidasas in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity*. El doctorando

es 3r autor firmante de este artículo, en el que se describe una metodología puesta a punto en el laboratorio. El doctorando participó en el diseño experimental y realizó la co detección de la actividad ATP-hidrolítica y la expresión en superficie de la ectoenzima fosfatasa alcalina placental (PLAP) en líneas de cáncer de endometrio. Participó en la elaboración de las figuras y en la redacción final del manuscrito. El artículo ha sido utilizado explícitamente en la Tesis doctoral de Carla Trapero Candela, quien ya comunicó esta situación al programa de doctorado obteniendo el visto bueno, en tratarse de un artículo importante por la metodología usada en las dos Tesis.

Capítulo 5. Título: Los organoides derivados de células tumorales endometriales son herramientas útiles para el estudio de las enzimas de la familia ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (CD39) y para la validación de inhibidores enzimáticos. Este trabajo ha sido llevado a cabo por el doctorando, primer autor del manuscrito resultante, finalizado para enviar a revisión para su publicación.

Anexo. Título: *In situ identification of ectoenzymes involved in the hydrolysis of extracellular nucleotides*. Immunohistochemistry-The ageless biotechnology. London: IntechOpen; 2019. Doi: 10.5772/intechopen.84495.

La Directora y Tutora:

**MARTIN  
SATUE  
MIREIA -  
43685048K**

Firmado digitalmente por  
MARTIN SATUE  
MIREIA -  
43685048K  
Fecha: 2022.11.04  
17:34:27 +01'00'

El Director:

**FRANCISCO  
JAVIER  
MATIAS-GUIU  
GUIA /  
num:2504432**

Signat digitalment  
per FRANCISCO  
JAVIER MATIAS-  
GUIU GUIA /  
num:2504432  
Data: 2022.11.04  
11:13:38 +01'00'

# RESULTADOS



# CAPÍTULO 1

Análisis de las enzimas NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3, NPP3, CD73, CD26, ADA, PLAP y TNAP en tumores primarios de cáncer de endometrio





## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El uso de las técnicas de inmunohistoquímica en la investigación y diagnóstico en patología gine-oncológica son de gran utilidad pues son reproducibles, relativamente sencillas de ejecutar una vez puestas a punto y perfectamente aplicable en la práctica clínica diaria. Junto con la evaluación histológica, que sigue siendo el gold estándar de la evaluación tumoral en el endometrio, la inmunohistoquímica es útil en el diagnóstico, principalmente en aquellos casos de alto grado. Además, puede proporcionar concordancias histológicas y genotípicas relevantes a la hora de clasificar a los tumores (McCluggage 2002; Marjoniemi 2004; Chiang and Soslow 2014).

La expresión y actividad de las ecto-nucleotidasas se ha descrito en el sistema reproductor femenino humano, en las trompas de Falopio (Villamonte et al. 2018) y en el endometrio normal, donde se detecta expresión de las cuatro familias. En el epitelio glandular endometrial, se expresa NTPDasa3, NPP3, PLAP, TNAP y CD73, mientras que en el estroma predomina el tándem CD39-CD73 (Aliagas et al. 2013). Hasta ahora no existía un análisis completo de la expresión de las ectonucleotidasas en el cáncer de endometrio.

Este análisis puede revelar posibles nuevos marcadores de enfermedad en el caso del cáncer de endometrio, resultando de gran interés para el diseño y desarrollo de modelos de estudio de nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas.

Con el fin de conocer la **distribución y actividad de las ectonucleotidasas en el cáncer de endometrio**, los objetivos de este capítulo han sido:

**Conocer la expresión** de las ectonucleotidasas en el cáncer de endometrio, determinando posibles diferencias entre el compartimento tumoral (epitelial) y el microambiente (estroma) de los tumores (estudio intratumoral)

**Analizar posibles cambios de expresión** entre los distintos tipos de cáncer de endometrio (estudio intertumoral)

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Tejido tumoral

El estudio se desarrolló de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki y el protocolo se aprobó por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de Bellvitge. Se obtuvieron 57 tumores primarios de endometrio humano a partir de histerectomías y se diagnosticaron según su histología, grado y perfil molecular.

Los tumores primarios se procesaron para su estudio inmunohistoquímico siguiendo los protocolos estándares descritos en el laboratorio (Trapero et al. 2019b).

### 2.2 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios usados en los experimentos están detallados en la Tabla C1-1. Como anticuerpos secundarios para reconocer los anticuerpos primarios de ratón o conejo, se usaron anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *horseradish peroxidase*) (EnVision + System; DAKO, Carpintería, CA, Estados Unidos) diluidos 1:500 en PBS.

Anticuerpo	Huésped/Clon	Casa comercial	Dilución
$\alpha$ -ENTPDasa1	Ratón / BU61	Ancell	1:500
$\alpha$ -ENTPDasa2	Ratón / hN2-H9s	<a href="http://ectonucleotidas-ab.com/">http://ectonucleotidas-ab.com/</a>	1:100
$\alpha$ -ENTPDasa3	Ratón / hN3-B3s	<a href="http://ectonucleotidas-ab.com/">http://ectonucleotidas-ab.com/</a>	1:500
$\alpha$ -ENPP3	Ratón / NP4D6	Abcam	1:100
$\alpha$ -CD73	Ratón / 4G4	Abcam	1:50
$\alpha$ -CD26	Ratón / 202-36	Abcam	1:100
$\alpha$ -ADA	Conejo poly.	NovusBio	1:200
$\alpha$ -PLAP	Ratón / 8B6	Sigma-Aldrich	1:1000
$\alpha$ -TNAP	Ratón / 3H414	Abcam	1:50

**Tabla C1.1. Listado de los anticuerpos primarios usados en los experimentos de inmunohistoquímica.** Se especifica el huésped, el clon, la casa comercial y la dilución utilizada.

### 2.3 Inmunohistoquímica

Los protocolos seguidos son los usados de modo rutinario en el laboratorio (Trapero et al. 2019b). En resumen, tras el bloqueo de las uniones inespecíficas con 20 % de suero normal de cabra (Gibco, Paisley, Reino Unido), 0.2 % de Tritón y 0.2 % de gelatina (Merck, Darmstadt, Alemania) en PBS, los cortes histológicos se incubaron durante toda la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios adecuados y se reveló la reacción mediante DAB (0.6 mg/mL 3,3'-diaminobencidina, 0.5 µL/mL de peróxido de hidrógeno en PBS). Los núcleos se tiñeron con hematoxilina y las muestras fueron deshidratadas y se realizó el montaje con medio DPX.

Se observaron y fotografiaron las muestras y se registró y analizó la distribución del marcaje. El análisis se realizó por dos observadores independientes. Se registró la siguiente información: ausencia o presencia de marcaje e intensidad de marcaje en el tumor y en el estroma, estableciendo cuatro niveles de intensidad; nula (0), leve (+), moderada (++) y elevada (+++). Todos los datos se registraron en tablas.

### 2.4 Análisis estadístico

La ausencia o presencia de marcaje y el grado y la clasificación histológica de los tumores se describieron mediante tablas con recuentos y porcentajes. Se han utilizado modelos logarítmicos binomiales para evaluar la asociación entre proteína y tipo tumoral. Se han validado las condiciones de aplicación de los modelos y se han evaluado los intervalos de confianza al 95 %, siempre que ha sido posible. El análisis fue realizado por la Unidad de Bioestadística del IDIBELL.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Clasificación de los tumores de endometrio incluidos en el estudio

La distribución de los tumores analizados se indica en la Tabla C1-2. En resumen, según la clasificación histológica, de los 57 tumores incluidos en el estudio, 46 corresponden a carcinomas endometrioides (80,7 %), 11 a carcinomas no-endometrioides (19,3 %), incluyendo carcinomas serosos, carcinomas mixtos y carcinosarcomas.

Según el grado tumoral, un 33,3 % (19/57) corresponden a tumores de grado 1 (todos de tipo endometriode), un 17,5 % (10/57) a tumores de grado 2 (todos de tipo endometriode) y un 49,1 % (28/57) a tumores de grado 3 (incluyendo endometrioides, carcinomas serosos, carcinomas mixtos y carcinosarcomas).

En cuanto al tipo molecular los tumores de tipo POLE representaron un 8,77 % (5/57), los MSI en un 24,6 % (14/57), los CNL en un 43,9 % (25/57) y los CNH en un 22,8 % (13/57).

	<u>Histología</u>
Endometriode	46 (80.7%)
No-endometriode	11 (19.3%)
	<u>Grado tumoral</u>
Grado 1	19 (33.3%)
Grado 2	10 (17.5%)
Grado 3	28 (49.1%)
	<u>Molecular</u>
POLE	5 (8.77%)
MSI	14 (24.6%)
CNL	25 (43.9%)
CNH	13 (22.8%)

Tabla C1-2. Distribución de los tumores analizados según la clasificación histológica, el grado tumoral y su perfil molecular. Se indica el número de muestras de cada tipo y el porcentaje que representan del total.

### 3.2 Análisis de la expresión de las diferentes familias de ectonucleotidasas

Mediante inmunomarcaje se ha analizado la expresión de los siguientes enzimas: NTPDasa1/CD39, NTPDasa2, NTPDasa3, NPP3, CD73, CD26, ADA, PLAP y TNAP, en los dos compartimentos celulares indicados. La información se recoge a modo de tabla (Tabla C1-3). En resumen, en el componente epitelial de los tumores se ha detectado expresión de todas las proteínas, excepto NTPDasa1, aunque con las variaciones que se indicarán más adelante; NTPDasa1 solo se expresa en el estroma y endotelio vascular de los tumores analizados (Figura C1-1).

	Tumor N=57 (100%)	Estroma N=57 (100%)
CD39	0 (0%)	57 (100%)
NTPDasa2	48 (84.2%)	21(36.84%)
NTPDasa3	31 (54.38%)	5 (8.77%)
NPP3	31 (54.38%)	8 (14.03%)
CD73	32 (56.14%)	25 (43.85%)
CD26	31 (56.52%)	2 (3.5%)
ADA	2 (3.5%)	9 (15.78%)
PLAP	38 (68.42%)	2 (3.5%)
TNAP	17 (29.82%)	3 (5.26%)

Tabla C1-3. Expresión de las ectonucleotidasas en parte tumoral (epitelial) y en el estroma en los tumores analizados. Se indica el número de muestras con expresión y el porcentaje que representan del total.

#### 3.2.1 Expresión en función de la clasificación histológica de los tumores

El análisis según la clasificación histológica en tumores endometrioides y no endometrioides reveló que la expresión de NTPDasa3 es significativamente superior ( $p$  0,019) en las células tumorales de los carcinomas endometrioides (63,04 % de casos) que en los no-endometrioides (18,18 % de casos). Estos datos condujeron al estudio más amplio de NTPDasa3 del Capítulo 3 de esta tesis. Los mismos resultados se observan para la expresión de CD73 ( $p$  0,013) entre tumores endometrioides (65,22 %) y no-endometrioides (18,18 %).

En cambio, en el estroma tumoral, CD73 solo está presente en un 34,78 % de tumores endometrioides y en un 81,82 % en los no-endometrioides ( $p$  0,013).

Las diferencias detectadas en NTPDasa2 se describen con detalle en el Capítulo 2. Los resultados son mostrados en la Tabla C1-4.

		NO		p-valor
		ENDOMETRIOIDE N=5, (8.77%)	ENDOMETRIOIDE N=14, (24.56%)	
CD39	T	0 (0%)	0 (0%)	-
	S	5 (100%)	11 (100%)	-
NTPDasa2	T	4 (86.96%)	8 (72.73%)	0.482
	S	19 (41.3%)	2 (18.18%)	0.28
NTPDasa3	T	29 (63.4%)	2 (18.18%)	0.019*
	S	5 (10.87%)	0 (0%)	0.581
NPP3	T	27 (58.7%)	4 (36.36%)	0.318
	S	5 (10.8%)	3 (27.27%)	0.356
CD73	T	30 (65.22%)	2 (18.18%)	0.013*
	S	16 (34.78%)	9 (91.82%)	0.013*
CD26	T	26 (56.52%)	5 (45.45%)	0.745
	S	2 (4.35%)	0 (0%)	1
ADA	T	2 (4.35%)	0 (0%)	1
	S	7 (15.22%)	2 (18.18%)	1
PLAP	T	33 (71.74%)	6 (54.55%)	0.459
	S	1 (2.17%)	1 (9.09%)	0.835
TNAP	T	14 (30.43%)	3 (27.27%)	1
	S	1 (2.17%)	1 (2.17%)	0.166

Tabla C1-4. Expresión de las ectonucleotidasas en función del tipo histológico (endometrioides y no endometrioides). Se indica el número de muestras con expresión y el porcentaje que representan del total. T hace referencia a área del tumor y S al estroma. \*  $p < 0,05$

---

### 3.2.2 Expresión en función de la clasificación molecular de los tumores

En el análisis en base a la clasificación molecular se ha determinado, como en el anterior, la ausencia o presencia de las proteínas entre los tumores de tipo POLE, MSI, CNL y CNH. Según este análisis también se identificaron diferencias significativas en la expresión de NTPDasa3 ( $p$  0,049) entre los diferentes tipos moleculares; la mayoría de los de tipo MSI y CNL presentan expresión de NTPDasa3 (71,43 y 64 %, respectivamente), mientras que los de tipo POLE son los de menor expresión (20%). CD73 también presenta asociación significativa entre grupos ( $p$  0,016); en este caso, los tumores de tipo CNL son los que tienen más casos con expresión de CD73, con un 76 %.

La expresión de TNAP también varía entre los diferentes tumores, observando un mayor de casos positivos en la célula tumoral en los tumores de tipo POLE y CNL (60 y 44 %, respectivamente) en comparación con los tumores MSI y CNH (7,14 y 15,38 %, respectivamente), siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p$  0,025). Estas diferencias no se observaron por la clasificación histológica. Los resultados se indican en la Tabla C1-5.



		<b>POLE</b> N=5, (8.77%)	<b>MSI</b> N=14, (24.56%)	<b>CNL</b> N=25, (43.85%)	<b>CNH-SL</b> N=13, (22.80%)	<b>p-valor</b>
CD39	T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
	S	5 (100%)	14 (100%)	25 (100%)	13 (100%)	-
NTPDasa2	T	4 (80%)	12 (85.71%)	22 (88%)	10 (76.92%)	0.83
	S	2 (40%)	2 (14.29%)	13 (52%)	4 (30.77%)	0.124
NTPDasa3	T	1 (20%)	10 (71.43%)	16 (64%)	4 (30.77%)	0.049*
	S	0 (0%)	1 (7.14%)	3 (12%)	1 (7.69%)	0.832
NPP3	T	1 (20%)	8 (57.14%)	14 (56%)	8 (61.54%)	0.437
	S	0 (0%)	1 (7.14%)	3 (12%)	4 (30.77%)	0.215
CD73	T	2 (40%)	8 (57.14%)	19 (57%)	3 (23.08%)	0.016*
	S	1 (20%)	4 (28.57%)	1 (40%)	10 (76.92%)	0.038*
CD26	T	3 (60%)	7 (50%)	16 (64%)	5 (38.46%)	0.488
	S	0 (0%)	1 (7.14%)	1 (4%)	0 (0%)	0.749
ADA	T	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	1 (7.69%)	0.71
	S	1 (20%)	5 (35.71%)	2 (8%)	1 (7.69%)	0.11
PLAP	T	5 (100%)	10 (71.43%)	17 (68%)	7 (53.85%)	0.302
	S	0 (0%)	0 (0%)	2 (8%)	0 (0%)	0.448
TNAP	T	3 (60%)	1 (7.14%)	11 (44%)	2 (15.38%)	0.025*
	S	0 (0%)	1 (7.14%)	2 (8%)	0 (0%)	0.688

Tabla C1-5. Análisis de la asociación de la presencia de las ectonucleotidasas en el área del tumor (T) y en el estroma (S) entre los tumores según la clasificación molecular. Se indica el número de muestras con expresión y el porcentaje que representan del total. \*  $p < 0,05$

### 3.2.3 Expresión en función del grado tumoral

Atendiendo al grado, en la zona tumoral, CD73 presenta una marcada heterogeneidad entre grado bajo y alto, siendo la mayoría de los casos de grado 1 (94,74 %) y de grado 2 (80 %) positivos y solo un 21,43 % de los casos de grado 3. La asociación entre CD73 del tumor y el grado tumoral es significativa ( $p < 0,001$ ). En el estroma también existe asociación significativa con el grado, aunque en sentido contrario al tumor ( $p < 0,01$ ); así, un 67,86 % de casos de grado 3 son positivos y solo un 26,32 % de grado 1 y un 10 % de grado 2.

Esta comparativa por grados ha puesto de manifiesto asociación entre la expresión de diferentes proteínas y el grado tumoral. Es el caso de NTPDasa2, cuya expresión en el estroma disminuye con el grado. En el caso de NTPDasa3, queda clara la pérdida de expresión con el grado tumoral ( $p=0,018$ ). Lo mismo sucede con la expresión de TNAP ( $p=0,01$ ). Los resultados se indican en la Tabla C1-6.

		<b>GRADO 1</b> N=19, (33.33%)	<b>GRADO 2</b> N=10, (17.54%)	<b>GRADO 3</b> N=28, (49.12%)	<b>p-valor</b>
CD39	T	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
	S	19 (100%)	10 (100%)	28 (100%)	-
NTPDasa2	T	18 (94.74%)	9 (90%)	21 (75%)	0.164
	S	11 (57.89%)	4 (40%)	6 (21.43%)	0.038*
NTPDasa3	T	13 (67.42%)	8 (80%)	10 (35.71%)	0.018*
	S	2 (10.53%)	1 (10%)	2 (7.14%)	0.912
NPP3	T	14 (73.68%)	5 (50%)	12 (42.86%)	0.109
	S	2 (10.53%)	1 (10%)	5 (17.86%)	0.716
CD73	T	18 (94.74%)	8 (80%)	6 (21.43%)	<0.001*
	S	5 (26.32%)	1 (10%)	19 (67.86%)	0.001*
CD26	T	12 (63.16%)	6 (60%)	13 (46.43%)	0.498
	S	0 (0%)	1 (10%)	1 (3.57%)	0.38
ADA	T	1 (5.26%)	0 (0%)	1 (3.57%)	0.765
	S	2 (10.53%)	1 (10%)	6 (21.43%)	0.517
PLAP	T	15 (78.95%)	9 (90%)	15 (53.57%)	0.05
	S	1 (5.26%)	0 (0%)	1 (3.57)	0.765
TNAP	T	10 (52.63%)	0 (0%)	7 (25%)	0.01*
	S	1 (5.26%)	0 (0%)	2 (7.14%)	0.686

Tabla C1-6. Análisis de la asociación de la presencia de las ectonucleotidasas en la zona tumoral (T) y en la zona estromal (S) entre los tumores según el grado. Se indica el número de muestras con expresión y el porcentaje que representan del total. \* $p<0,05$ .

#### 4. DISCUSIÓN

En este primer capítulo, se ha analizado la expresión de miembros de las diferentes familias de ectonucleotidasas, mediante técnicas de inmunohistoquímica, en 57 tumores primarios de endometrio. Este estudio ha permitido localizar estas proteínas en el componente epitelial tumoral y en el estroma. Su expresión en un compartimento u otro influye en el comportamiento del tumor puesto que condiciona el balance entre ATP y adenosina, cuyos efectos suelen ser opuestos. Los tumores se han clasificado según la tipología histológica, molecular y el grado para estudiar las posibles asociaciones con la expresión.

La clasificación de los tumores incluidos en este estudio es representativa de la heterogeneidad clínica (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013). La mayoría de tumores corresponden a formas endometrioides, de grado bajo y medio y de tipología molecular MSI y CNL. Los tumores no endometrioides, incluyendo carcinomas serosos, mixtos y carcinosarcomas, de alto grado, representan menos del 20 % de los casos recogidos.

Uno de los objetivos para mejorar el diagnóstico y el tratamiento del cáncer es la identificación de antígenos específicos, diferenciales, en los tumores (Elliott et al. 2014). La detección combinada de varios de estos antígenos mejora la interpretación clínica del tumor y su prognosis, el diagnóstico y la decisión del tratamiento. Algunos de estos antígenos son receptores de membrana, como es el caso de HER-2, usado como marcador de progresión tumoral y respuesta a tratamiento en el cáncer de mama (Wolff et al. 2007) y uno de los receptores mencionados en el apartado Introducción con sobreexpresión detectada en el cáncer de endometrio (Berchuck et al. 1991). El desarrollo y validación de anticuerpos específicos contra antígenos de membrana celulares es de gran interés en la investigación oncológica (Bordeaux et al. 2010).

La principal limitación del estudio de las ectonucleotidasas es la diversidad de miembros de las diferentes familias; el desarrollo de nuevas herramientas moleculares para su identificación y la validación de inhibidores específicos de su actividad, es uno de los retos de la investigación en el ámbito de la señalización purinérgica y uno de los objetivos de investigación de nuestro grupo. A medida que se validan nuevos

anticuerpos, se puede ir completando el escenario purinérgico en los diferentes tejidos. Ya se conocía la presencia del eje CD39-CD73 en el cáncer de endometrio (Aliagas et al. 2014), y la expresión diferencial de CD73 se ha relacionado con el grado tumoral (Bowser et al. 2016; Kurnit et al. 2021). En el estroma de los tumores existe una elevada actividad adenosinérgica de este eje. Hemos corroborado estos datos en este estudio. Además, aquí, hemos ampliado el estudio, utilizando nuevos anticuerpos validados específicos para NTPDasa1/CD39, NTPDasa2, NTPDasa3, NPP3, CD26, ADA, PLAP y TNAP. Hemos demostrado que las ectonucleotidasas que se expresan en el componente epitelial del tumor en el cáncer de endometrio son: NTPDasa2, NTPDasa3, NPP3 y CD73. Según este patrón, en las células epiteliales tumorales en el cáncer de endometrio, el tándem más eficiente en la hidrólisis de ATP hasta adenosina, es NTPDasa3-CD73.

El hallazgo de NTPDasa2, cuya expresión en el estroma correlaciona con la capacidad invasiva de los tumores, se detalla en el Capítulo 2 de esta memoria.

Hemos demostrado que existe heterogeneidad en la expresión de las ectonucleotidasas entre los diferentes tipos de tumores de endometrio. Así, los tumores de tipo endometriode y de grado 1 y grado 2, tienen expresión de NTPDasa2, NTPDasa3 y CD73 en el epitelio tumoral. En cambio, los tumores de tipo no-endometriode y de grado 3, en su mayoría, no expresan NTPDasa3 ni CD73 en el epitelio tumoral, aunque sí NTPDasa2 en proporciones similares a los anteriores.

En otros estudios, con modelos animales de carcinoma urotelial también se ha detectado una disminución de la expresión tumoral de NTPDasa3 a medida que aumentaba la progresión tumoral (Rockenbach et al. 2014). Estos resultados, además concuerdan con la propuesta de que CD73 actúa como supresor de la progresión tumoral del cáncer de endometrio, relacionando la pérdida de expresión con malignidad e invasividad de las células epiteliales tumorales endometriales (Bowser et al. 2016; Kurnit et al. 2021).

Como se ha mencionado, el eje CD39-CD73 está sobreexpresado en muchos tumores, influyendo en la actividad inmunitaria antitumoral mediante la acumulación de adenosina (Allard et al. 2019). Estos datos apuntan a que el aumento de CD73 en el

estroma tumoral endometrial está relacionado con este mecanismo de inmunoevasión tumoral, junto con los altos niveles de CD39 observados.

La Figura C1-1 resume de manera visual las alteraciones en la expresión de las ectonucleotidasas mencionadas entre la histología y el grado en el tumor y el estroma.

**Figura C1-1. Resumen de la expresión proteica de las principales ectonucleotidasas estudiadas en el cáncer de endometrio: NTPDasa1, NTPDasa2, NTPDasa3 y CD73 en el componente epitelial (tumor) y en el estroma, según el grado (G1, G2, G3) y el tipo tumoral. El rojo indica ausencia (o disminución) de la expresión y el verde la presencia (o incremento) de expresión de las diferentes ectonucleotidasas. EEC:**

**carcinoma de endometrio endometriode, del inglés *endometrioid endometrial carcinoma*; NEEC: carcinoma de endometrio no endometriode, del inglés *non-endometrioid endometrial carcinoma*; G1, G2, G3: grado 1, 2 y 3 respectivamente.**

	Tumor		Estroma	
	EEC	NEEC	EEC	NEEC
	G1, G2	G3	G1, G2	G3
NTPDasa1	Red	Red	Green	Green
NTPDasa2	Green	Green	Green	Red
NTPDasa3	Green	Red	Red	Red
CD73	Green	Red	Red	Green

Los tumores de endometrio presentan altos niveles de heterogeneidad a varios niveles, tanto en el microambiente tumoral, formado por multitud de tipos celulares, como entre las células tumorales. La clasificación molecular ha identificado diversas firmas mutacionales en los tumores de endometrio muy relacionados con el riesgo de progresión tumoral, recidiva y respuesta a terapia (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013; Piulats et al. 2017). Se ha determinado que los tumores de tipo POLE y con inestabilidad de microsatélites (MSI) suelen responder a las terapias con inhibidores de puntos de control (en inglés, *checkpoint inhibitors*). La inmunoterapia se basa en el uso de anticuerpos que actúan sobre el sistema inmunitario inhibiendo los receptores que atenúan la respuesta inmunitaria antitumoral (Piulats and Matias-Guiu 2016). Sin embargo, los tumores de tipo CNL y CNH, no suelen responder a inmunoterapia. Esto se debe a la carga mutacional y a la consecuente cantidad de neoantígenos expresados por las células tumorales. POLE y MSI son caracterizados por una alta carga mutacional, además, se han detectado altos niveles de linfocitos infiltrantes antitumorales con capacidad citotóxica y alta expresión de marcadores *checkpoint*, haciendo este tipo de tumores más sensibles a la inmunoterapia. Estas

características no se observan en los tumores de tipo CNH y CNL (van Gool et al. 2015; Howitt et al. 2015; Piulats et al. 2017). El estroma tumoral descrito aquí coincide con un ambiente inmunosupresor por acción de la adenosina extracelular. Los tumores CNL y CNH presentan mayor inmunosupresión, coincidente con la presencia de CD73, que los tumores POLE y MSI, con expresión de CD73 más limitada. CD73, por lo tanto, actuaría favoreciendo este estado inmunosupresor detectado en los tumores CNL y CNH, generando adenosina eficientemente. Este sería otro mecanismo que utiliza el tumor para el inmuno-escape, ya que la disminuida carga mutacional en estos tumores es un factor determinante para la respuesta inmunitaria antitumoral natural (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013; Howitt et al. 2015). Por lo tanto, hacemos énfasis en la valoración de CD73 como otro posible marcador inmunohistoquímico de diagnóstico y progresión del cáncer de endometrio teniendo en cuenta a la clasificación molecular. Futuros estudios relativos a esta asociación pueden ir encaminados a descifrar si existe una relación de CD73 entre los tumores con alta expresión estromal entre las diferentes clasificaciones.

En conclusión, en el primer capítulo de la tesis doctoral, se ha abordado un aspecto necesario para el desarrollo de los posteriores estudios. El objetivo principal ha sido determinar la expresión de las diferentes familias de ectonucleotidasas en los tumores de endometrio. Hemos detectado miembros de las diferentes familias tanto en el componente epitelial tumoral como en el componente estromal. Este estudio nos ha permitido definir las ectonucleotidasas predominantes en el cáncer de endometrio: NTPDasa1, NTPDasa2 y CD73 en el estroma tumoral, y NTPDasa2, NTPDasa3 y CD73 en el epitelio tumoral. El segundo objetivo ha sido estudiar posibles cambios en la expresión de las ectonucleotidasas identificadas en los tumores, según el tipo histológico, molecular y en función del grado tumoral. Hemos descrito una importante heterogeneidad intertumoral. Este estudio ha definido la priorización de los estudios sobre NTPDasa2 (Capítulo 2) y NTPDasa3 (Capítulo 3).



# CAPÍTULO 2

Caracterización del marcador de célula madre mesenquimal endometrial ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-2 (NTPDase2/CD39L1) en carcinomas de endometrio de alto y bajo grado: pérdida de la expresión estromal en los fenotipos invasivos

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. 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 22;11(5):331. Q1; IF:4.433.

\* *coautores*





La expresión diferencial de **NTPDasa2** en el cáncer de endometrio en relación al grado del tumor, descrita en el Capítulo 1, y la reciente caracterización de esta enzima en el endometrio funcional no patológico (Trapero et al. 2019b), fue el punto de partida de este segundo capítulo. Así, analizamos la expresión de NTPDasa2 en tumores de endometrio, estableciendo relaciones clínico-patológicas.

Los principales hallazgos de este estudio son:

La expresión de NTPDasa2 en el componente epitelial de los tumores presenta variaciones en la distribución subcelular en función del grado tumoral. La expresión ciliar se pierde al aumentar el grado.

La expresión de NTPDasa2 en el estroma tumoral se limita al estroma de la unión tumor-miometrio, pero los fenotipos con invasión miometrial pierden esta expresión.

A nivel de expresión génica, niveles altos de *ENTPD2* se asocian, en la clínica, a una mayor supervivencia de las pacientes.

Las células madre mesenquimales endometriales NTPDasa2<sup>+</sup>/SUSD2<sup>+</sup> también están presentes en el endometrio tumoral.

Este estudio se ha publicado en la revista **Journal of Personalized Medicine** 2021;11(5):331. doi: 10.3390/jpm11050331. Q1; IF: 4.433.



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 Eulalia 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](mailto: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 basaloid. 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

## 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.

## 1. Materials and Methods

### 1.1. 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®; 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).

### 1.2. 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 (α-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.

### 1.3. 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.

### 1.4. 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.

### 1.5. *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 Log2 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.

### 1.6. Statistical Analysis of Ectonucleotide Triphosphate Diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) Presence

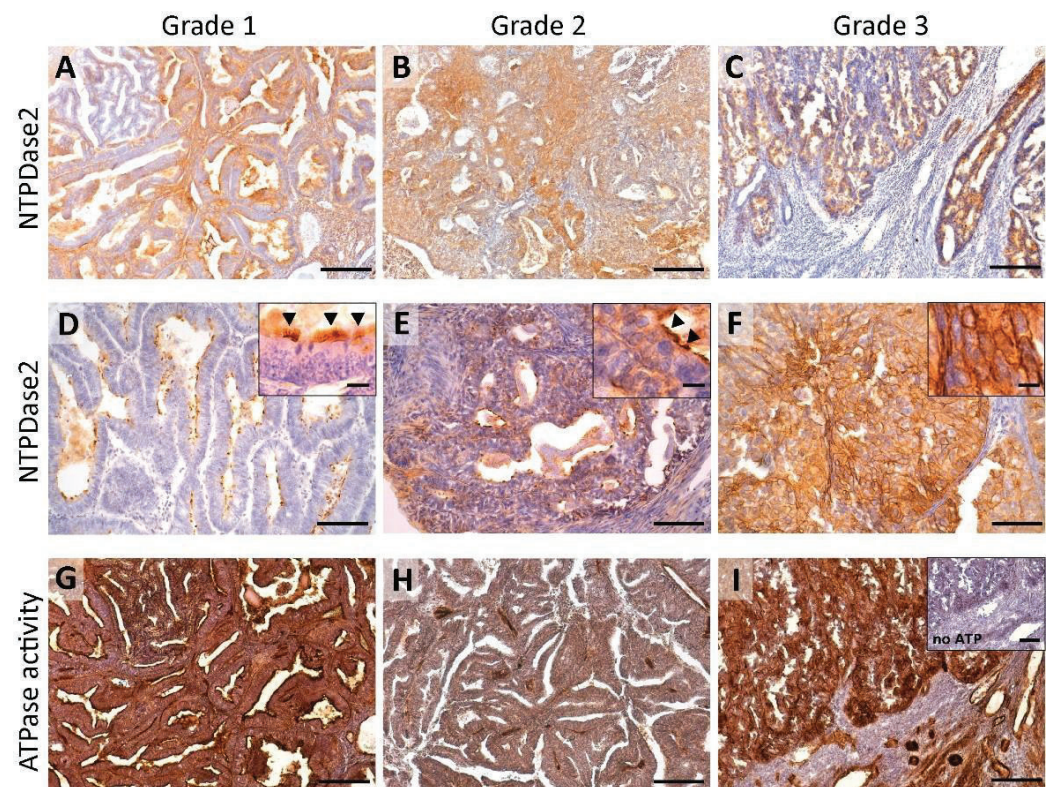
The predictive analytics software IBM SPSS Statistics v22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the creation of frequency tables with the presence or absence and the distribution of NTPDase2 in each tumor component as well as for grading and invasion features of EC.

## 2. Results

### 2.1. 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).

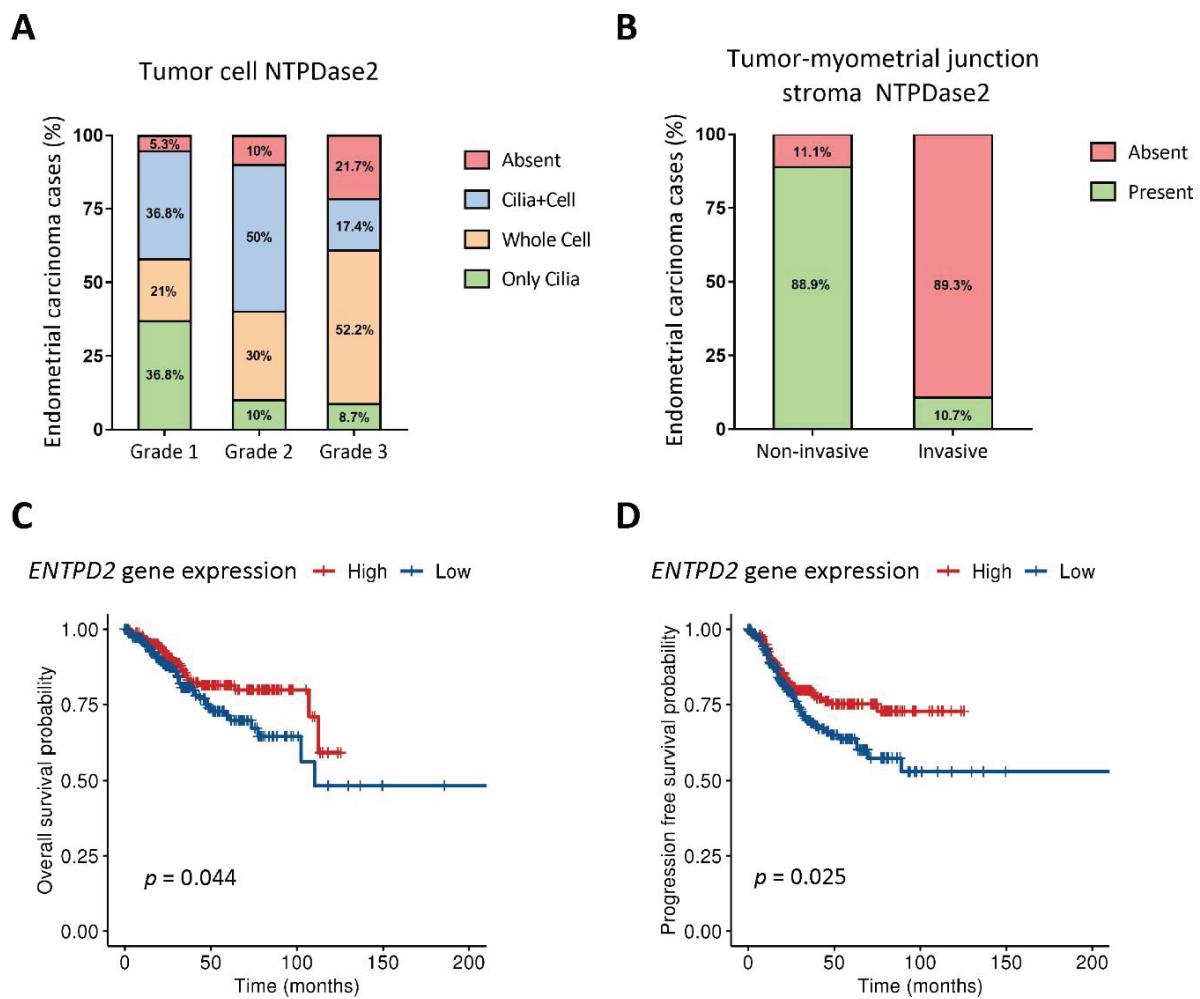




**Figure 1.** Immunohistochemistry  $\alpha$ -NTPDase2 (ectonucleotide triphosphate diphosphohydrolase-2) (A–F) and in situ enzyme ATPase activity (G–I) in ECs at different tumor grades (Grade 1, 2, 3). NTPDase2 expression was mainly observed in the tumor epithelial cells of ECs (A–F). For stroma labelling, 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).

### 2.1.1. 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 was found in two, non-exclusive tumor cell localizations: the cilia of ciliated tumor cells (along the entire length of cilia) and throughout the whole cell (Figure 1). 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 junctionstoma 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.

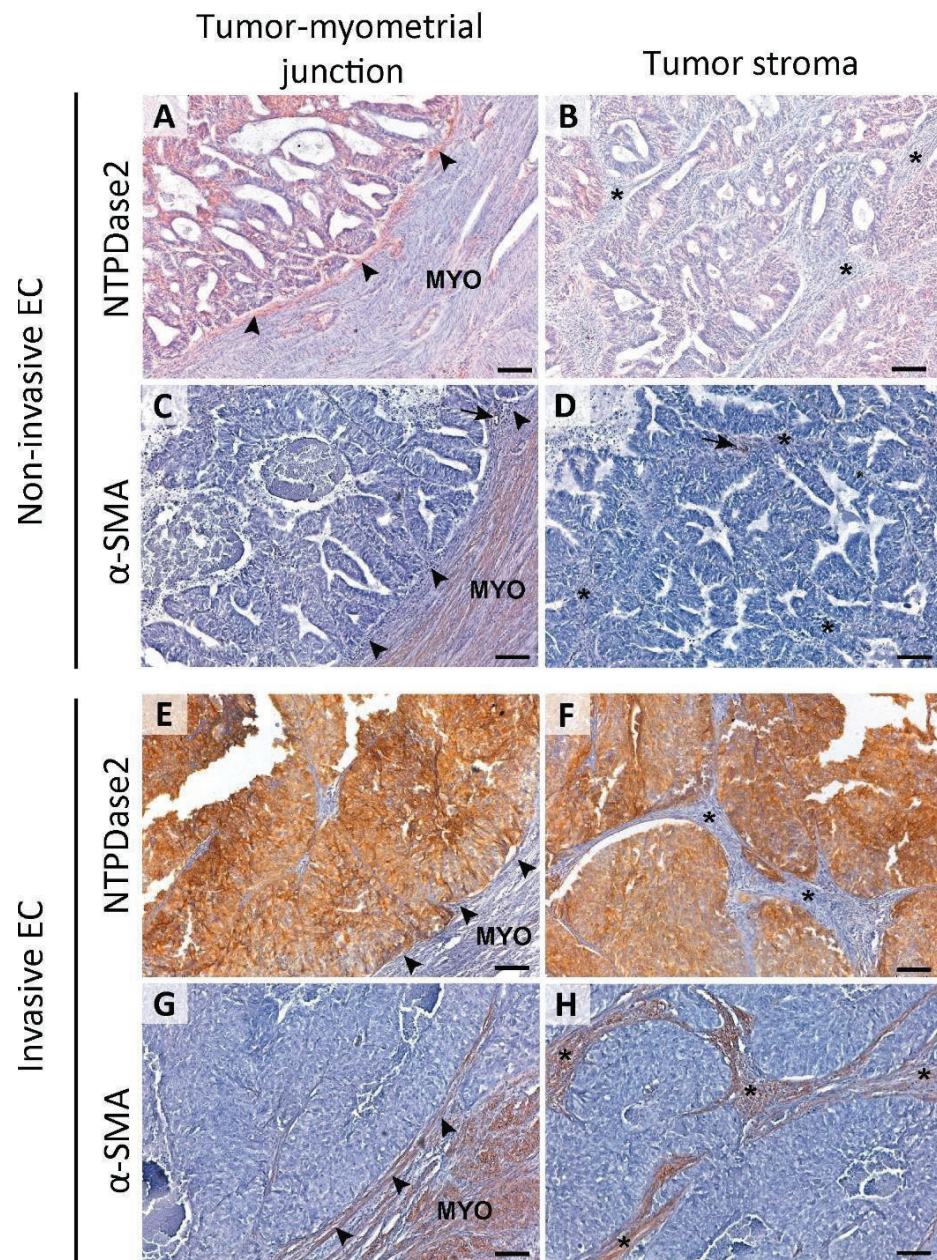
### 2.1.2. NTPDase2 Expression in the Stromal Component of Tumor: Changes during Tumor Progression

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

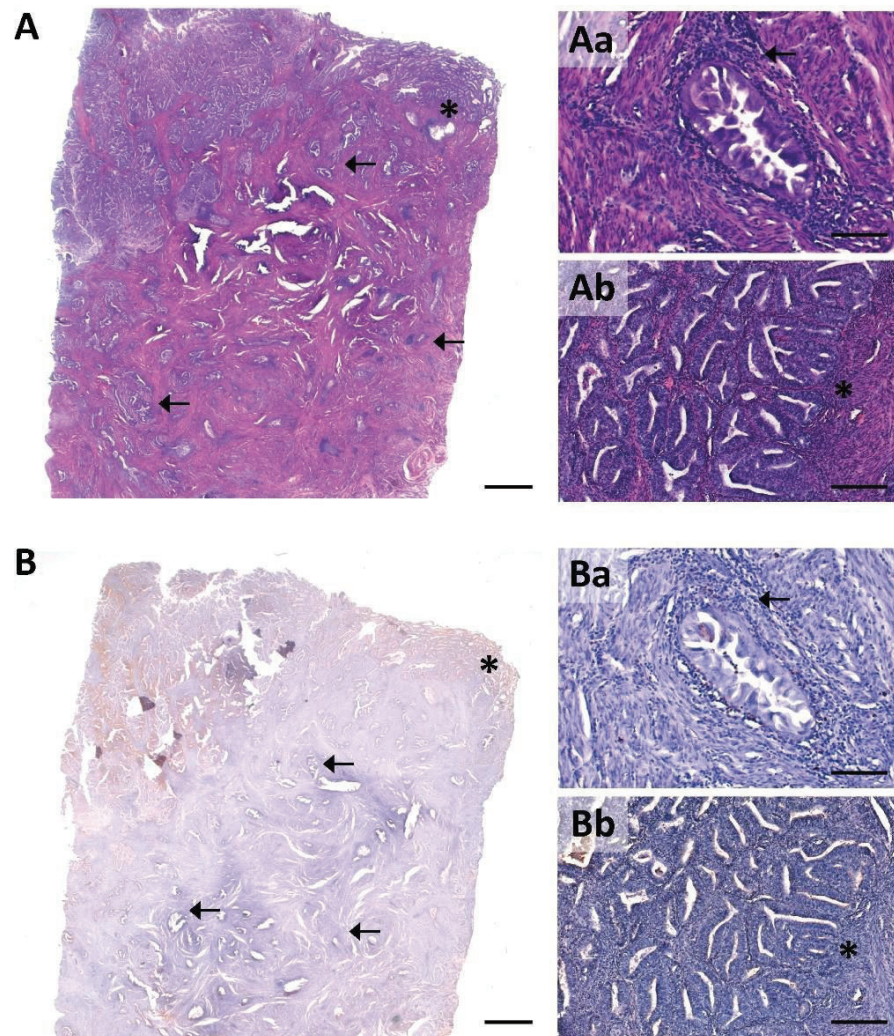
hand, we confirmed that the myofibroblast marker  $\alpha$ -SMA was absent in stromal cells of non-invasive ECs, except in pericytes (Figure 3C,D). In contrast, 89.3% of invasive tumors did not present NTPDase2 label in the stroma near or in the myometrium (Figure 3E,F). The other 10.7% of cases had 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 en-wrapping 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 (E; \* 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.

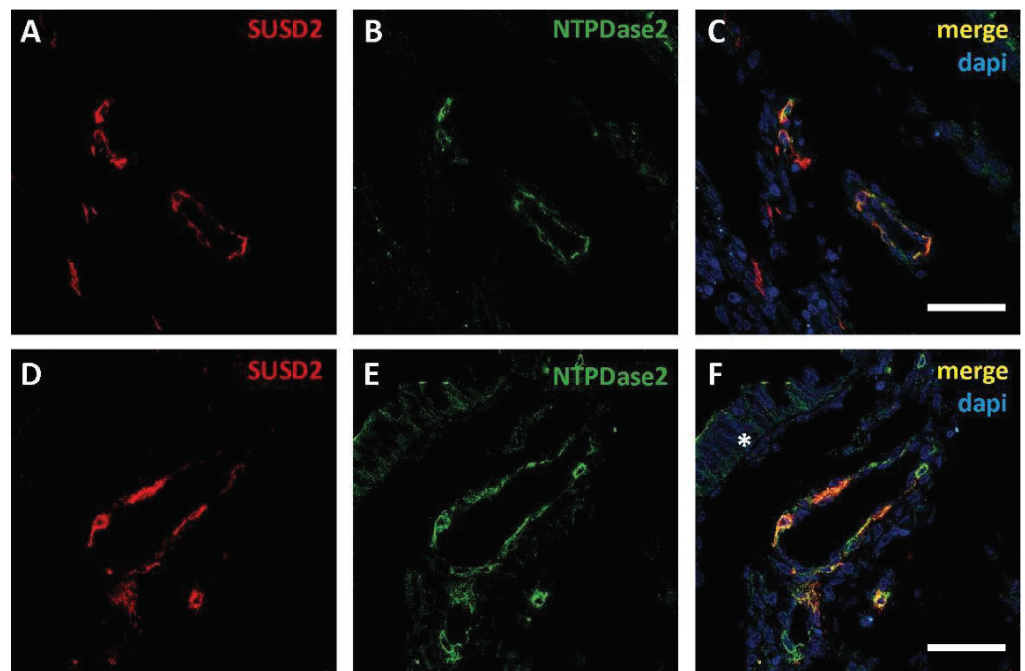
Desmoplasia, frequently reported in invasive endometrial cancer and often presenting abundant inflammatory infiltrate, was observed in the 43 invasive EC tumors studied here. In these tumors, NTPDase2 staining was absent (88.4%) or barely detected (11.6%) in desmoplastic stromal cells wrapping the infiltrating 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  $\mu\text{m}$  (**Ab,Bb**) and 100  $\mu\text{m}$  (**Aa,Ba**).

#### 2.1.3. 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).

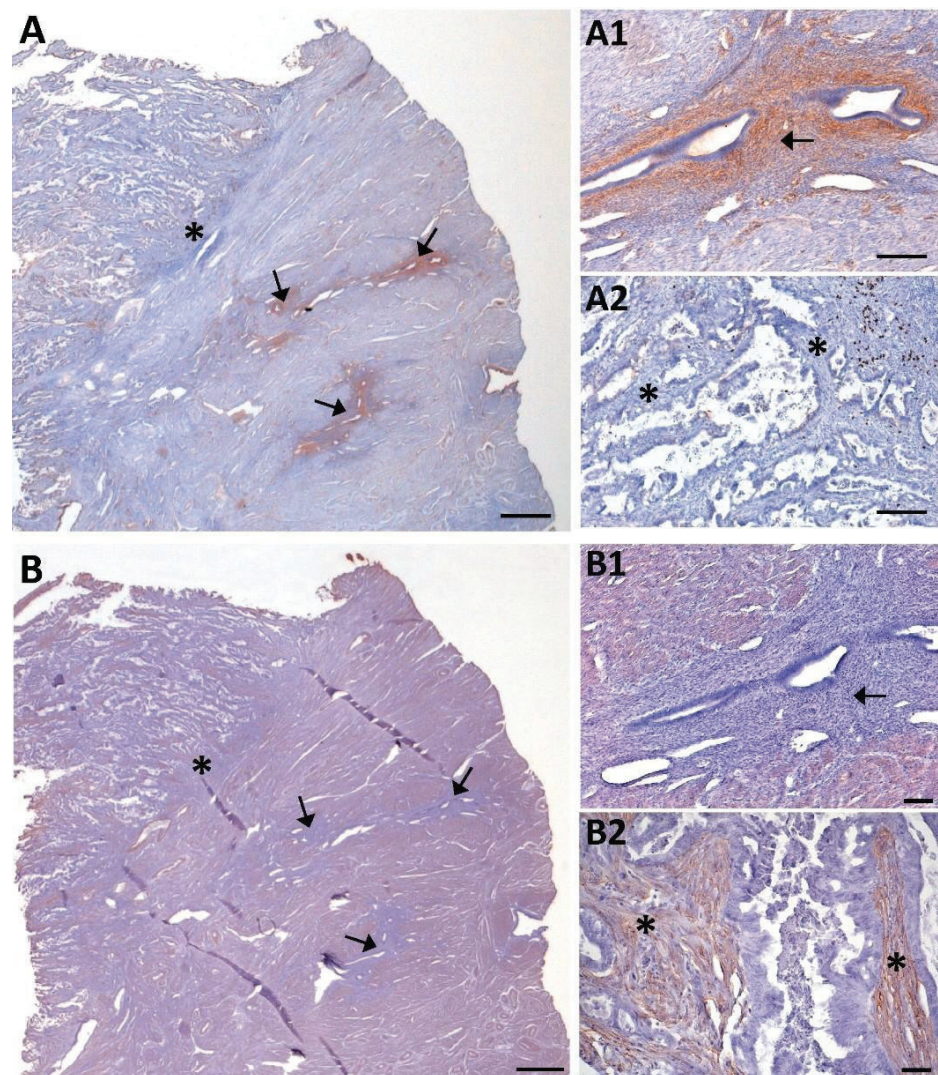


**Figure 5.** Confocal fluorescence images of different zones of a section of an EC sample with antibodies against sushi domain containing 2 (SUSD2, red, **A,D**) and NTPDase2 (green, **B,E**). Merged images (yellow, **C,F**) show the colocalization of SUSD2 with NTPDase2 in cells surrounding blood vessels 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.

#### 2.1.4. 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.



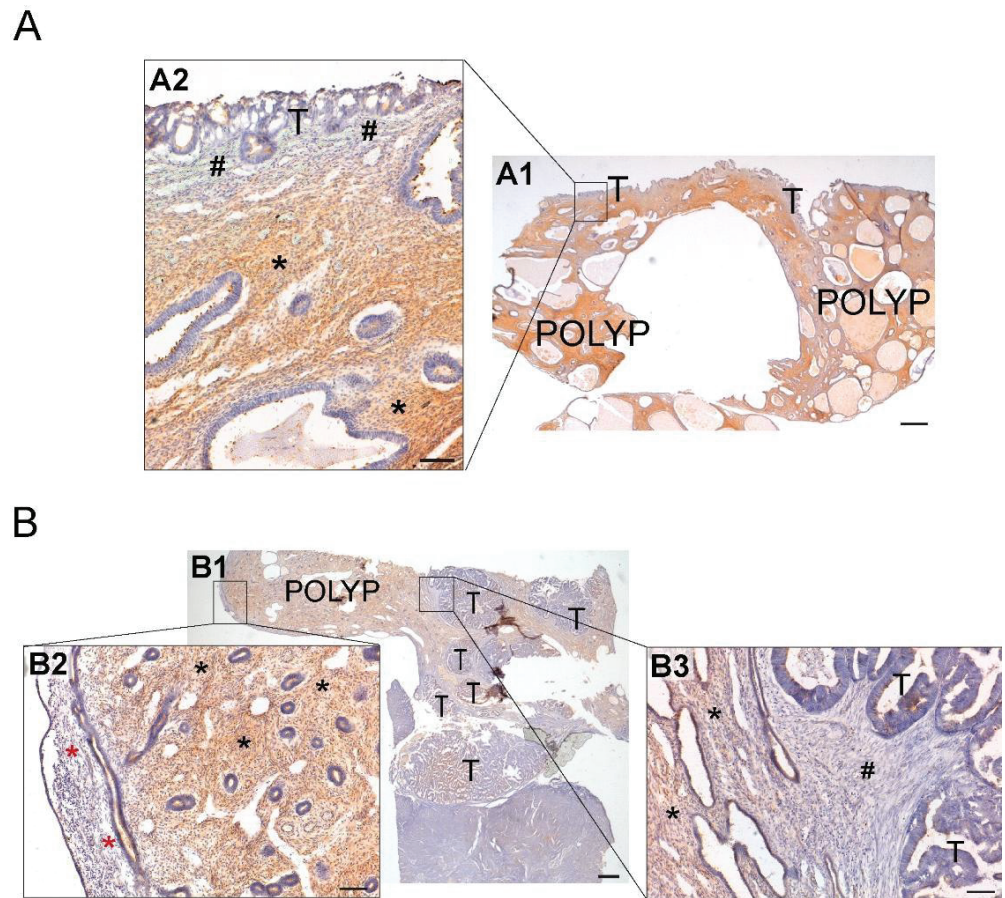
**Figure 6.** NTPDase2 (A) and  $\alpha$ -SMA (B) immunolabeling of consecutive sections of a case of invasive EC coexistent with adenomyotic lesions (arrows). (A1,A2) and (B1,B2) are details of (A) and (B) respectively. Adenomyosis in the myometrium appeared as non-pathologic endometrial glands surrounded 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 basalis 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  $\mu$ m (A2,B2,B3). T: tumor cells; POLYP: endometrial polyp.

#### 2.1.5. 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.

### 3. 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 *in vivo* tumorigenesis [56,57]. Further studies are needed to elucidate the precise role of NTPDase2 in EC progression and invasiveness.

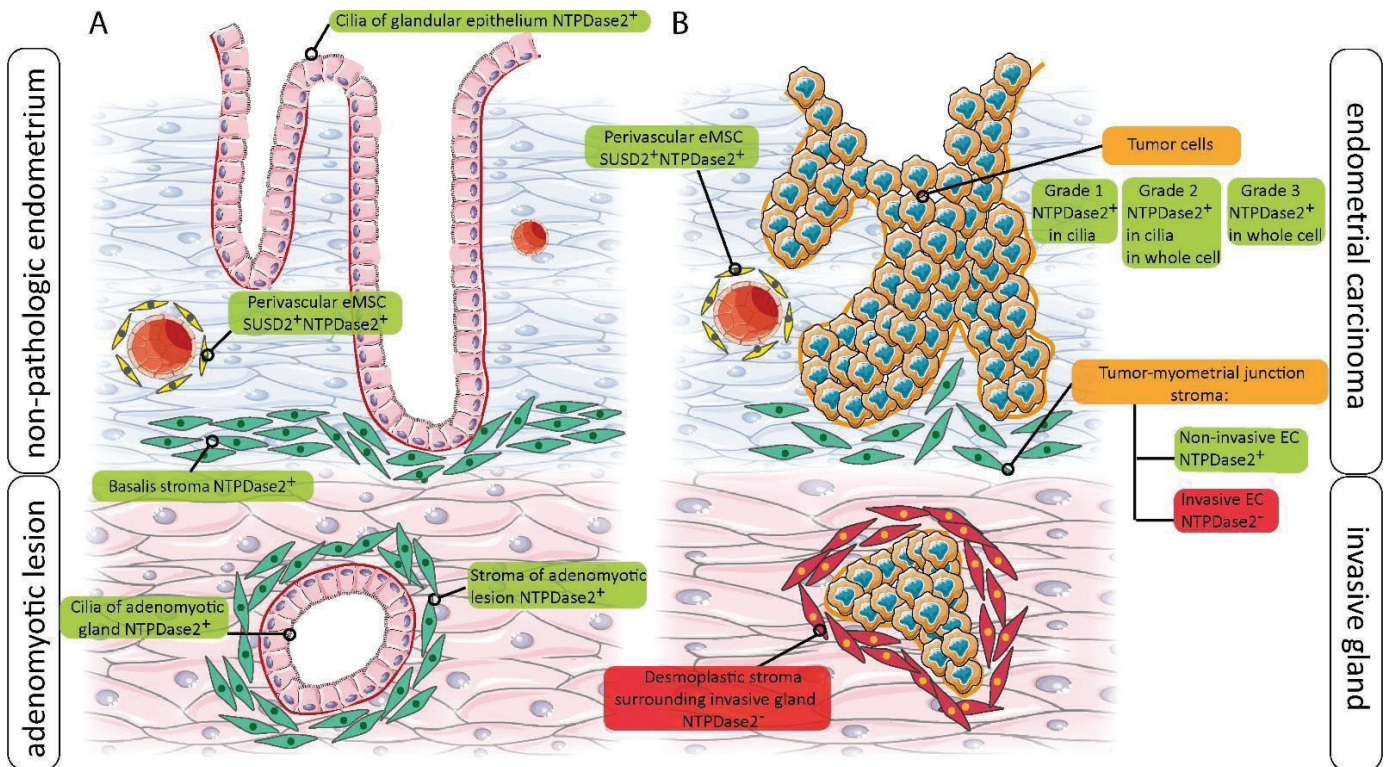
Our results point to the usefulness of NTPDase2 as a marker of tumor invasion in EC, especially in cases in which EC coexists with other endometrial disorders, such as adenomyosis, which occasionally hampers the assessment of parameters of tumor invasion [58]. When a myometrial invasion statement might 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).

#### 4. 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<sup>+</sup> stroma, and invasive, desmoplastic NTPDase2<sup>-</sup> stroma. Adenomyosis foci and endometrial polyps are also clearly NTPDase2<sup>+</sup>. 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<sup>+</sup>/NTPDase2<sup>+</sup> 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 Cancer; 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 Cancer).

**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.

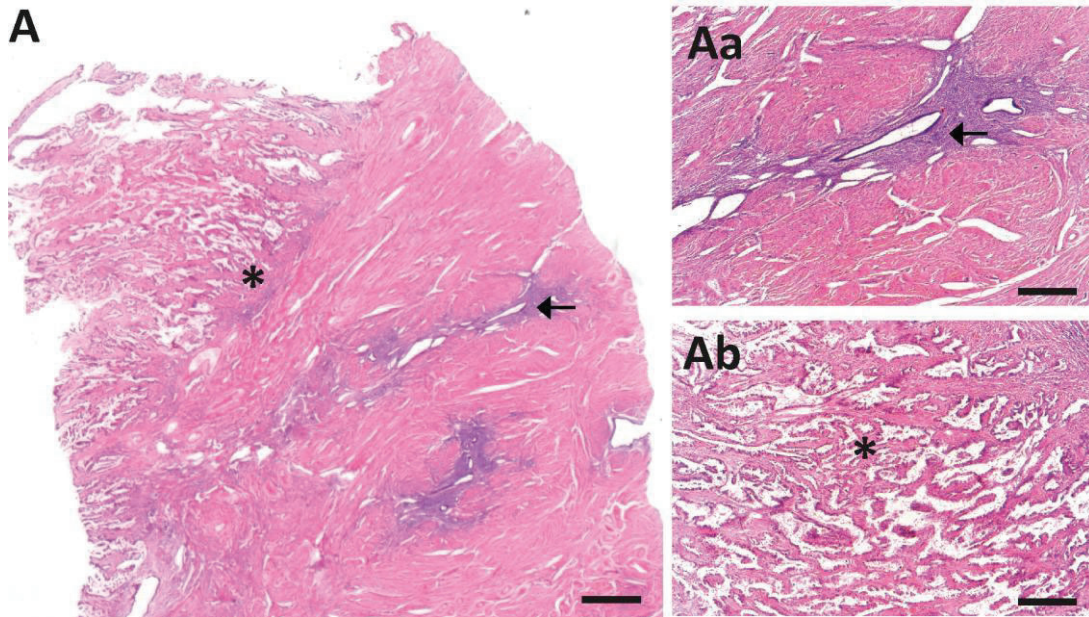
## References

- 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](#)]
- Tempest, N.; Maclean, A.; Hapangama, D.K. Endometrial Stem Cell Markers: Current Concepts and Unresolved Questions. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3240. [[CrossRef](#)]
- Chan, R.W.; Schwab, K.E.; Gargett, C.E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.* **2004**, *70*, 1738–1750. [[CrossRef](#)]
- 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](#)]
- 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](#)]
- Burnstock, G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2016**, *371*, 20150422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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](#)]
- 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](#)] [[PubMed](#)]
- 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](#)]

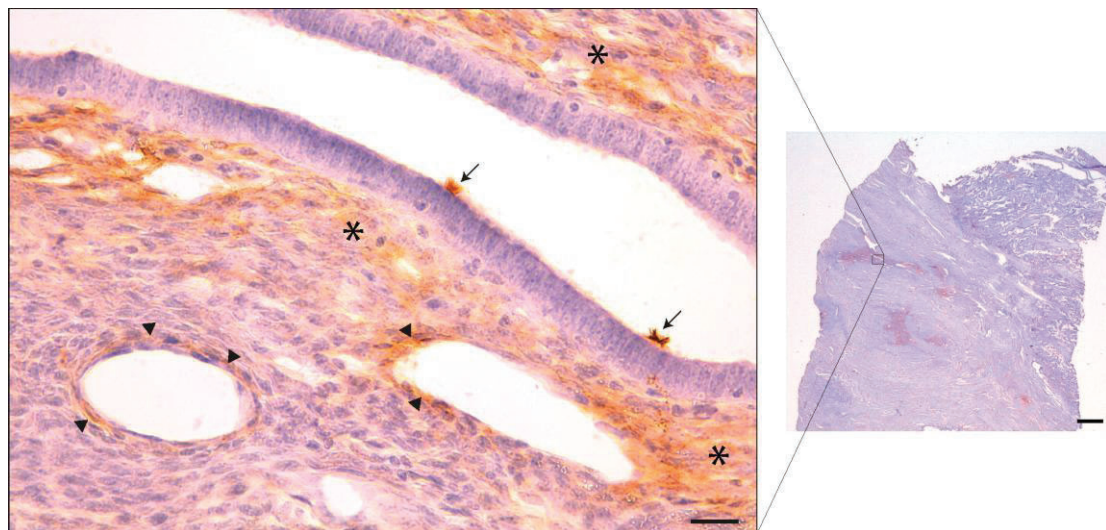
10. Scarfi, S. Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J. Stem Cells* **2014**, *6*, 153–162. [[CrossRef](#)]
11. Roszek, K.; Wujak, M. How to influence the mesenchymal stem cells fate? Emerging role of ectoenzymes 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.; Llaurodo, 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.; Broaddus, 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.; Seigny, 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.; Seigny, 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. Gatiás, 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.; Taylor, 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.; Mendrinou, 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](#)]



**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).



**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).

# CAPÍTULO 3

Implicación de la ectonucleotidasa NTPDasa3 en la proliferación y migración celulares en el cáncer de endometrio: análisis histopatológico, celular y molecular





## 1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo, hemos investigado el patrón de expresión de NTPDasa3 en los tumores primarios de endometrio analizados en el Capítulo 1. En el endometrio no tumoral, la expresión de la NTPDasa3 se limita al epitelio luminal y glandular donde los niveles se ven afectados por las hormonas y fluctúan con el ciclo menstrual (Aliagas et al. 2013). La pérdida de expresión de esta proteína con el grado tumoral, la convierte en una interesante diana de análisis. Para este estudio hemos generado un modelo celular, mediante sobreexpresión de esta proteína, y caracterizado su influencia en la proliferación, migración e invasión celulares, a nivel fenotípico y de expresión génica y proteica. Asimismo, hemos estudiado estas células en un modelo de tumorigénesis en ratón.

Los resultados que presentamos en este capítulo indican que NTPDasa3 es un mediador, implicado en el control de la proliferación y de la migración celulares, así como del crecimiento tumoral. Su expresión más alta se relaciona con un mejor pronóstico. Estos resultados proporcionan la base para la exploración de NTPDasa3 como una posible nueva diana terapéutica en el cáncer de endometrio.

Los objetivos marcados para este Capítulo son:

Determinar la expresión de la NTPDasa3 en los diferentes tumores de endometrio.

Estudiar parámetros clínico-patológicos respecto a los niveles de expresión génicos de *ENTPD3*.

Estudiar las consecuencias de la sobreexpresión de NTPDasa3 en un modelo celular.

Estudiar las consecuencias de la sobreexpresión de NTPDasa3 en un modelo animal de tumorigénesis.

Los resultados que se incluyen en este capítulo están en proceso de redacción como manuscrito principal para su publicación derivado de esta Tesis.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Tejido tumoral

El estudio del tejido tumoral se desarrolló siguiendo los protocolos detallados en el Capítulo 1 y usados también en el Capítulo 2.

### 2.2 Cultivos celulares

Se usó la línea celular de cáncer de endometrio ARK-2 (USPC-ARK-2; RRID:CVCL-IV73), una línea celular tumoral obtenida de una paciente afectada de cáncer endometrial seroso en estadio IV, de 63 años. La línea celular ha sido descrita y cedida por el Prof. Alessandro D. Santin de la Universidad de Yale. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> en un medio DMEM/F12 (Gibco, Paisley, RU) suplementado con L-glutamina, 15mM Hepes, 10 % de suero bovino fetal (FBS del inglés *Fetal Bovine Serum*; Gibco) y un 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU). Las células transfectadas se mantuvieron en el mismo medio, pero suplementado con 500µg/mL del antibiótico geneticina (Gibco). Los organoides, cultivos en tres dimensiones, se mantuvieron en medio DMEM/F12 (Gibco), suplementado con 1mM de HEPES, 1mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich), 1 % P/S y un 1 % de amfotericina B (Gibco).

### 2.3 Tratamientos con ATP

Para los ensayos en presencia de ATP (Sigma-Aldrich), este se diluyó en el medio de cultivo seleccionado a una concentración final de 0.5mM y se incubó durante 24 horas.

### 2.4 Modelo de tumorigénesis en ratones

Los tumores xenoinjertados derivados de cultivos de células ARK-2 se generaron en ratones hembra inmunodeficientes de doce semanas de edad de fenotipo SCID hr/hr, con un peso aproximado de 20-25 g. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos y se manipularon acorde a la Ley 5/1995 y el Acto 214/1997 de la Comunidad Autónoma de Cataluña (Generalitat de Catalunya) y la Directiva de la Unión

Europea EEC 63/2010. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación con Animales de la Universidad de Lleida, donde se realizaron los experimentos.

Las células ARK-2 transfectadas (GFP y GFP-NTPDasa3) se inyectaron subcutáneamente en los ratones a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  células/100 $\mu$ L de PBS mezcladas con Matrigel (1:1) en cada costado del animal. Se permitió el crecimiento tumoral durante 19 días y se midió el tamaño tres veces por semana utilizando un calibrador. El tamaño tumoral se calculó usando la formula  $(D \times d^2)/2 = \text{mm}^3$ .

## 2.5 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este capítulo están resumidos en la Tabla C3-1.

Anticuerpo	Clon/nombre	Huésped	IHQ	WB	IF	CF
Anti-NTPDasa3	B3S10	Ratón	1:500	1:500	1:500	1:50
Anti-E-cadherina	36 / E-cadherin	Ratón	nt	1:1000	nt	nt
Anti-N-cadherina	32 / N-cadherin	Ratón	nt	1:1000	nt	nt
Vimentina	3B4	Ratón	nt	1:100	nt	nt
FGFR2	OTI5C5	Ratón	nt	1:1000	1:100	nt
ITG $\beta$ 2	poli	Conejo	nt	1:1000	1:100	nt
ITG $\beta$ 3	poli	Conejo	nt	1:500	1:100	nt
MMP2	poli	Conejo	nt	1:1000	nt	nt
MMP14	poli	Conejo	nt	1:2000	1:100	nt
AKT	poli	Conejo	nt	1:1000	nt	nt
phosphoAKT (Ser473)	poli	Conejo	nt	1:2000	nt	nt
phosphoAKY (Thr308)	poli	Conejo	nt	1:2000	nt	nt
FLOT-1	18 / FLOT1	Ratón	nt	1:1000	nt	nt
$\beta$ -actina	poli	Conejo	nt	1:5000	nt	nt
Anti-Ratón	HRP	Conejo	-	-	-	nt
Anti-Ratón	Alexa Fluor 555	Cabra	-	-	1:500	1:500
Anti-Ratón	Alexa Fluor 647	Cabra	-	-	1:500	1:500

Tabla C3.1. Listado de los anticuerpos primarios y secundarios usados en los experimentos de inmunohistoquímica (IHQ), western blot (WB), inmunofluorescencia (IF) y citometría de flujo (CF). Se especifica el clon, el huésped, y la dilución utilizada. nt: no testado.

## 2.6 Inmunohistoquímica

Los experimentos de inmunohistoquímica se realizaron siguiendo el protocolo detallado en el Capítulo 1.

## 2.7 Análisis estadístico

La ausencia o presencia de proteína y el grado y la clasificación histológica de los tumores se describieron mediante tablas con recuentos y porcentajes. Se han utilizado modelos logarítmicos binomiales para evaluar la asociación entre proteína y tipo tumoral. Se han validado las condiciones de aplicación de los modelos y se han evaluado los intervalos de confianza al 95 % siempre que ha sido posible. Todo el análisis se ha realizado con el paquete estadístico R versión 3.5.3 (2019-03-11) para Windows.

## 2.8 Generación del vector de expresión que contiene el ADNc GFP-NTPDasa3

El ADNc de *ENTPD3* humano fue subclonado en el vector de expresión pEGFPC1 a partir de la secuencia obtenida del vector original generado en el laboratorio del Prof. Sévigny. Se utilizó la pareja de cebadores: *forward* 5' TCTCTCGAGAGATGTTCACTGTGCTGACCCGCCAAC 3' y *reverse* 5' TCTGTCGACGCGAATCCACTGCATGGTCAA 3', que contienen lugar de restricción *XhoI* y *Sall*, respectivamente para la digestión y subclonaje dirigido en el vector pEGFPC1. Los clones obtenidos se verificaron mediante restricción enzimática y se secuenciaron.

## 2.9 Transfección celular y obtención de clones estables

Las células ARK-2 se transfectaron mediante Lipofectamina (Lipofectamine 2000 Reagent; Invitrogen) con el plásmido pEGFPC1-ENTPD3 o del plásmido pEGFPC1 sin inserto, como control, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se obtuvieron clones estables mediante tecnología FACS (del inglés *fluorescent-activated cell sorting*) con el citómetro de flujo con separador celular MoFlo Astrios Cell Sorter (Beckman-Coulter, Brea, CA, EEUU). Las células positivas para GFP se separaron en pocillos de placas de 96 pocillos donde crecieron hasta la obtención de clones.

## 2.10 Obtención de homogenados celulares

$1 \times 10^6$  células ARK-2 transfectadas se plantaron en placas de  $10\text{cm}^2$  y se incubaron durante toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Las placas confluentes se lavaron dos veces con 10mL de una solución fría que contenía 15mM de

Tris pH 7.5 y 145mM de NaCl en agua, y posteriormente las células se lisaron con 200µL de una solución de RIPA (del inglés *radio immuno precipitation assay*) suplementada con un cóctel inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, los lisados se sonicaron y se centrifugaron a 14.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes generados se recogieron. La concentración proteica se determinó usando el método de Lowry et al. (Lowry et al. 1951) usando el Kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific).

#### 2.11 Obtención de homogenados celulares enriquecidos en membrana

1 x 10<sup>6</sup> células ARK-2 transfectadas se plantaron en placas de 10cm<sup>2</sup> y se incubaron durante toda la noche a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las placas confluentes se lavaron dos veces con 10mL de una solución fría que contenía 15mM de Tris pH 7.5, 145mM de cloruro de sodio y 0.005 % de Tritón X100 en agua, y posteriormente las células se lisaron con 200µL de la misma solución suplementada con un cóctel inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, los lisados se sonicaron y se centrifugaron a 800 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes generados se centrifugaron a 50.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y los pellets resultantes se diluyeron en la misma solución antes mencionada. La concentración proteica se determinó usando el método de Lowry et al. (Lowry et al. 1951) usando el Kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific).

#### 2.12 Western blot

Los cultivos ARK-2 transfectados se evaluaron para la expresión de GFP-NTPDasa3 en lisados celulares enriquecidos en membrana, para proteínas de transición epitelio-mesénquima y para proteínas relacionadas con proliferación y migración celulares mediante ensayos de Western blot en lisados celulares totales. Se cargaron 30µg de proteína en cada carril de un gel de acrilamida al 30 % (Acrylamide-bis; BioRad) bajo condiciones no reductoras, que fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) por *electroblotting* a 100 voltios durante 1 hora. Posteriormente, las membranas se bloquearon con una solución que contenía 2.5 % de leche desnatada en

polvo, 1 % de BSA y 0.1 % de Tween20 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces las membranas se incubaron con el adecuado anticuerpo primario (ver sección 3.5 Anticuerpos) en una solución que contenía 0.5 % de leche desnatada en polvo, 0.1 % de BSA y 0.1 % de Tween20 en PBS a 4°C durante toda la noche. Después de tres lavados, las membranas se incubaron con el adecuado anticuerpo secundario (ver sección 3.5 Anticuerpos) diluido en la misma solución que los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia usando el sustrato Luminata Crescendo Western HRP substrate (Merck Millipore, Burlington, MA, EEUU) y el aparato Amersham Imager 600 system (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU).

### 2.13 Inmunofluorescencia

$3 \times 10^4$  células ARK-2 transfectadas se plantaron en cubreobjetos de 12mm de diámetro cubiertos con una capa de poli-L-lisina en placas de 24 pocillos hasta la confluencia celular. Los cubreobjetos entonces se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 3.5 % paraformaldehído diluido en PBS durante 7 minutos a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron incubando con 0.2 % de saponina (Merck) diluida en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y después de realizó un bloqueo de las uniones inespecíficas incubando durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución que contenía 20 % de suero normal de cabra (NGS del inglés *normal goat serum*), 0.2 % de Tritón y 0.2 % de gelatina diluido en PBS. El anticuerpo primario ratón anti-NTPDasa3 se incubó durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS, el cubreobjetos se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón marcado fluorescentemente durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron tres veces en PBS y para la tinción nuclear se usó un medio de montaje acuoso con DAPI (ProLong Gold Antifade reagent with DAPI, Life Technologies, Paisley, RU). Las muestras se observaron y se fotografiaron bajo un microscopio confocal Zeiss LSM 800 confocal Laser Scanning Microscope (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las imágenes resultantes se procesaron con el software ZEN 2.3 SP1 (Zeiss).

## 2.14 Ensayos de proliferación celular

La proliferación celular de los cultivos ARK-2 transfectados se evaluó usando el kit iClick EdU Andy Fluor 555 Imaging (GeneCopoeia, Rockville, MD, EEUU). Este método está basado en la visualización fluorescente de las nuevas hebras de ADN sintetizadas cuando el análogo de la timidina EdU se incorpora en las células en proliferación y se marcan con un fluorescente altamente específico. Brevemente, se plantaron  $3 \times 10^4$  de células ARK-2 en cubreobjetos de 12mm de diámetro cubiertos con una capa de poli-L-lisina en placas de 24 pocillos. El día siguiente,  $10\mu\text{M}$  de la solución EdU en medio completo se añadió a cada pocillo y se incubó durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Los cubreobjetos se fijaron con 3.7 % de paraformaldehído en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y lavados dos veces con 3 % de BSA en PBS. Después se realizó un paso de permeabilización celular, donde se incubaron los cubreobjetos con 0.5 % de Tritón en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente antes del marcaje fluorescente siguiendo el protocolo marcado por la casa comercial. Los núcleos se tiñeron con  $5\mu\text{g}/\text{mL}$  de Hoechst 33342 durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente los cubreobjetos se montaron con medio de montaje acuoso (Fluoromount mounting médium, Sigma-Aldrich). Los resultados se observaron y se fotografiaron bajo un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 (Nikon, Japón).

## 2.15 Ensayos de migración e invasión celular

La migración y la invasión celular se evaluaron usando cámaras de Boyden con el kit CytoSelect Cell Migration and Invasion Assay (Cell Biolabs, San diego, CA, EEUU), respectivamente. Brevemente, este método se basa en la capacidad de las células vivas en migrar por una membrana de policarbonato que contiene poros de  $8\mu\text{m}$  de diámetro para la migración celular, o en invadir en la misma membrana cubierta con una solución de membrana basal. Primeramente, las membranas de las cámaras de boyden se hidrataron mediante la incubación de las membranas con medio libre de suero durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . El medio de hidratación se descartó y  $1.5 \times 10^5$  de células ARK-2 se plantaron en la cámara superior en medio libre de suero. Como medio quimioatrayente, las cámaras inferiores se llenaron con medio suplementado con 10 % de FBS. Después de 24 horas, las células remanentes en la cámara superior se retiraron con un



bastoncillo de algodón mojado y las cámaras de boyden se tiñeron siguiendo el protocolo de la casa comercial. Las cámaras fueron visualizadas y fotografiadas bajo un microscopio óptico Leica DMD 108 (Leica). Las cámaras además se destiñeron siguiendo el protocolo de la casa comercial y se midió la absorbancia en una longitud de onda de 660nm.

#### 2.16 Formación de colonias

La habilidad de los cultivos ARK-2 para generar colonias se evaluó incubando 400 células por pocillo en placas de 12 pocillos durante 5-7 días. Las colonias visibles formadas se lavaron dos veces en PBS, se fijaron con 3.5 % de paraformaldehído durante 15 minutos y se tiñeron con 0.1 % de violeta cristal durante 15 minutos. Para finalizar, se realizó un lavado con agua para remover el exceso de violeta cristal. Las colonias se fotografiaron usando un microscopio estereoscópico Carl Zeiss SteREO Lumar V12 (Zeiss) y contados y medidos usando el software Image J (National Institutes of Health-NIH, Bethesda, MD, EEUU).

#### 2.17 Obtención de organoides en tres dimensiones derivados de células de cáncer de endometrio

Los organoides en tres dimensiones derivados de los cultivos ARK-2 se generaron para realizar experimentos de crecimiento celular. Primeramente, se creó una cama de Matrigel expandiendo con cuidado con una punta amarilla 10 $\mu$ L de Matrigel (Matrigel Growth Factor Reduced, Phenol Red free; Corning, NY, EEUU) por pocillo en placas de 96 pocillos para microscopia (Cell Culture Microplate, 96 well, PS, F-bottom (chimney well),  $\mu$ Clear, black; Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Después se realizó una suspensión celular a una concentración de 2000 células por 100 $\mu$ L de Medio Basal (ver sección 3.2 Cultivo celular). La suspensión celular se mezcló con 3 % de Matrigel y 2 % de suero bovino fetal cubierto con carbón-dextrán (DCC-FBS del inglés *dextran-charcoal-coated fetal bovine serum*; Gibco) y 100 $\mu$ L de esta mezcla se añadió por pocillo. Los organoides se dejaron en el incubador durante 5-7 días sin cambiar el medio y fijados con 4 % de paraformaldehído frío diluido en PBS durante 10 minutos. Los organoides se mantuvieron en la nevera a 4°C hasta su uso.

Para la visualización y la determinación del tamaño, las placas se incubaron con faloidina marcada fluorescentemente (Phalloidin iFluor-555; AbCam, Cambridge, RU) durante toda la noche a 4°C después de un bloqueo de las uniones inespecíficas con una solución que contenía 20 % de NGS, 0.2 % de Tritón y 0.2 % de gelatina diluido en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los organoides se visualizaron y fotografiaron bajo un microscopio confocal Zeiss LSM 880 Confocal Laser Scanning (Zeiss).

#### 2.18 Estudio de la apoptosis celular mediante Anexina-V

La apoptosis en los cultivos ARK-2 se evaluó usando el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection (ThermoFisher Scientific) para citometría de flujo. Esta técnica permite detectar las células apoptóticas por unión de la anexina-V a los residuos de fosfatidilserina expuestos en el espacio extracelular en las células en apoptosis. La muerte celular no apoptótica fue determinada por marcaje con yoduro de propidio. Brevemente,  $1 \times 10^6$  células ARK-2 se plantaron en placas de  $10\text{cm}^2$  de diámetro y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas a una concentración de  $2 \times 10^6$  células por mL en tampón de unión siguiendo el protocolo de la casa comercial. 5µL de anexina V marcada con FITC se añadieron a la suspensión celular y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en un rotador. Después de un lavado con tampón de unión, las células se resuspendieron en 400µL de tampón de unión y 5µL de yoduro de propidio se añadió a la suspensión. Las células se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el aparato FACS Canto II (Beckman Coulter). Las células se mantuvieron en oscuridad a 2-8°C.

#### 2.19 Análisis de la expresión génica *in silico* a partir del TCGA

Los datos utilizados para los análisis *in silico* corresponden a la base de datos de cáncer endometrial de cuerpo uterino (TCGA-UCEC) extraídos del Atlas del Genoma del Cáncer o TCGA (del inglés *The Cancer Genome Atlas*) a través de cBioPortal para *Cancer Genomics* (<http://cbioportal.org>). Se utilizaron un total de 527 muestras con datos clínicos y de expresión integrados. Los datos de expresión génica se descargaron como valores de fragmentos normalizados por kilobase de exón por millón de fragmentos

---

mapeados (FPKM) y transformados en Log2. Los grupos se compararon mediante el test one-way ANOVA. El análisis de la supervivencia se realizó con el paquete R *survmine* (creado por Alboukadel Kassambara). Para las curvas de supervivencia global (OS) y supervivencia libre de progresión/supervivencia libre de enfermedad (PFS/DFS), los valores medios se utilizaron como punto de corte para los grupos 'alta' y 'baja' expresión. Los resultados se muestran como gráficos de curvas de Kaplan-Meier y se utilizó la prueba Log-rank para la comparación de las curvas de supervivencia.

## 2.20 Extracción de ARN total y análisis de matrices de expresión génica

Los análisis de transcritos derivados de las vías de señalización relacionadas con proliferación y migración celular se evaluaron mediante ARN total aislado de cultivos ARK-2 usando el sistema Human Cell Proliferation and Human Cell Motility qPCR SignArray 384 (*gene profiling analysis* Human qPCR signArrats 384 kits; AnyGenes, Paris, Francia). De modo general, se ha evaluado la presencia de 125 genes relacionados con proliferación y con motilidad celular mediante tecnología PCR a tiempo real (RT-PCR del inglés *real-time polymerase chain reaction*). Para el aislamiento del ARN total,  $1 \times 10^6$  células ARK-2 se plantaron en placas de  $10\text{cm}^2$  de diámetro y se incubaron durante toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ . Las células en confluencia fueron tripsinizadas y el ARN total se extrajo usando el kit RNeasy Plus Mini (QIAGEN) y posteriormente comprobado en un gel de agarosa al 1 %. La cantidad y la pureza del ARN se midió usando el aparato Nanodrop One (ThermoFisher Scientific). Para cada muestra, el ADNc se sintetizó usando  $2\mu\text{g}$  de ARN total usando el kit StaRT Reverse Transcription en los laboratorios AnyGenes (París, Francia). Todas las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en el aparato Light Cycler 480 (Roche) con la sonda 2X Perfect Master Mix SYBR Green (AnyGenes). La expresión del ARN mensajero para cada gen a evaluar se normalizó usando la media de los valores Cp para los 8 genes de control más estables (PPIA, ACTB, TBP, B2M, RPLP0, HPRT1, TFRC y GUSB) y definidos por valores  $2(-dCp) \times 10000$ . La variación de los valores de expresión génica también se calculó.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Distribución tisular de NTPDasa3 en los diferentes tipos de cáncer de endometrio

La expresión de NTPDasa3 se estudió mediante inmunohistoquímica en los diferentes tipos de tumores de endometrio. Observamos que la expresión de NTPDasa3 en los tumores se limita al componente epitelial, y que su expresión disminuye al aumentar el grado del tumor (Figura 1A). No se detectó expresión de NTPDasa3 en el estroma en ninguno de los tumores estudiados, coincidiendo con los hallazgos en el endometrio no tumoral. La actividad ATPásica atribuible, en parte, a NTPDasa3 también se detectó disminuida en los tumores de alto grado en relación a los de bajo grado (Figura 1B).

Los cambios de expresión atendiendo al grado tumoral fueron significativos ( $p$  0,018), independientemente de la clasificación histológica (Figura 1C). La clasificación basada en la tipología molecular también muestra diferencias significativas ( $p$  0,049) en la expresión de la NTPDasa3, así, los tumores POLE y CNH-SL expresan menos NTPDasa3 que los MSI y CNLH (Figura 1D).

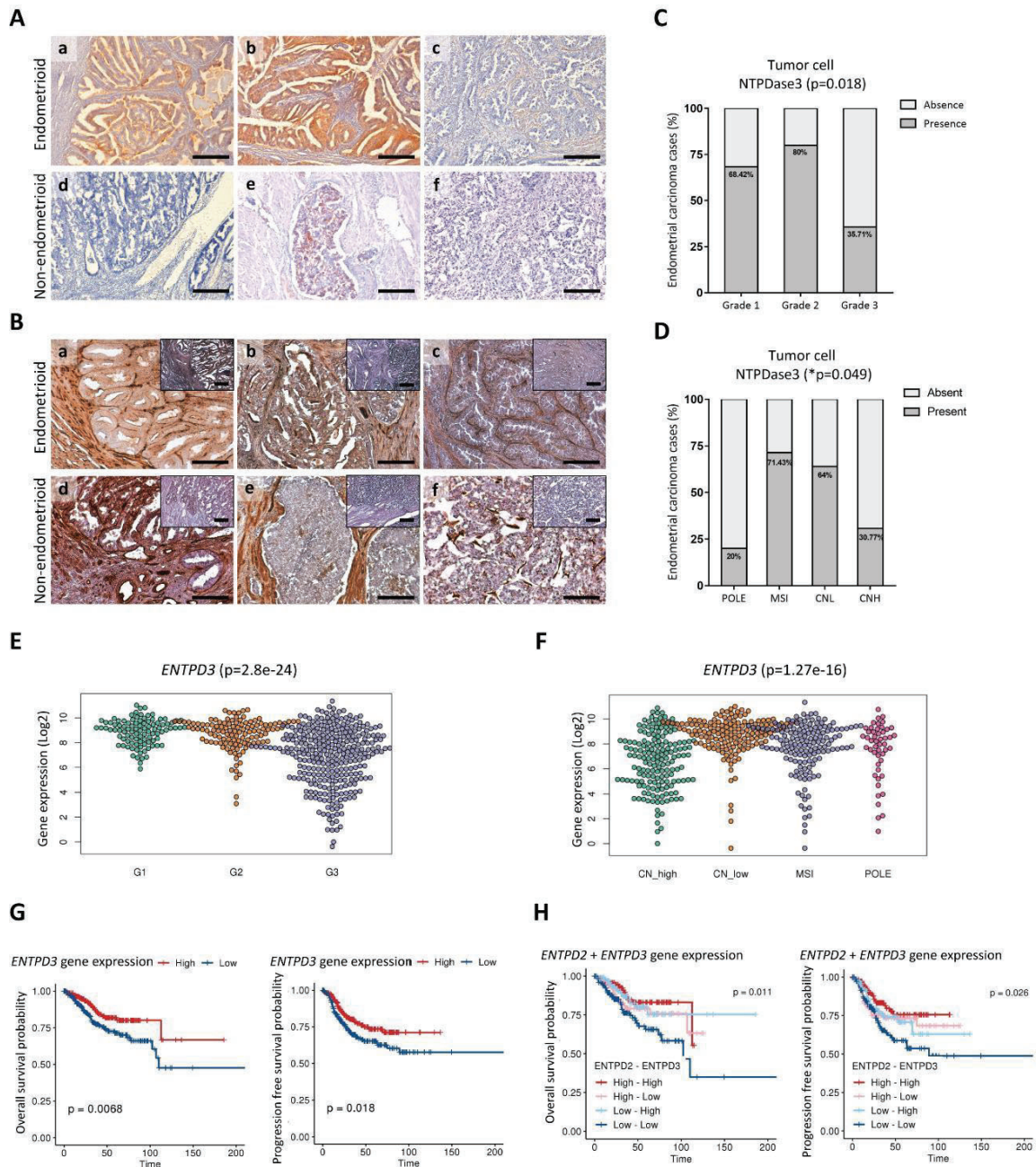


Figure 1. A, B Inmunohistoquímica anti-NTPDasa3 (A) y actividad ATPásica *in situ* (B) en seis carcinomas de endometrio humano calcificados según la tipología histológica. Se observa que la expresión de la NTPDasa3 se confina exclusivamente a las células tumorales (Aa-f). Los tumores endometrioides de bajo grado muestran alta expresión de NTPDasa3 (Aa-b) pero se pierde en tumores endometrioides de alto grado y no endometrioides (Ac-f). El ATP se incubó a una concentración de 1mM durante 1 hora y la reacción se reveló durante 1 minuto. En las células tumorales epiteliales se observa una disminución generalizada en la cantidad de ATP hidrolizado en los tumores endometrioides de alto grado (Bc) y no endometrioides (Bd-f), aunque hay que tener en cuenta que otras ectonucleotidasas, como la NTPDasa2 o las NPPs también presentes en los tumores de endometrio, pueden hidrolizar el ATP extracelular. No se detecta actividad ATPásica cuando el ATP no está presente en la reacción (insets en B). C, D Porcentaje de casos de cáncer de endometrio con diferente patrón de expresión de la NTPDasa3 en el epitelio tumoral clasificados por el grado tumoral (C) y los subtipos moleculares (D). Los tumores de bajo grado muestran alta expresión de la NTPDasa3, mientras que los tumores de alto grado (grado 3) pierden la expresión. Los tumores de tipo MSI y CNL muestran alta expresión de NTPDasa3, pero los tumores POLE y CNH, definidos como de alto grado, tienen poca expresión de NTPDasa3. E, F Niveles de expresión génica

extraídos de la cohorte de cancer de endometrio del *Cancer Genome Atlas (TCGA-UCEC)* muestran bajos niveles génicos de *ENTPD3* en los tumores de alto grado (E) y en los de tipo CNH (F). G, H Las curvas de Kaplan-Meier de probabilidad de supervivencia global (OS) y de progresión libre de enfermedad/supervivencia libre de enfermedad (PFS/DFS) se extrajeron de la cohorte antes mencionada en relación a los niveles génicos de *ENTPD3* (E) muestran una mejor prognosis clínica en los carcinomas de endometrio con alta expresión. (F), también se observa una mejor prognosis cuando los tumores tienen altos niveles de ambos *ENTPD2* y *ENTPD3*. Se usaron tests Log-rank para comparar las curvas de supervivencia. Barras: 100  $\mu$ m. Aa y Ba son carcinomas de endometrio de grado 1, Ab y Bb son de grado 2, Ac y Bc son de grado 3, Ad y Bd son adenocarcinomas serosos, Ae y Be son carcinosarcomas uterinos y Af y Bf son carcinomas de célula clara. OS: overall survival; PFS/DFS: progression-free survival/disease-free survival. \* $p < 0,05$ .

#### 4.2 La expresión del gen *ENTPD3* influye en la progresión y en la supervivencia del cáncer de endometrio

Estudiamos el gen *ENTPD3* en una cohorte de pacientes afectadas de cáncer de endometrio a partir de los datos de *The Cancer Genome Atlas-Uterine Corpus Endometrial Carcinoma (TCGA-UCEC)*, según clasificación en función del grado y del tipo molecular. Los resultados coinciden con los hallados en tejido mediante IHQ. Los tumores de alto grado presentan expresión disminuida de *ENTPD3* respecto de los tumores de bajo grado (Figura 1E). En cuanto a la clasificación molecular, se observó una menor expresión génica en aquellos tumores de tipo POLE y CNH-serous like, coincidiendo también con el inmunomarcaje en tejido tumoral (Figura 1F). Por lo tanto, la expresión génica y proteica de esta ectonucleotidasa disminuye con el grado tumoral.

Se analizaron también los datos de la supervivencia global (OS, del inglés *overall survival*) y de la progresión libre de enfermedad/supervivencia libre de enfermedad (PFS, del inglés *progression free survival*) con relación a los niveles de expresión génica de *ENTPD3* en la cohorte anterior. Se establecieron dos grupos diferentes, uno con alta expresión del gen *ENTPD3* (*high*) y el otro con baja expresión de *ENTPD3* (*low*). Los pacientes que pertenecen al grupo *high* tienden a tener mejores tasas de supervivencia y períodos libres de enfermedad más largos que el grupo *low*, que tienen un peor pronóstico ( $p$  0,0068 para OS y  $p$  0,018 para PFS) (Figura 1G). Ya habíamos demostrado que los pacientes con niveles altos de *ENTPD2* tienen mejores tasas de supervivencia y PFS (Capítulo 2), por lo que determinamos estos parámetros utilizando la expresión conjunta de los genes *ENTPD2* y *ENTPD3* en esta misma cohorte. Confirmamos que el

grupo de pacientes con altos niveles génicos de *ENTPD2* y *ENTPD3* tienen una supervivencia más larga y también una *PFS* más alta ( $p$  0,011 para la *OS* y  $p$  0,026 para la *PFS*). Se observó que las pacientes con niveles bajos de ambos genes definen el grupo con peor pronóstico (Figura 1H).

#### 4.3 La sobreexpresión de NTPDasa3 afecta la proliferación y la migración celulares *in vitro*

Las células ARK-2, en las que sobreexpresamos y caracterizamos la proteína de fusión GFP-NTPDasa3 (detallado en el Capítulo 5), se usaron para realizar ensayos funcionales de proliferación, migración e invasión celulares. Para evaluar la tasa de proliferación en las células utilizamos un análogo fluorescente de timidina (EdU) que nos permite identificar el número de células en mitosis en el cultivo celular. Los cultivos con sobreexpresión de GFP-NTPDasa3 mostraron una disminución significativa en la proliferación (Figura 2A). La migración e invasión celulares se evaluaron utilizando cámaras de Boyden. Se detectó más migración en las células ARK-2 que expresan GFP-NTPDasa3 que en las células control (Figura 2I, 2La, Lb). Sin embargo, no se detectó invasión celular en ninguno de los cultivos ni a las 24 h (Figura 2M), ni en tiempos más largos (a 48 h, datos no mostrados).

Realizamos ensayos de formación de colonias para evaluar de forma independiente el crecimiento celular. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el número de colonias generadas (datos no mostrados) o en el tamaño de la colonia entre las células ARK-2 que expresan GFP-NTPDasa3 y las células control (Figura 2D, 2G).

#### 4.4 El ATP extracelular estimula la proliferación y la migración de las células tumorales con sobreexpresión de NTPDasa3

Evaluamos el efecto de la adición de ATP extracelular en la proliferación y migración celulares, incubando las células ARK-2 en presencia de ATP 0,5 mM. Demostramos que el ATP aumenta la proliferación de las células ARK-2 (Figura 2C) y que el aumento es mucho mayor en el caso de las células que sobreexpresan NTPDasa3. El tamaño de las colonias de estas células en presencia de ATP es menor (Figura 2F), pero este fenómeno no se observa para las células control (Figura 2E).

En términos de migración celular, la adición de ATP solo afecta a las células que sobreexpresan NTPDase3, aumentando su migración (Figura 2K, 2Lb).

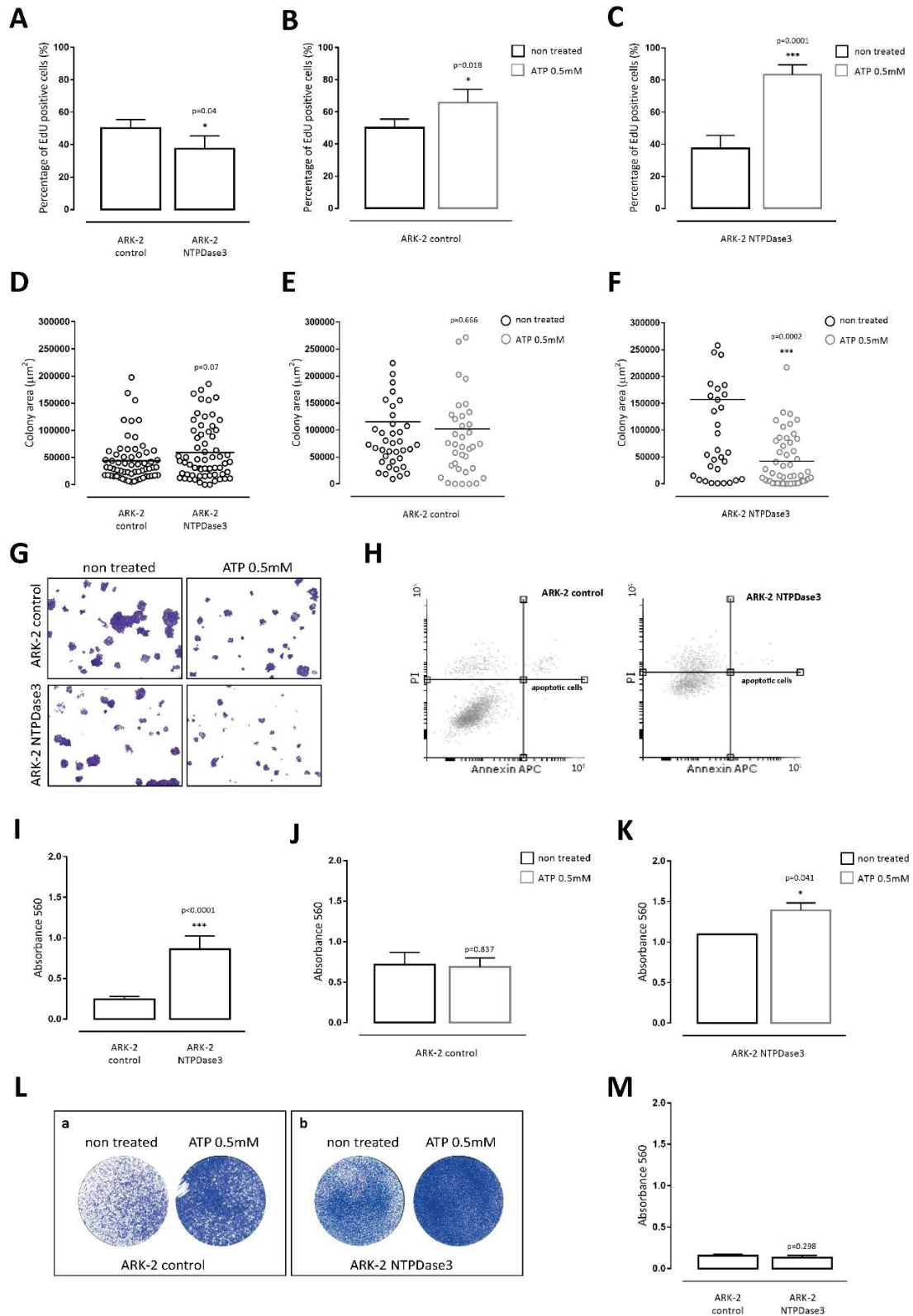




Figura 2. Ensayos de proliferación celular A, B, C realizados en cultivos ARK-2 no transfectados y transfectados con GFP-NTPDasa3. Se observa una disminución significativa en el número de células proliferativas en cultivos de GFP-NTPDasa3 (A). Por el contrario, cuando el ATP está presente en cultivos durante 24 horas a una concentración de 0,5 mM, el número de células proliferativas aumenta significativamente en células ARK-2 no transfectadas (B) y transfectadas con GFP-NTPDasa3 (C). D, E, F, G Ensayos de formación de colonias (CFA) realizados en cultivos de ARK-2 no transfectados y transfectados con GFP-NTPDasa3. El área de las colonias no muestra diferencias entre cultivos no transfectados y GFP-NTPDasa3 (D). Cuando se trata con ATP 0,5 mM durante 24 horas, solo las colonias transfectadas con GFP-NTPDasa3 reducen significativamente su área (F, G), fenómenos no observado en las colonias no transfectadas (E, G). La tinción con anexina-V detectada mediante ensayos de citometría de flujo no muestra diferencias en el número de células ARK-2 apoptóticas no transfectadas y transfectadas con GFP-NTPDasa3. I, J, K, L Ensayo de migración celular realizado en cultivos ARK-2 no transfectados y transfectados con GFP-NTPDasa3 utilizando cámaras de Boyden. Se observa un aumento significativo en la migración celular a las 24 horas en cultivos GFP-NTPDasa3 en comparación con los no transfectados (I, La, Lb). Cuando el ATP está presente en los cultivos a 0,5 mM durante 24 horas, los cultivos transfectados con GFP-NTPDasa3 aumentan la migración celular (Lb, K). Las células no transfectadas no muestran diferencias de migración con el tratamiento con ATP (La, J). Se evaluó la invasión de células a las 24 y 72 horas (datos no mostrados), determinando que no muestran propiedades de invasión.

Los organoides derivados de los cultivos transfectados con GFP-NTPDasa3 son significativamente más pequeños que los organoides control (Figura 3A).

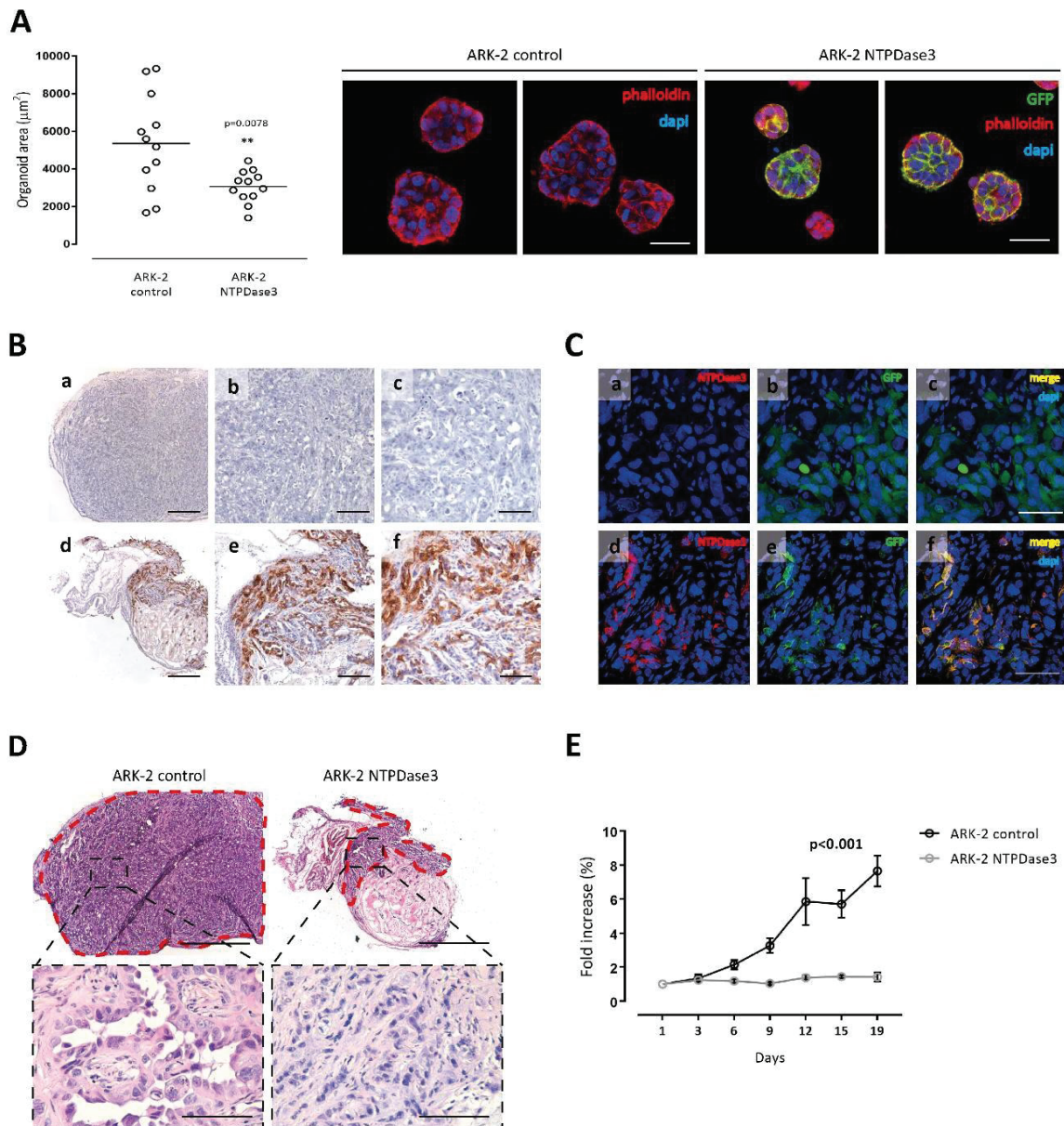


Figura 3. A Imágenes de microscopía confocal de los organoides derivados de los cultivos ARK-2 no transfectados y transfectados con GFP-NTPDasa3. Se determinó el tamaño del organoide mostrando un área disminuida en los transfectados con GFP-NTPDasa3. B, C D Inmunohistoquímica anti-NTPDasa3 (B), microscopía confocal anti-NTPDasa3 (C) y secciones de tejido de hematoxilina y eosina (D) de tumores subcutáneos derivados de cultivos de células ARK-2 no transfectadas y transfectadas con GFP-NTPDasa3. La expresión de NTPDasa3 no se detectó en tumores derivados de cultivos ARK-2 no transfectados (Ba-c, Ca-c). Por el contrario, los tumores derivados de cultivos ARK-2 transfectados con GFP-NTPDasa3 muestran una alta expresión de NTPDasa3 (Bd-f, Cd-f). Los tumores se caracterizaron por presentar un patrón tanto sólido como glandular y las células presentaban un elevado pleomorfismo, núcleos irregulares, nucléolos enormes y una intensa actividad mitótica (D). E El tamaño del tumor se evaluó a los 19 días después de la inyección, mostrando una reducción significativa del tamaño del tumor cuando estaba presente NTPDasa3 en comparación con los tumores no transfectados (E). Barras: 1 mm (imágenes D superiores), 0,5 mm (Ba, Bd), 250  $\mu\text{m}$  (A), 200  $\mu\text{m}$  (Bb, Be) y 100  $\mu\text{m}$  (Bc, Bf, Bc, Bf y D imágenes inferiores).

#### 4.5 La sobreexpresión de NTPDasa3 limita el crecimiento tumoral *in vivo*

Para evaluar el potencial tumorigénico de los cultivos *in vivo*, se usó el modelo animal de ratones inmunodeficientes de fenotipo SCID hr/hr. Se observó la capacidad de formar tumores, se midieron cada 3 días y a los 19 días se realizó el estudio histopatológico. Los resultados mostraron que las células ARK-2 son capaces de generar tumores espontáneos subcutáneos cuando se inyectan en ratones SCID inmunodeprimidos. La idoneidad de nuestro modelo animal se evaluó mediante experimentos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en los tumores reseccionados. Todos los tumores que sobreexpresan GFP-NTPDasa3 mostraron una expresión de la ectoenzima correlacionada con la fluorescencia de EGFP, mientras que no se detectó expresión de NTPDasa3 humana en los tumores control (Figura 3B, 3C). A nivel histológico, los tumores generados tienen un patrón sólido o glandular y las células tumorales muestran pleomorfismo marcado, núcleos irregulares, nucléolos enormes y actividad mitótica evidente, muchas veces con figuras mitóticas atípicas (Figura 3D), coincidente con el patrón de tumores de endometrio de tipo seroso en humanos.

Los tumores que sobreexpresan GFP-NTPDasa3 mostraron un tamaño significativamente menor en comparación con los tumores control (aumento <2 % para los tumores NTPDasa3 versus aumento del 8 % para los tumores control a los 19 días) (Figura 3D, 3E).

#### 4.6 La sobreexpresión de GFP-NTPDasa3 disminuye la expresión de E-cadherina y FGFR2 atenuando la señalización mediada por AKT y afectando la proliferación tumoral

Nuestro siguiente objetivo fue caracterizar una posible transición epitelial-mesenquimal (EMT) en este modelo celular. El análisis mediante Western blot muestra que las células ARK-2 expresan E-cadherina, un marcador de célula epitelial y carecen de vimentina, marcador mesenquimal (Figura 4A). La sobreexpresión de NTPDasa3 se detecta una discreta disminución en la expresión de E-cadherina (Figura 4A), sin aumento de vimentina ni de N-cadherina (no mostrado).

Las matrices de expresión génica (*arrays*) de genes relacionados con la proliferación celular demuestran disminución del receptor *FGFR2* en las células que sobreexpresan NTPDasa3 (Figura 4C), resultado que también se comprobó a nivel de proteína (Figura

---

4B). Este receptor se relaciona con la supervivencia y la proliferación celulares (Katoh and Katoh 2009; Mathur et al. 2014; Su et al. 2014). Evaluamos también el estado de AKT, una de las vías de señalización más relacionada con la supervivencia, proliferación y motilidad celulares en una amplia gama de cánceres (Jiang et al. 2020). Mediante Western blot se estudió AKT y sus formas fosforiladas activas AKT-phosphoSer473 y AKT-phosphoThr308 en los cultivos ARK-2. El análisis muestra una disminución en la forma total de AKT y en la forma de AKT fosforilada en Ser473 en las células que sobreexpresan GFP-NTPDasa3 en comparación con las células control (Figura 4A). Además, no se detecta la forma Thr308-fosforilada de AKT en ninguna de las dos condiciones analizadas (Figura 4A).

Como el ATP también influye en la proliferación y la migración celulares, evaluamos los niveles de FGFR2, ITGB2, ITGB3, MMP2 y MMP14 en su presencia. Mostramos que el tratamiento con ATP en células que sobreexpresan NTPDasa3 restaura los niveles de FGFR2 (Figura 4B). Los niveles de la proteína MMP14 e ITGB2 también aumentan con la adición de ATP (Figura 4D). No se observaron cambios en los niveles proteicos para MMP2 e ITGB3 (Figura 4D).

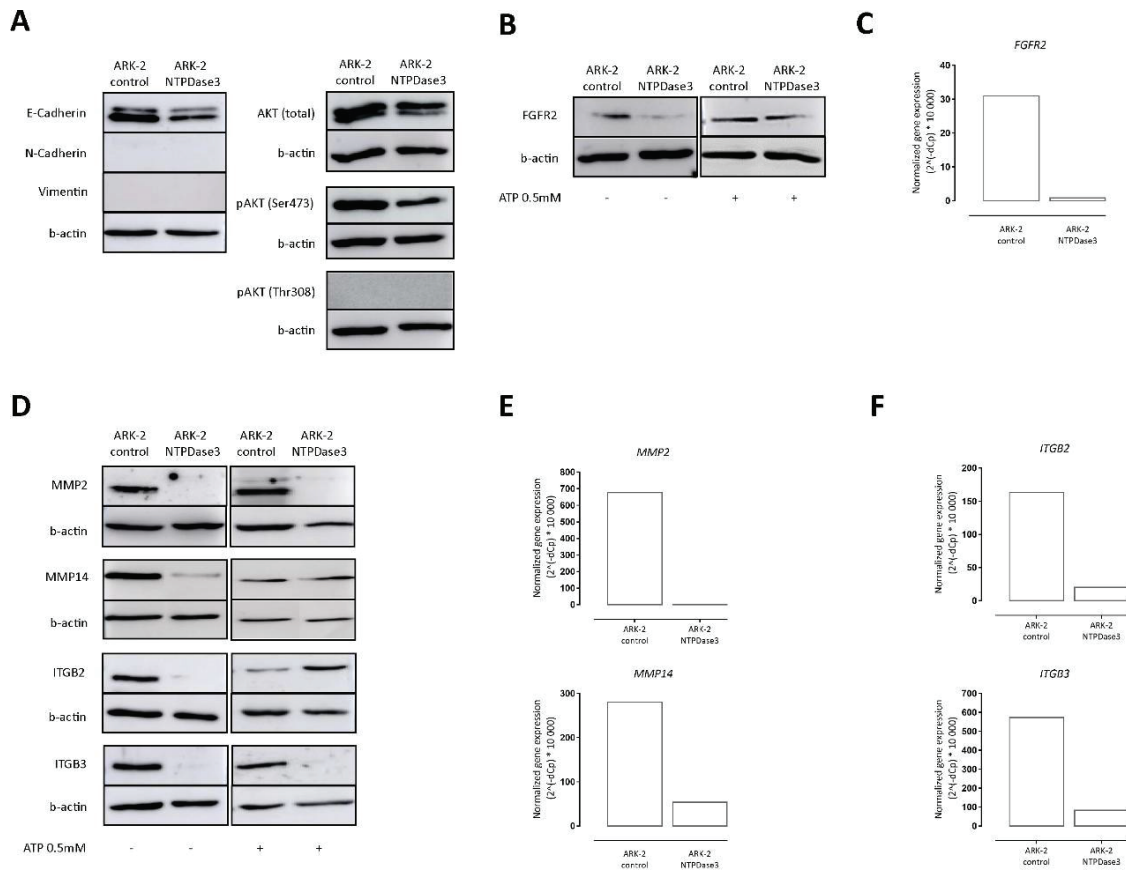


Figura 4. A Se inmunotransfirieron lisados celulares de cultivos ARK-2 no transfectados y transfectados con GFP-NTPDasa3 para las proteínas de transición epitelio-mesénquima, AKT y sus formas fosforiladas. Se observó una disminución en la cantidad de E-Cadherina y de fosfoAKT-Ser473 en los cultivos transfectados con GFP-NTPDasa3 en comparación con los no transfectados (A). También se observó que las células ARK-2 no presentaban proteínas las mesenquimales N-Cadherina y vimentina (A). B, C, D, E, F Los lisados de células de cultivos ARK-2 no transfectados y transfectados con GFP-NTPDasa3 tratados con o sin 0,5 mM de ATP se inmunotransfirieron para las proteínas FGFR2 (B), MMP2, MMP14 y las integrinas B2 y B3. (D). Se observa una disminución en los niveles de las proteínas mencionadas cuando NTPDasa3 está presente en las células. La adición de ATP restaura la expresión de FGFR2, MMP14 e ITGB2 en los cultivos sobreexpresados con GFP-NTPDasa3. Los niveles de expresión génica normalizados derivados de los ensayos de RT-PCR mostraron una disminución en los genes *FGFR2* (C), *MMP2*, *MMP14* (E), *ITGB2* e *ITGB3* (F) en los cultivos transfectados con GFP-NTPDasa3 en comparación con los no transfectados.

#### 4.7 La sobreexpresión de GFP-NTPDasa3 disminuye los niveles de las metaloproteinasas de matriz y de las integrinas del grupo beta afectando a la migración tumoral

Se amplió el estudio de expresión génica a genes relacionados con la motilidad celular, analizando un panel de X genes. Los siguientes genes están disminuídos en las células que sobreexpresan NTPDasa3: integrinas *ITGB2* e *ITGB3*, y metaloproteinasas *MMP2* y *MMP14* (Figura 4E, 4F). Este resultado se corroboró a nivel proteico mediante Western blot con anticuerpos anti-MMP2, MMP14, ITGB2 e ITGB3 (Figura 4D). Analizamos en la

cohorte del *TCGA-UCEC* de cáncer de endometrio, la expresión combinada de *ENTPD3* y los genes: *FGFR2*, *ITGB2*, *ITGB3*, *MMP2* y *MMP14* en términos de supervivencia y progresión clínica de las pacientes. Los resultados muestran que las pacientes con altos niveles de *ENTPD3* y *FGFR2* (Figura 5A), *MMP2*, *MMP14* (Figura 5B) o *ITGB2* (Figura 5C) tienen peor supervivencia global y periodos libres de enfermedad inferiores que las pacientes con niveles bajos de estos genes.

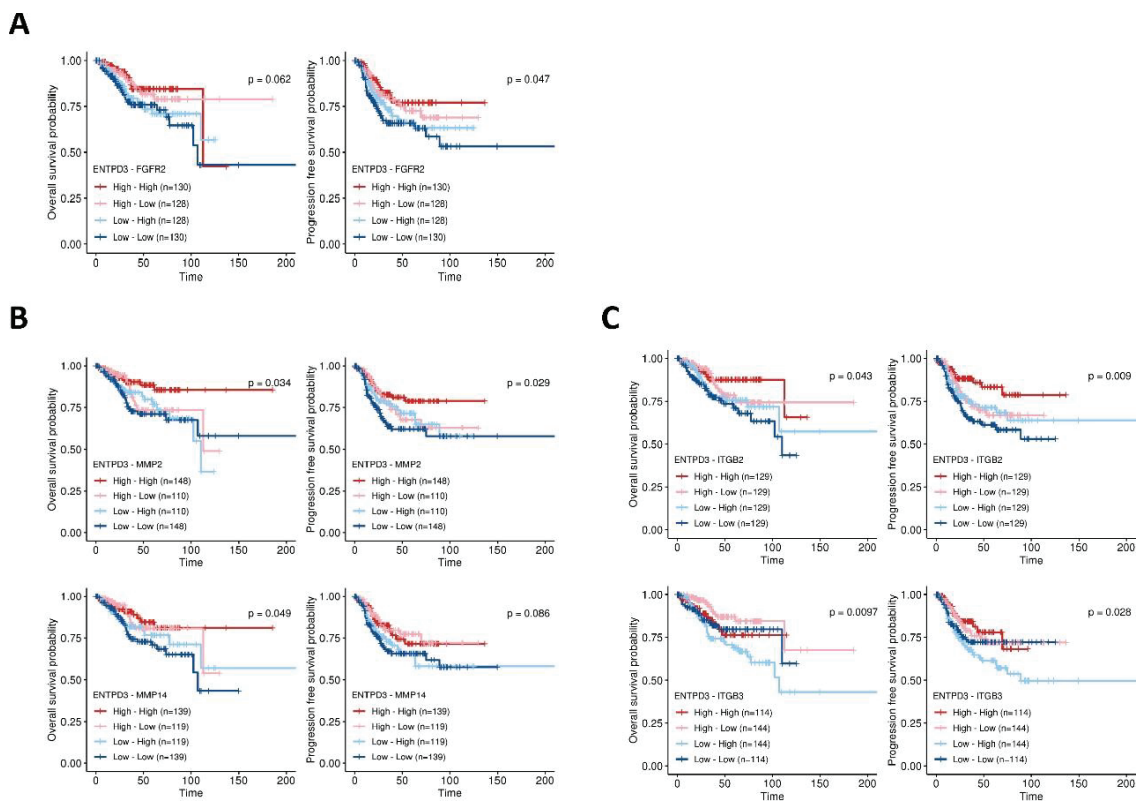


Figura 5. A, B, C Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia general (OS) y supervivencia libre de progresión/supervivencia libre de enfermedad (PFS/DFS) extraídas de la cohorte TCGA-UCEC con respecto a la expresión del gen *ENTPD3* combinado con el gen *FGFR2* (A), *MMP2*, *MMP14* (B) e *ITGB2*, *ITGB3* (C) mostraron un mejor pronóstico clínico en pacientes con niveles elevados de *ENTPD3-FGFR2*, *ENTPD3-MMP2* o *ENTPD3-ITGB2*. Se utilizó la prueba de Log-rank para comparar las curvas de supervivencia. OS: supervivencia global; PFS/DFS: supervivencia libre de progresión / supervivencia libre de enfermedad. \*  $p < 0,05$ .

#### 4. DISCUSIÓN

En este capítulo, NTPDasa3 se presenta por primera vez como elemento implicado en el cáncer de endometrio. Hemos caracterizado de la expresión de NTPDasa3 en tumores primarios de endometrio y hemos evaluado las consecuencias de su sobreexpresión in vitro e in vivo. NTPDasa3 es una ectoenzima de la familia CD39 con una bien conocida actividad ATPásica. Se localiza en la membrana celular (Robson et al. 2006) y se identificó inicialmente en el sistema nervioso, en las neuronas del neuropéptido hipocretina / orexina-A y en las neuronas de la región dorsal, donde controla la nocicepción mediada por nucleótidos, junto con CD73 (Robson et al. 2006; Zylka 2011; Vongtau et al. 2011). Se ha identificado también en células epiteliales del sistema renal, respiratorio, digestivo y reproductor. En el epitelio endometrial glandular y luminal fue estudiada por nuestro grupo en relación al endometrio funcional no patológico. Aquí la estudiamos en el cáncer. El eje CD39-CD73 constituye una de las dianas de estudio más actuales en la investigación oncológica, ya que el aumento en la expresión y actividad de ectoenzimas en muchos cánceres conduce a un aumento en la concentración de adenosina en el microambiente tumoral. Este mecanismo se ha propuesto como uno de los principales problemas en la inmunoterapia antitumoral, ya que la adenosina produce efectos inmunosupresores reduciendo así la inmunidad antitumoral (Hammami et al. 2019; Moesta et al. 2020; Roh et al. 2020).

En el caso del componente epitelial tumoral del cáncer de endometrio, el tándem más eficiente en la hidrólisis de ATP y formación de adenosina es NTPDasa3-CD73. Recordamos que NTPDasa1 (CD39) no se expresa en el epitelio tumoral. Aquí hemos valorado la expresión de NTPDasa3 como indicador histopatológico de progresión tumoral. El análisis inmunohistoquímico reveló la presencia de NTPDasa3 exclusivamente en los tumores endometrioides de grado 1 y 2, considerados de bajo grado. Los tumores no endometrioides, de alto grado (seroso, carcinosarcomas y carcinomas de células clara) carecen de expresión de NTPDasa3. Cabe destacar que los tumores clasificados molecularmente como CNH, en su mayoría de alto grado, carecen de expresión de NTPDasa3 en un alto porcentaje, coincidiendo con los resultados analizando el grado tumoral. Se muestra evidente la relación entre los niveles tumorales de NTPDasa3 y la progresión del cáncer de endometrio. El TCGA proporciona

información génica derivada de miles de muestras de pacientes, en nuestro caso, estudiamos una cohorte derivada de pacientes afectadas por cáncer de endometrio y caracterizamos la expresión del gen *ENTDP3* en relación con progresión clínica. Los datos de expresión génica coincidieron con los de proteína en los tumores, viéndose disminuida en los tumores de alto grado.

En cuanto a la evolución clínica, las pacientes con niveles altos del gen *ENTPD3* tienen una mayor tasa de supervivencia y períodos libres de enfermedad que las pacientes con niveles bajos. Se han observado resultados similares en una cohorte de pacientes con cáncer de mama (Li et al. 2019). Esta correlación también había sido demostrada para *ENTPD2* (Capítulo 2)(Rodríguez-Martínez et al. 2021). Además, la expresión alta simultánea de ambos genes, *ENTPD2* y *ENTPD3*, coincide con un mejor pronóstico en términos de supervivencia y progresión clínica. En cambio, la expresión alta de los genes *CD39* y *ENT5* se relaciona con un peor pronóstico en varios tipos de cáncer, como el cáncer de mama y el de ovario (Turcotte et al. 2015; Jiang et al. 2018; Ni et al. 2021), hecho que se relaciona con el efecto inmunosupresor antitumoral de la adenosina generada (Deaglio et al. 2007; Borsellino et al. 2007; Shi et al. 2019). Los estudios que analizan la expresión del eje adenosinérgico en los tumores son complejos dada la diversidad de enzimas y su expresión en diferentes tipos celulares. Ello dificulta que se puedan establecer asociaciones entre expresión y evolución del tumor. En el caso de *NTPDase3*, su expresión y sus cambios sí pueden relacionarse con el componente epitelial del tumor puesto que no se expresa en el estroma.

Hemos demostrado la relación entre *NTPDase3* y la progresión tumoral en el cáncer de endometrio utilizando un modelo de cultivo celular de carcinoma seroso en el que hemos sobreexpresado la proteína como proteína de fusión con EGFP para facilitar su identificación. La sobreexpresión de *NTPDase3* correlaciona con una disminución de la proliferación, pero con un aumento de la migración, sin afectar la invasión celular. La disminución de la proliferación no se debe un mayor índice de apoptosis en las células. Demostramos que las células que sobreexpresan *NTPDase3* reducen los niveles de la forma fosforilada de AKT-Ser473, sin disminuir los niveles de AKT total. AKT/PKB es una serina/treonina quinasa que promueve la supervivencia, proliferación y crecimiento celular cuando se activa mediante la fosforilación de los residuos Thr308 y Ser473 que a



su vez inducen una cascada intracelular de señalización (Datta et al. 1999; Cicenas 2008). Esta vía ha sido propuesta como diana terapéutica en el cáncer de endometrio (Yap et al. 2008; Slomovitz and Coleman 2012), observándose mutaciones activadoras en AKT, PI3K (Salvesen et al. 2009; Cheung et al. 2011), en proteínas activadoras de AKT, como el receptor de tirosina quinasa FGFR2 (Dutt et al. 2008), y otros mecanismos como la regulación negativa de EGF (Khalifa et al. 1994). Además, se sabe que el aumento de la señalización de AKT y fosfo-AKT está asociada con la resistencia tumoral a la quimioterapia, fenotipos agresivos y peor pronóstico (Salvesen et al. 2009; Pavlidou and Vlahos 2014). Nuestros estudios de expresión génica también demostraron una disminución en la expresión de *FGFR2*, también a nivel de proteína. En este modelo, la sobreexpresión de *NTPDasa3* provocaría la disminución de *FGFR2*, que, a su vez, actuaría reduciendo la señalización de AKT y limitando la proliferación celular, observada en ensayos funcionales en células. Además, los niveles bajos de *ENTPD3* y *FGFR2* están relacionados la menor supervivencia global en la cohorte TCGA. Como se ha indicado anteriormente, las pacientes con niveles altos de *ENTPD3* tienen un mejor pronóstico.

Hemos completado los estudios en cultivo con la generación de organoides derivados de células tumorales y con un modelo animal de tumorigénesis. Los organoides que expresan *NTPDasa3* son de menor tamaño que los que carecen de la proteína. Además, demostramos que el crecimiento tumoral se frena en los animales inyectados con células que sobreexpresan *NTPDasa3*. En conjunto, estos resultados confirman la hipótesis del papel de *NTPDasa3* en el control de la proliferación tumoral.

Hay que considerar que la plasticidad tumoral influye en el movimiento celular a través de mecanismos de transición epitelio-mesénquima en función de diversos factores como el microambiente tumoral o las características intrínsecas de la célula tumoral en el avance de la enfermedad (Krakhmal et al. 2015). En estos mecanismos, las MMP y las integrinas engloban funciones vitales como proteínas celulares relacionadas con la migración, invasión y metástasis tumorales ya que sirven como interacción entre las células tumorales, el microambiente tumoral y la matriz extracelular. En este sentido, se sabe que las fluctuaciones en los niveles de MMP e integrinas influyen en la motilidad de las células tumorales (Brooks et al. 1996). No observamos cambios en los niveles de

proteínas de transición epitelio-mesénquima en presencia de NTPDasa3. Sin embargo, en los estudios de expresión génica identificamos una disminución en la expresión *MMP2* y *MMP14* y también de las integrinas *ITGB2* e *ITGB3*. Este cambio de expresión, junto con el fenotipo de migración de estas células coincide con la adquisición de un fenotipo ameboide, que comporta un tipo de motilidad epitelial que se caracteriza por fenotipos altamente móviles, no adhesivos, con niveles bajos de integrinas del grupo beta y con una disminución de los componentes de remodelación de la matriz extracelular. La migración ameboide ya se ha observado en células tumorales en varios tipos de cáncer (Enterline and Coman 1950; Sabeh et al. 2009; Friedl and Alexander 2011; Krakhmal et al. 2015). En líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas, se confirmó que la reducción en los niveles de integrinas la motilidad de las células cancerosas (McHugh et al. 2012). Las MMP disminuidas también se han observado en células tumorales epiteliales que realizan una migración de tipo ameboide (Lehmann et al. 2017). En esta línea, proponemos que la sobreexpresión de NTPDasa3 aumentaría la migración celular, probablemente al disminuir la expresión de MMPs e integrinas, promoviendo una transición hacia fenotipos con motilidad de tipo ameboide. Aunque la NTPDasa3 induciría un aumento de la migración, lo que probablemente aumentaría los fenotipos malignos, encontramos niveles bajos de *ITGB3* y *ENTPD3* en los pacientes como factores de mal pronóstico en términos de supervivencia y de progresión clínica de la enfermedad. Es necesaria, por lo tanto, una profunda caracterización de los mecanismos implicados, que podrían estar encaminada a la realización de asociaciones proteicas entre NTPDasa3 e *ITGB3*, utilizando ensayos *pull-down* o de interactómica.

Pese a que la concentración de ATP en el microambiente tumoral suele ser más alta que en los tejidos sanos (Pellegatti et al. 2008), lo que influye en el comportamiento de las células tumorales mediante la activación de los receptores P2 sensibles al ATP, no hay estudios que demuestren un efecto directo del ATP extracelular sobre las células tumorales endometriales. En el modelo aquí presentado, la adición de concentraciones similares de ATP a las del microambiente tumoral provoca un aumento en la proliferación y migración de las células, aumento muy superior en las células que expresan NTPDasa3. Esto podría explicarse por una recuperación de la expresión de

FGFR2, ITGB2 y MMP14 en presencia de ATP extracelular, como se observa mediante Western blot. Este fenómeno ya se ha reportado en células de cáncer de mama, donde el ATP extracelular induce migración tumoral y aumenta la transición epitelio-mesénquima activando AKT y aumentando las MMPs (Yang et al. 2019). Debe considerarse que el ATP será hidrolizado en mayor cantidad por las células que expresan NTPDasa3. En este caso, el estudio de los receptores P2 y P1 y por tanto de la expresión y actividad de CD73 en nuestro modelo celular sería esclarecedor para entender el efecto global de la adición de ATP extracelular. El ATP se propone en algunas situaciones como una molécula proinflamatoria capaz de inducir una respuesta inmune antitumoral (Vultaggio-Poma et al. 2020)(Vultaggio-Poma et al. 2020), por lo que es necesario un gran cribado con el uso de modelos *in vivo* donde es posible lograr un microambiente tumoral más realista que en los modelos *in vitro*.

El tratamiento con ATP extracelular en dosis micromolares, induce proliferación y migración, a través de la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>, en células de cáncer hepatocelular y en también en glioma. Ello conduce a la activación de las vías ERK, PKC y PI3K/AKT (Jacques-Silva et al. 2004; Xie et al. 2014). El receptor P2Y<sub>2</sub> se ha detectado en las líneas celulares de carcinoma endometrioide tipo endometrioide como HEC e Ishikawa (Katzur et al. 1999), donde se ha propuesto como regulador del ciclo celular, por lo que este mecanismo podría ocurrir en otras células de cáncer endometrial. Los experimentos futuros tienen como objetivo incluirían el estudio de la vía AKT en células tumorales que expresan y no expresan NTPDasa3 bajo la influencia de ATP extracelular, descifrar la expresión de los receptores P1 y P2 en relación con la expresión de NTPDasa3. El uso de inhibidores de receptores, como por ejemplo el inhibidor de P2Y<sub>2</sub> AR-C-118925 (Rafehi et al. 2017), y de ectonucleotidasas como el  $\alpha\beta$ -meADP, ya que debe considerarse también el tándem adenosinérgico que esta proteína puede formar con CD73.

En conclusión, esta investigación ha sido clave para identificar, por primera vez, un nuevo rol para un miembro de la familia CD39, la NTPDasa3 (CD39L3), en el cáncer de endometrio. NTPDasa3 muestra heterogeneidad intertumoral, y su expresión génica alta es un factor de buen pronóstico en el cáncer de endometrio. La Figura 6 reúne gráficamente los principales hallazgos y la posible implicación de NTPDasa3 en la

progresión del cáncer de endometrio. Este estudio representa el inicio de un campo prometedor en la comprensión de los mecanismos en los que la señalización purinérgica participa en la proliferación y migración de células tumorales endometriales. Debe considerarse un análisis más profundo de NTPDase3 como marcador histopatológico de pronóstico y en el diagnóstico de cáncer de endometrio.

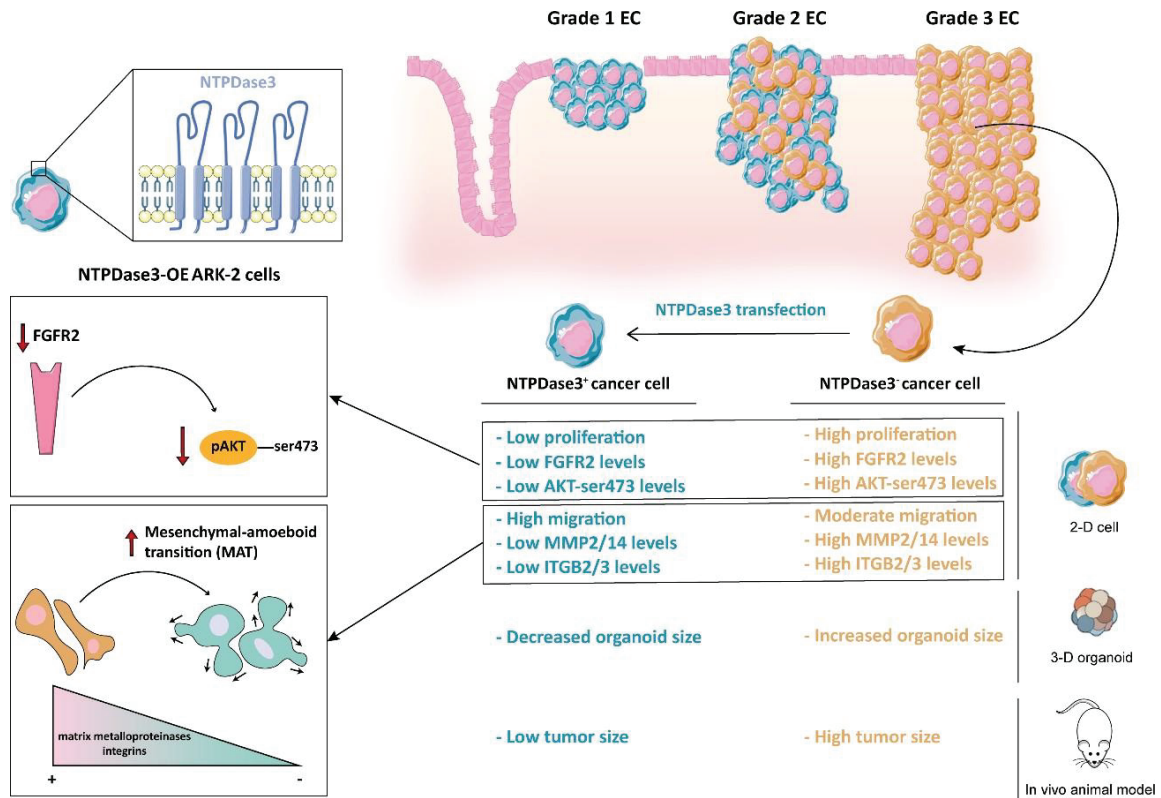


Figura 6. Representación esquemática de las consecuencias de la sobreexpresión de la ectonucleotidasa de NTPDase3 en un modelo celular de cáncer endometrial de tipo seroso utilizando cultivos ARK-2 transfectados con GFP-NTPDase3. Niveles altos de NTPDase3 se asocian con carcinomas endometriales de bajo grado, aunque los carcinomas endometriales de alto grado carecen en su mayoría de la expresión tumoral de NTPDase3. La sobreexpresión de NTPDase3 en células tumorales endometriales induce, por un mecanismo desconocido, una disminución del receptor FGFR2 que probablemente se correlaciona con un nivel reducido de la forma de AKT fosforilada en Ser473, disminuyendo así la proliferación celular. Por el contrario, la presencia de NTPDase3 reduce los niveles de expresión de las metaloproteinasas de matriz e integrinas; esta situación impulsa la transición de un fenotipo migratorio de tipo colectivo a uno de tipo ameboide aumentando así la migración de las células *in vitro*. Además, la presencia de la NTPDase3 limita el crecimiento tumoral en los modelos en tres dimensiones y de tumorigénesis en ratón. Imagen de elaboración propia. Se ha usado el software Adobe Illustrator (Adobe Inc., 2019. Adobe Illustrator, disponible en: <https://adobe.com/products/illustrator>).



# CAPÍTULO 4

Caracterización de las ectonucleotidasas en oviductos humanos con una técnica mejorada que identifica simultáneamente la expresión proteica y la actividad enzimática in situ

Villamonte ML, Torrejón-Escribano B, Rodríguez-Martínez A, Trapero C, Vidal A, Gómez de Aranda I, Sévigny j, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. Characterization of ectonucleotidasas in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity. *Histochem Cell Biol.* 2018, 149(3):269-276. Q1; IF: 2.258.



El capítulo 4, es metodológico e incluye la descripción de una mejora de la técnica de estudio de las ectonucleotidasas in situ en tejido. Para ello, se utilizó tejido humano de trompas uterinas.

Se trata de la puesta a punto un protocolo de detección que permite la visualización simultánea de la expresión (mediante inmunofluorescencia) y la actividad enzimática in situ asociada a una determinada ectoenzima en un mismo corte histológico. Además, en este trabajo, se describió la expresión de las ectonucleotidasas y su distribución en las trompas uterinas humanas, no estudiada hasta el momento.

Los principales hallazgos de este capítulo son:

El uso combinado de anticuerpos contra las ectonucleotidasas junto con las técnicas de histoquímica in situ es factible y resulta un método útil para la identificación simultánea de expresión y actividad hidrolítica en tejido.

Las enzimas NTPDasa2 y NTPDasa3 tienen una alta expresión en el epitelio de la mucosa de las trompas uterinas aunque con un patrón subcelular distinto.

CD73 y PLAP también se expresan de modo polarizado en el epitelio de las trompas.

Los resultados derivados se han publicado en la revista *Histochemistry and Cell Biology* en formato artículo científico:

Villamonte ML, Torrejón-Escribano B, Rodríguez-Martínez A, Trapero C, Vidal A, Gómez de Aranda I, Sévigny j, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. Characterization of ectonucleotidases in human oviducts with and improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity. *Histochem Cell Biol*. 2018 149(3):269-276. doi: 10.1007/s00418-017-1627-8. Epub 2017 Dec 22. Q1; IF: 2.258


El artículo fue imagen de portada de la revista. Se incluye también en el Anexo 2.







# 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 (Barrera 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 snapfrozen in O.C.T freezing media (Tissue-Tek<sup>®</sup>; 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<sup>™</sup> + 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™, 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% Dex-tran, 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™; 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 antifade 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).

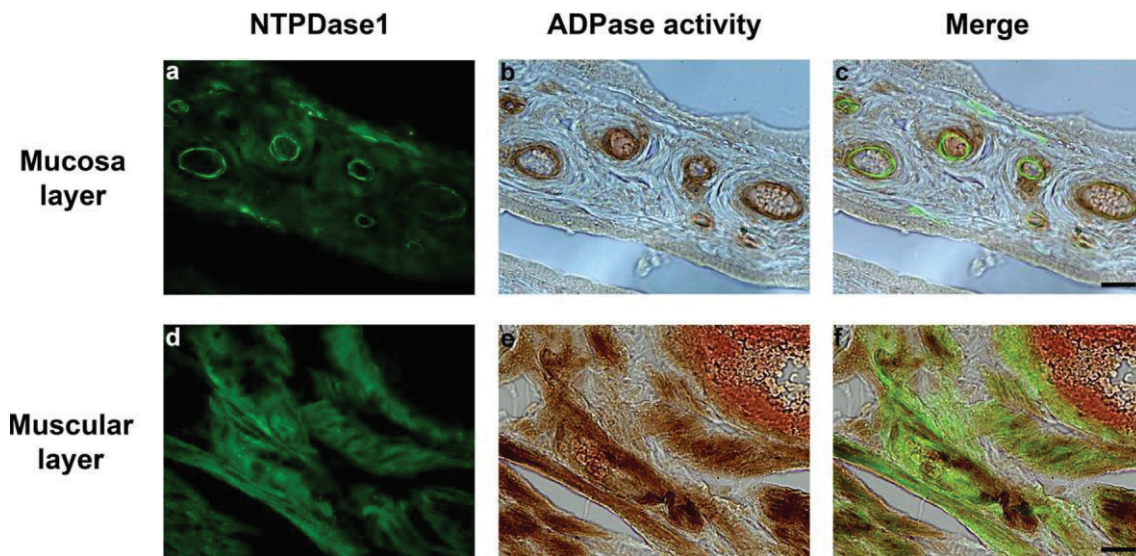
The hydrolysis of ATP to AMP is catalyzed mainly by the E-NTPDase family. As expected, NTPDase1 (CD39) label was prominent in the vascular endothelial cells and in smooth muscle cells (Kaczmarek et al. 1996; Sévigny et al. 2002). The strong ADPase activity detected coincided with the CD39 immunolocalization (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).

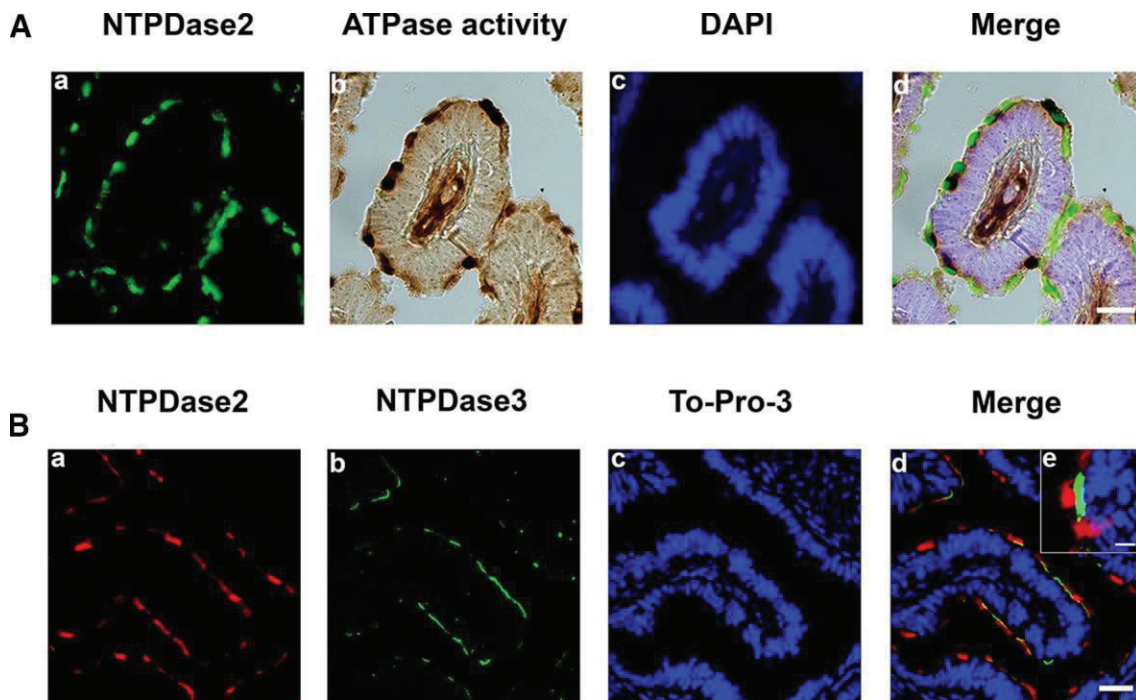
Placental alkaline phosphatase, an ecto-nucleotidase that catalyzes the hydrolysis of phosphate from a broad range of substrates, was expressed and active in luminal epithelium and also, as expected, in the endothelial cells of blood vessels. In the present study, we demonstrate with this new method 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.



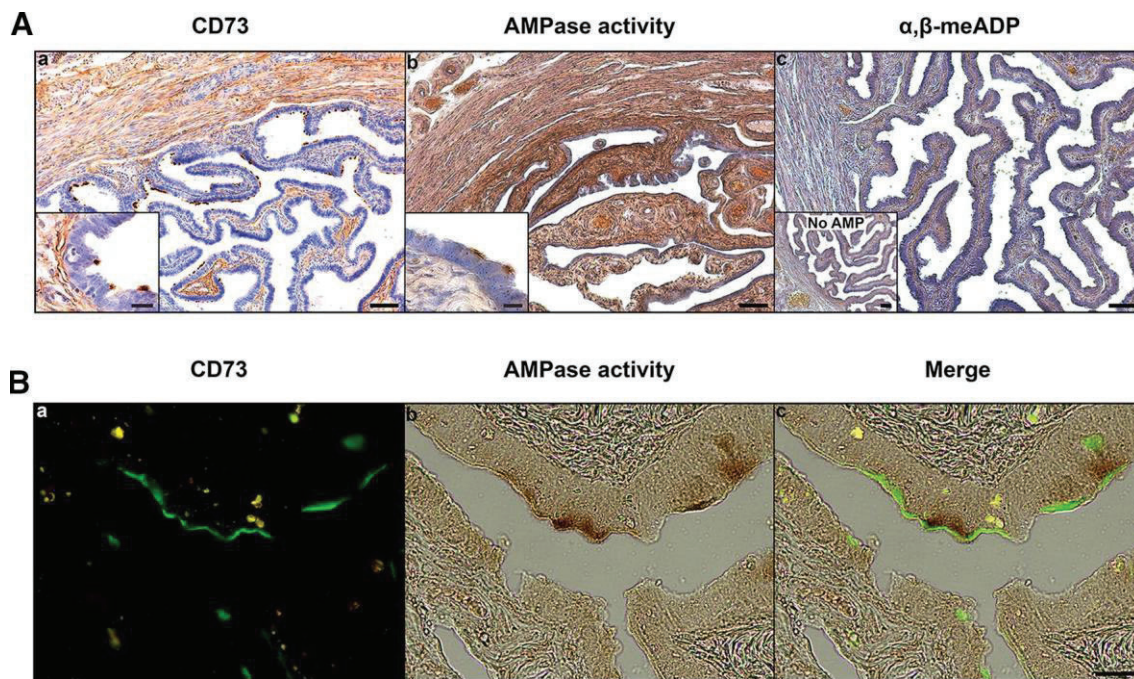
**Fig. 1** Immunolocalization of NTPDase1 (a, d) and in situ ADPase histochemistry (b, e) in cryosections of human oviducts. NTPDase1 was detected with immunofluorescence in endothelial cells of lamina propria (a) and in smooth muscle cells (d). Microphotographs b and

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 topright of the image is the blood inside the vessel. Scale bars 25  $\mu$ m



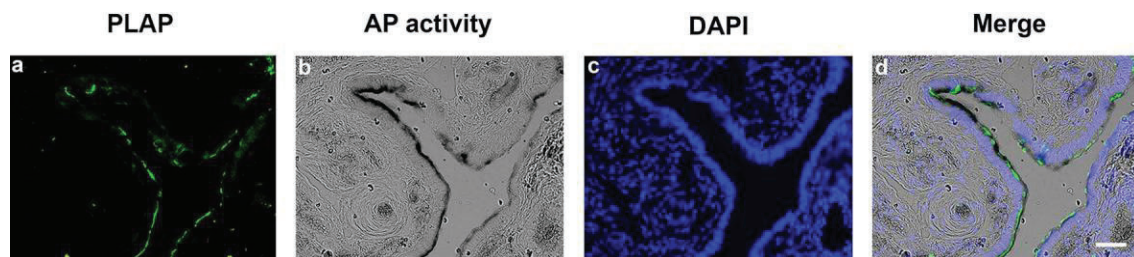
**Fig. 2 A** Immunolocalization of NTPDase2 (a) and in situ ATPase histochemistry (b) in cryosections of human oviducts. NTPDase2 was largely detected with immunofluorescence in ciliated epithelial cells. Microphotograph b shows dark brown deposits corresponding to in situ ATPase activity. Nuclei were 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

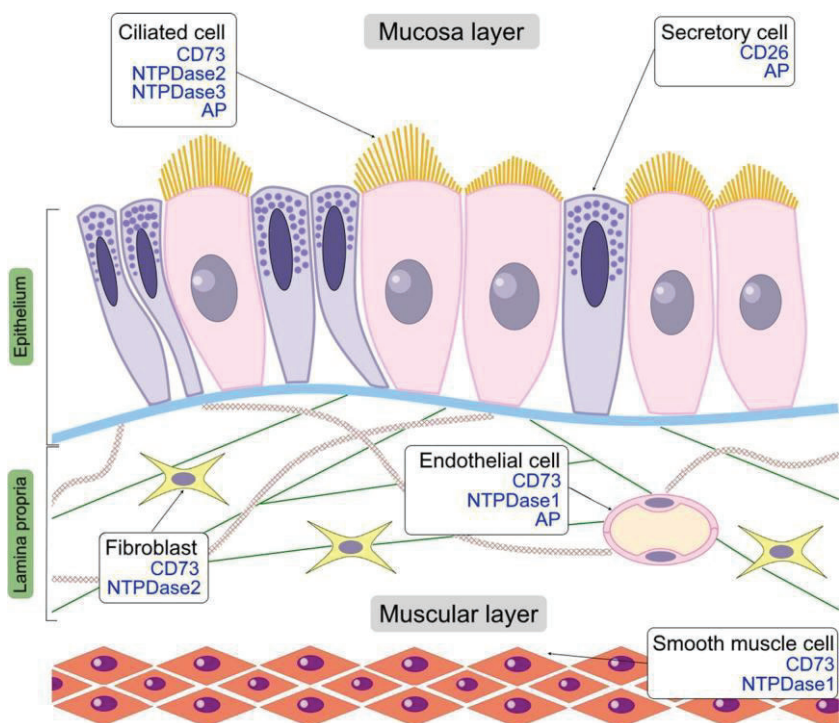
**b** shows dark deposits corresponding to in situ AP activity. Merged image (**d**) confirms that PLAP is active in the same structures where it immunolocalizes. Scale bar 50  $\mu\text{m}$

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 ectonucleotidases 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/immr.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, Qawil, 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.bbamer.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>

# CAPÍTULO 5

Los organoides derivados de células tumorales endometriales son herramientas útiles para el estudio de las NTPDasas y para la validación de inhibidores enzimáticos

Rodríguez-Martínez A, Torrejón-Escribano B, Eritja N, Sévigny J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. Endometrial tumor cell-derived organoids are convenient tools studying the CD39 enzymes and for validating enzyme inhibitors.



En el último capítulo, se detalla la obtención de herramientas moleculares para la monitorización de las ectonucleotidasas NTPDasa2 y NTPDasa3 en un modelos celulares en dos y tres dimensiones de cáncer de endometrio. Se describe también su utilidad para el estudio de inhibidores de estas proteínas.

Además, hemos adaptado para el estudio de organoides, la técnica de covisualización descrita en tejido en el Capítulo 4.

Los principales hallazgos de este capítulo son:

La NTPDasa2 y la NTPDasa3, subclonadas como proteínas de fusión a GFP, se expresan como la proteína nativa en las células de cáncer de endometrio ARK-2. Se localizan en la membrana plasmática y su actividad enzimática se mantiene.

Las células ARK-2 transfectadas forman organoides, que también mantienen la expresión y actividad enzimática.

La técnica de covisualización de la expresión y actividad de las ectoenzimas con el uso de anticuerpo es aplicable en este modelo.

Se trata de un modelo útil para el estudio de inhibidores de las ectonucleotidasas.

Los resultados se presentan aquí en forma de artículo científico en el formato que se envía a revisar para su publicación en la revista *Histology and Histopathology*:

Rodríguez-Martínez A, Torrejón-Escribano B, Eritja N, Sévigny J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M. Endometrial tumor cell-derived organoids are convenient tools for studying the CD39 family of enzymes and for validating enzyme inhibitors.



## **Title**

Endometrial tumor cell-derived organoids are convenient tools for studying the CD39 family of enzymes and for validating enzyme inhibitors

## **Author information**

Aitor Rodríguez-Martínez<sup>1,2</sup>, Benjamín Torrejón-Escribano<sup>1,3</sup>, Núria Eritja<sup>4,5</sup>, Jean Sévigny<sup>6,7</sup>, Xavier Matias-Guiu<sup>1,2,4,5,8</sup>, 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, Barcelona, Spain.

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

<sup>3</sup> Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Campus Bellvitge, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup> Departament de Patologia i Genètica Molecular, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

<sup>5</sup> Oncologic Pathology Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Lleida (IRBLleida), CIBERONC, Universitat de Lleida, Lleida, Spain.

<sup>6</sup> Centre de Recherche du CHU de Québec, Université Laval, Québec, Canada.

<sup>7</sup> Département de Microbiologie-infectiologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Canada.

<sup>8</sup> Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain.

MMS: martinsatue@ub.edu

ARM: arodriguez@ub.edu

BTE: torrejonbenja@ub.edu

NE: neritja@irbllleida.cat

JS: jean.sevigny@crchudequebec.ulaval.ca

XMG: fjmatiasguiu.lleida.ics@gencat.cat

**Key words**

NTPDase2, NTPDase3, endometrial cancer, cytochemistry, purinergic signaling, CD39

**Short title**

Tumor-derived organoids are valid for the study of CD39 ectoenzymes in endometrial cancer

**Abstract**

Purinergic signaling is a dynamic and complex system in which ectonucleotidases, membrane-expressed enzymes with nucleotide hydrolytic ability, play important roles in physiological and pathological situations. In cancer, altered ectonucleotidase expression has been reported, especially at the level of the CD39-CD73 axis, which is responsible for the generation of immunosuppressive adenosine in the tumor microenvironment. The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) family of enzymes, with its most known form CD39, is one of the groups of enzymes targeted in cancer. Organoids are three dimensional cultures that have emerged as very convenient models for the study of tumors since they retain many of the characteristics of the cells in the tissue. The aim of the present study was to improve the tools for the study of ectonucleotidases. The study, performed in an endometrial cancer model, could be extended to other types of tumors and pathologies in which the purinergic system is involved. We obtained organoids from endometrial cancer cells overexpressing NTPDase2 (CD39L1) and NTPDase3 (CD39L3) as fusion proteins with EGFP, and we performed functional assays by adapting *in situ* cytochemistry protocols. This allowed us to simultaneously detect enzyme activity and protein expression. Furthermore, we have also demonstrated that organoids can be used to test ectonucleotidase inhibitors, a result that can be used to develop new cancer treatment options.

## Introduction

Purinergic signaling is a broadly expressed, complex system of substrates, receptors, and enzymes that controls a number of physiological and pathological processes, including cell proliferation, migration, and differentiation, and the regulation of immune responses, among others (Yegutkin 2014; Haas et al. 2021; Huang et al. 2021; Zimmermann 2021). Nucleotides, mainly adenosine triphosphate (ATP) and its derivatives, adenosine di- and monophosphate (ADP and AMP, respectively), and nucleosides, such as adenosine, are the main actors in this system, where ectonucleotidases, encompassing four different families of enzymes, finely regulate their extracellular concentrations. The nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) constitute one of the families of ectonucleotidases which includes four membrane-bound members: NTPDase1 (also known as CD39), NTPDase2 (CD39L1), NTPDase3 (CD39L3), and NTPDase8; they hydrolyse ATP and ADP to AMP, which is the substrate of ecto-5'nucleotidase (5'NT, CD73), and which generates adenosine (Robson et al. 2006; Yegutkin 2008; Zimmermann et al. 2012). One of the checkpoint inhibitory targets in immune-oncology is the CD39-CD73 axis (Allard et al. 2017, 2019; Di Virgilio and Adinolfi 2017), an efficient system of sequentially acting ectoenzymes hydrolyzing extracellular ATP to adenosine, favoring the immunosuppressive tumor microenvironment that supports tumor immune escape, tumor growth, and disease progression (Zhang et al. 2015a, b). In this context, the development and improvement of detection tools for ectonucleotidases and their inhibitors are of great interest.

Three-dimensional (3-D) cultures represent a suitable biological model of study for most diseases, especially cancer (Shankaran et al. 2021). In the case of oncogynecological pathology, and compared with current 2-D tools (mainly cell culture), the generation and use of 3-D organoids, organ-on-a-chip, and patient-derived xenografts (PDXs) are emerging as the top experimental techniques in basic, translational, and clinical research (Eritja et al. 2010, 2013; Gu et al. 2020). Endometrial tumor-derived organoids closely resemble the original tissue and maintain both histological and genetic characteristics of tumors, as well as the inter-tumoral heterogeneity of cells (Maru et al. 2019). Currently, there are still some limitations in its use that must be taken into account, such as the lack of intra-tumoral heterogeneity, the species factor with the use of PDX for the study of the tumor microenvironment and the differential response to treatments (Heremans et al. 2021). Conventional histological techniques need to be adapted to these novel sample types. This is the case of ectonucleotidase activities, detected with *in situ* enzyme histo- and cytochemistry techniques, known as the lead-phosphate or Wachstein-Meisel staining method.



This technique is based on the addition, and incubation, of substrates—ATP and/or ADP, in the case of NTPDases, or AMP for 5'NT/CD73—followed by the staining of the lead phosphate precipitates formed at the site of enzyme activity (Wachstein et al. 1960). This approach can be used in frozen tissue sections and in fixed cells (Karasaki and Okigaki 1976; Langer et al. 2008), and can also be combined with the use of antibodies against ectonucleotidases to allow simultaneous visualization of both enzyme expression and hydrolytic activity (Villamonte et al. 2018; Trapero et al. 2019; Losenkova et al. 2020; Martín-Satué et al. 2020).

Ectonucleotidases are expressed in non-tumoral endometrium, with changes along the cycle influenced by hormones (Aliagas et al. 2013; Trapero et al. 2019). As in other types of cancer, ectonucleotidases are dysregulated in endometrial cancer, where the CD39-CD73 axis is increased in the stroma of tumors compared with non-tumoral stroma (Aliagas et al. 2014). Ectonucleotidases are expressed not only in the stroma but also in the epithelial component of endometrial tumors, such as CD73 (Bowser and Broaddus 2016) and NTPDase2 (CD39L1) (Rodríguez-Martínez et al. 2021), whose expression is related with the progression of the disease. Deciphering the regulatory mechanisms of expression and activity of ectonucleotidases would help advance the development of personalized therapies in endometrial cancer.

The main aim of the present work was to improve the methodology for the study of ectonucleotidases and their inhibitors and to corroborate their use in cancer-derived organoids. We addressed this by expressing and characterizing green fluorescent protein (GFP)-tagged NTPDase2 and NTPDase3 in human endometrial carcinoma cells, and by obtaining organoids of these cell cultures to validate the use of these 3-D models for the study of ectonucleotidases.

## Material and methods

### *EGFP-NTPDase2 and EGFP-NTPDase3 cloning*

Human *ENTPD2* and *ENTPD3* cDNAs were subcloned into pEGFPC1 expression vector as follows: *ENTPD2* and *ENTPD3* cDNAs were obtained by polymerase-chain reaction (PCR) from pCDNA3.1 vectors, provided by Prof. Jean Sévigny and based on the original sequences reported by Chadwick and Frischauf 1997 and Smith and Kirley 1998, respectively. The sets of primers used were: forward 5' TCTCTCGAGTGGAAATTCGGCTTAATGGCCGGAAGG 3' and reverse 5' GCCAAGCACCATTAAGCCGAATTCTGGGATCCAGA 3' for *ENTPD2*, and forward 5' TCTCTCGAGAGATGTTCACTGTGCTGACCCGCCAAC 3' and reverse 5' TCTGTCGACGCGAATCCACTGCATGGTCAA 3' for *ENTPD3*. The two forward primers included a *XhoI* restriction site, and the reverse primers a *BamHI* restriction site for *ENTPD2*, and a *Sall* restriction site for *ENTPD3*, for subsequent in-frame subcloning into the pEGFPC1 vector. Amplifications were started by incubating for 2 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of 20 seconds at 95°C, 10 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C, using a BioRad T100 Thermal cycles apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). PCR products of 1.487 bp for *ENTPD2* and 1.589 bp for *ENTPD3* were excised from the agarose gel and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The products were digested and ligated into the *XhoI* and *BamHI* (or *XhoI* and *Sall*) digested pEGFPC1 plasmid to generate EGFP-NTPDase2 and EGFP-NTPDase3 fusion proteins, respectively. Plasmids were purified using QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN), and the inserts were verified by restriction mapping and then full-length sequenced using the primer 5' GACCCCAACGAGAAGCGCGA 3' (Life Technologies, Paisley, UK). The subcloning procedure is summarized in Supplementary Fig. 1.

### *Cell culture and plasmid transfection*

EGFP-NTPDase2- and EGFP-NTPDase3-expressing vectors were transfected into the uterine serous papillary carcinoma ARK-2 cell line (USPC-ARK-2; RRID:CVCL-IV73), a tumoral cell line obtained from a 63-year-old stage IV endometrial serous adenocarcinoma patient (English et al. 2013), and provided by Dr. Alessandro D. Santin of Yale University. Cells were grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere in DMEM/F12 medium (Gibco, Paisley, UK) supplemented with L-glutamine, 15mM HEPES, 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), and 1% penicillin/streptomycin (P/S; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). For transfection, briefly, cells were seeded in 6 well plates at a confluency of 70-90% and were transfected with 4 µg of one the following plasmids diluted in 250 µL

OPTI-MEM (Gibco): pEGFPC1-ENTPD2, pEGFPC1-ENTPD3, or pEGFPC1, using Lipofectamine (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and the protocol provided by manufacturer. Twenty-four hours after transfection, the medium was replaced with DMEM/F12 medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 1% P/S (Sigma-Aldrich), and 500 mg/mL of geneticin/G418 (Gibco). Non-transfected cells were also included as control of the experiments.

Stably-transfected clones of EGFP-tagged NTPDase2 and NTPDase3 were obtained by fluorescent-activated cell sorting using a MoFlo Astrios Cell Sorter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Briefly, confluent 10 cm<sup>2</sup> plates were washed with 4 mL of PBS, trypsinized, and centrifuged. The resulting pellets were then washed twice with PBS and resuspended in 400 µL of a solution containing 0.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) and 2 mM EDTA in PBS. Sorted GFP-positive cells were seeded in a 96-well plate at a density of one cell per well in order to obtain clones.

#### *Membrane-enriched protein obtention and Western blotting*

One x 10<sup>6</sup> transfected ARK-2 cells were plated on 10 cm<sup>2</sup> plates and grown to 90-100% confluency at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Plates were then washed twice with 10 mL of a cold phosphate-free solution containing 15 mM Tris pH 7.5, 145 mM NaCl, and 0.005% Triton X-100 (v/v) in water, scrapped with 200 µL of the same solution containing Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) and kept on ice for 15 minutes. Samples were then sonicated and centrifuged at 8000 x g for 15 minutes at 4°C. Supernatants were centrifuged at 50,000 rpm for 30 minutes at 4°C and the resulting pellets were diluted in a solution containing 15 mM Tris pH 7.5, 145 mM NaCl supplemented with Protease Inhibitor Cocktail. Protein concentration was determined using the method of Lowry et al. (1951).

Thirty µg of membrane-enriched cell lysates were added per lane and separated in 40% Acrylamide/Bis solution (Bio-Rad) gel under non-reducing conditions, and then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) by electroblotting at 100 V for 1 hour. Membranes were blocked with 2.5% (w/v) non-fat milk, 1% (w/v) BSA in PBS containing 0.1% (v/v) Tween® 20 for 1 hour at RT. Membranes were then incubated with the primary antibodies: mouse anti-human NTPDase2 (clone H9s; 1:100) (Pelletier et al. 2017) or mouse anti-human NTPDase3 (clone B3<sub>s</sub>10; 1:500) (Munkonda et al. 2009), both from <https://ectonucleotidases-ab.com>, in 0.5% (w/v) non-fat milk, 0.1% (w/v) BSA in PBS containing 0.1% Tween® 20 O/N at 4°C. After this, membranes were incubated with secondary rabbit anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibody diluted 1:2000 in 0.5% (w/v) non-fat milk, 0.1% (w/v) BSA

in PBS containing 0.1% Tween® 20, for 1 hour at RT. Membranes were subsequently revealed using Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and the Amersham™ Imager 600 system (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). For loading protein control of the experiments, membranes were incubated with mouse anti-flotillin-1 (clone 18/Flotillin-1, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) diluted 1:1000 in PBS, and revealed as indicated.

#### *Three-dimensional (3-D) organoid generation*

Organoids derived from ARK-2 cells overexpressing EGFP-NTPDase2 or EGFP-NTPDase3 were generated following the protocol established by Eritja et al. 2010. First, a Matrigel bed (Matrigel® Growth Factor Reduced, Phenol Red Free; Corning, NY, USA) was created by carefully expanding a yellow tip 10 µL of 100% Matrigel per well in 96-well black plates for microscopy (Cell Culture Microplate, 96 well, PS, F-bottom (chimney well), µClear, black; Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) and incubated for 30 minutes at 37°C for Matrigel solidification. Next, cells were suspended at 2,000 cells per 100 µL in basal medium containing DMEM/F12 supplemented with 1 mM HEPES, 1mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 1% P/S, and 1% amphotericin B (Gibco). Cells were then mixed with 3% Matrigel and 2% Dextran-Charcoal-Coated Fetal Bovine Serum (DCC-FBS; Gibco) and seeded at 100 µL per well. Organoids were left for 5-7 days in the incubator without medium change and fixed with cold 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes.

#### *Immunofluorescence assays*

Three x 10<sup>4</sup> ARK-2 cells were plated on 12 mm poly-L-lysine treated coverslips in 24-well plates and grown until confluence. Coverslips were washed twice with PBS and fixed with 3.5% paraformaldehyde in PBS. Organoids were fixed with cold 4% paraformaldehyde for 10 minutes. Both 2D-grown cells and organoids were permeabilized by incubation with 0.2% (w/v) saponin (Merck Millipore) in PBS for 15 minutes at RT and incubated with PBS containing 20% normal goat serum (NGS; Gibco) and 0.2% gelatin (w/v) (Merck Millipore) for 1 h at RT. Coverslips and organoids were incubated O/N at 4°C with the mouse anti-hNTPDase2 and anti-hNTPDase3 primary antibodies diluted in PBS at 1:100 and 1:500, respectively. After three washes in PBS, samples were incubated with the secondary antibody, goat-anti mouse Alexa Fluor 555 (Invitrogen), for 1 h at RT in the case of coverslips and O/N at 4°C for organoids. Coverslips were then washed three times in PBS and mounted with aqueous mounting medium with DAPI (ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI, Life Technologies) for nucleus labeling. Organoids

were washed three times in PBS and incubated for 30 minutes with DAPI (Invitrogen) diluted 1:10.000 in PBS and then three final washes with PBS were made. Samples were observed and photographed under a Zeiss LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) using the objectives 40x and 63x Plan Apochromat with an aperture number (NA) of 1.3 and 1.4 respectively. Fluorescence images were processed with the ZEN 2.3 SP1 software (Zeiss).

#### *In situ ATPase enzyme activity*

ATPase *in situ* enzyme activity was detected on ARK-2 cell 2-D cultures and in 3-D organoids, using the Wachstein-Meisel staining method with some modifications (Wachstein et al. 1960; Aliagas et al. 2010, 2014). Fixed cells grown on coverslips and organoids obtained as indicated above were washed twice with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 and pre-incubated for 30 minutes at RT with 50 mM Tris-maleate buffer pH 7.4 containing 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 250 mM sucrose (blocking buffer). 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% 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 (Sigma-Aldrich), as inhibitor of the alkaline phosphatases, in the presence of 50, 100, 200, 500, or 1000 μM ATP as a substrate (incubation buffer). In the case of ectonucleotidase inhibition experiments with organoids, 1 mM of suramin (Sigma-Aldrich) or 1 mM NF279 (Tocris, Bristol, UK) were included in both the blocking and the incubation buffers. For coverslips, a final incubation volume of 300 μL/well was used; for the organoids, in 96-well plates, a total volume of 100 μL/well was used. Control assays in the absence of nucleotide were routinely included. Released inorganic phosphate was revealed by incubation with 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S (v/v) for exactly 1 minute. Nuclei in coverslips were counterstained with hematoxylin and mounted with Fluoromount™ (Sigma-Aldrich), or, alternatively, directly mounted with aqueous mounting medium with DAPI for direct fluorescence studies. Coverslips were observed with a light Nikon Eclipse E200 microscope (Nikon, Tokyo, Japan), and photographed with a light Leica DMD 108 microscope (Leica, Wetzlar, Germany). For fluorescence studies, coverslips were observed with Zeiss LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope (Zeiss), and fluorescence images were processed with the ZEN 2.3 SP1 software (Zeiss). Organoids were maintained at 4°C in 100 μL of 15 mM Tris plus 145 mM NaCl in water, and visualized and photographed with a Zeiss LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope (Zeiss) for fluorescence studies, and with an inverted Leica DMIRB microscope (Leica) for *in situ* ATPase activities.

*Combined in situ ATPase activity and immunolabeling techniques in organoids*

We adapted the methodology for the organoids to simultaneously detect the protein and its enzyme activity as already described by our group for tissue slices (Villamonte et al. 2018). First, organoids in 96-well plates were washed twice with phosphate-free buffer containing 15 mM Tris and 145 mM NaCl, and blocked for 1 h at RT with a solution containing 20% NGS and 0.2% gelatin (w/v) (Merck Millipore). Then the mouse anti-hNTPDase2 and anti-hNTPDase3 primary antibodies were incubated at 1:100 and 1:500, respectively, in 15 mM Tris, 145 mM NaCl, O/N at 4°C. After three washes in 15 mM Tris, 145 mM NaCl, *in situ* enzyme activity was carried out as indicated above. Once completed, the goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen) secondary antibody was added at a 1:500 dilution to 15 mM Tris, 145 mM NaCl, and incubated for 1 h at RT. After three washes, organoids were maintained at 4°C in phosphate-free buffer solution (100 µL) until visualization. The schematic protocol is shown in Fig. 1.

## Results and discussion

The work presented here provides new tools for the study of purinergic signaling. We have subcloned two members of the NTPDase/CD39 family of ectonucleotidases, the NTPDase2 (CD39L1) and the NTPDase3 (CD39L3), and expressed them as fusion proteins with EGFP in the endometrial cancer cell line ARK2. Supplementary Fig. 1 illustrates the subcloning procedure, with the human *ENTPD2* and *ENTPD3* cDNAs inserted in frame, as assessed by DNA sequencing, at 3'-terminus of the *EGFP* cDNA. Once transfected into ARK2 cells, protein expression was assessed with Western blot, and also fluorescence microscopy and direct GFP fluorescence, alone and in combination with specific primary antibodies (Fig. 2). In both cases, NTPDase2 and NTPDase3, the fluorescence was detected at the cell surface (Fig. 2Ab-c, h-i). Transfected proteins were detected by immunoblotting showing specificity for a unique band in the case of NTPDase2 (Fig. 2B), and, as already described by Munkonda et al. 2009, a monomeric and a dimeric forms for NTPDase3 (Fig. 2C). Moreover, we have demonstrated that the expressed proteins were enzymatically active (Fig. 2Ae-f, k-l). Therefore, the two EGFP-tagged proteins correctly expressed at the plasma cell membrane, where they can be localized by direct GFP fluorescence, and they displayed the ATPase activity distinctive of the native enzymes. This EGFP-tagged CD39 family of ectoenzymes enables monitoring of the activity and visualizing the exact location of these enzymes, with promising applicability in *in vivo* models.

Ectonucleotidase activities are traditionally assessed in cell and tissue homogenates or with purified enzymes using malachite green assays, which are highly convenient tools since they provide quantitative values of enzyme activity, allowing precise definition of enzyme kinetics and testing of the inhibitors' effectivity (Kirchgesser and Dahlmann 1990; Repen et al. 2012). *In situ* activity assays, using frozen tissue slides, or fixed cells grown on coverslips, provide valuable complementary information since they identify the enzymes in the context of the cell and tissue microenvironment, also allowing the use of inhibitors. To our knowledge, to date, there have been no enzyme activity reports on 3D models.

Organoids have been reported from a number of organs and tissues, including those from the female reproductive tract such as vulva, vagina, cervix, ovary, and oviduct, and also from both healthy and pathological endometrium (reviewed by Heremans et al. 2021), enabling the testing of molecules and drugs for different purposes such as infertility studies, endometrial cancer research, and identification of inflammatory pathologies such as endometriosis (Eritja et al. 2015; Boretto et al. 2019; Stejskalová et al.

2021). Organoids derived from tumoral endometrium maintain the tumor epithelial phenotype and some of the clinical features of the tumors (Boretto et al. 2019; Gu et al. 2020). There have been, however, no studies of ectonucleotidase enzyme activity in organoids. Recently, it has been described that cervical cancer cell spheroids decrease CD73 protein expression and enzyme activity compared with a monolayer system, probably affecting cell adhesion, tumor spreading and metastasis (Iser IC et al. 2021). Here we obtained organoids from serous endometrial carcinoma ARK-2 cells, non-transfected or transfected with the EGFP-hNTPDase2- or EGFP-hNTPDase3-expressing constructs. We show that organoids formed correctly and displayed the cell membrane expression of the overexpressed proteins, detectable by direct GFP fluorescence (Fig. 3). We have adapted the *in situ* cytochemistry phosphate-lead method traditionally carried out with 2D samples to these 3D organoids. The complete protocol was carried out in the same 96-well plates where the organoids were generated, taking into account that phosphate-containing buffers should be avoided. We used 15mM Tris with 145mM NaCl, instead of phosphate-buffered saline (PBS). Brownish phosphate-lead precipitates were already detected at 50  $\mu$ M ATP for both NTPDase2- and NTPDase3-expressing organoids; the color intensity increased with the nucleotide concentration, reaching a peak at 200  $\mu$ M (Fig. 4A). Due to the 3D architecture of organoids, which overlaps with the activity of different cell layers, we recommend the use of a lower nucleotide concentration than that for 2D tissue or cell assays. We have also demonstrated that the effect of ectonucleotidase inhibitors can be studied in organoids, where decreased phosphate lead deposits were seen in the presence of inhibitors. This is shown in Fig. 5 where organoids were incubated in the presence of two different inhibitors, suramin and NF279.

A step forward with this methodology is the simultaneous detection of the protein, using specific antibodies, and the enzyme activity—a technique that has previously been described for tissue slices (Villamonte et al. 2018; Losenkova et al. 2020). We adjusted the technique to organoids (Fig. 1) and demonstrated that enzyme activity and immunodetection are feasible in the same organoid (Fig. 4B). The protocol described here is also compatible with the use of primary culture, tissue, or organ-derived organoids. For this simultaneous detection of the protein and its activity, we recommend the use of antibodies to immunodetect the protein since, even at low substrate concentrations, brown deposits generated by the activity obstruct the GFP fluorescence associated with the ectoenzyme. This quenching effect is seen in Fig. 5 for organoids and in Supplementary Fig. 2 with cells in coverslips. This method also allows the use of inhibitors as shown for NTPDase3-expressing organoids when the antibody B3<sub>S</sub>10,



with inhibitory effect (Munkonda et al. 2009), was used to detect NTPDase3. In this case, although the protein was well detected, the enzyme activity, identified as brown precipitates, was decreased due to the inhibitory effect of the antibody binding to NTPDase3 (Fig. 4B).

In conclusion, the development of new tools for the study of ectonucleotidases, together with the updating of current methodologies shown here, are important new findings in the field of purinergic signaling. Recent research has focused on the simultaneous detection of ectonucleotidases and alkaline phosphatase activities (Losenkova et al. 2020), on the precise quantification of CD73 enzyme histochemistry staining in tissue using image processing (Dragić et al. 2019), and on nucleotide-imaging techniques (Conley et al. 2017). In addition, functional studies in organoids are underway, such as the silencing of CD73 in breast cancer cell-derived organoids for epithelial-mesenchymal transition (EMT) status and metastatic potential determination (Petruk et al. 2021). Future experiments could be aimed at improving the tridimensional system, introducing, for example by introducing culturing of tumor stromal cells to observe the consequences of cellular crosstalk that may occur (Lou et al. 2022), indispensable in this case to observe the exact consequences of over expressing the ectonucleotidases. We have demonstrated that the combined use of fluorescent immunolabeling using specific primary antibodies against NTPDases and *in situ* cytochemistry allows this procedure not only in formalin-fixed frozen tissue, but also in organoids, and demonstrates that it may be useful in the screening of compounds and molecules (such as antibodies), and in targeted therapies (Imai et al. 2000) with NTPDase inhibitory capacity.

### **Acknowledgments and funding sources**

We thank CERCA Program (Generalitat de Catalunya) for institutional support and Tom Yohannan for language editing.

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III (grant number: PI18/00541 to MMS), co-funded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-“a Way to Build Europe”-//Fondos FEDER “una manera de hacer europa”. XMG received support from AECC (Asociación Española Contra el Cáncer, GCTRA 18014MATI) and CIBERONC (CB16/12/00231). JS received support from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC; RGPIN-2016-05867). ARM is the recipient of a PhD fellowship from the AECC (Asociación Española Contra el Cáncer).

### **Conflict of interest**

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

## 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)* 199:191–7. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x>
- Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M (2014) High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators Inflamm* 2014:.. <https://doi.org/10.1155/2014/509027>
- Aliagas E, Vidal A, Torrejón-Escribano B, Taco M del R, Ponce J, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Condom E, Martín-Satué M (2013) Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal* 9:227–237. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9345-0>
- Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J (2017) The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* 276:121–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12528>
- Allard D, Chrobak P, Allard B, Messaoudi N, Stagg J (2019) Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. *Immunol Lett* 205:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.05.001>
- Boretto M, Maenhoudt N, Luo X, et al (2019) Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nat Cell Biol* 21:1041–1051. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0360-z>
- Bowser JL, Broaddus RR (2016) CD73s protection of epithelial integrity: Thinking beyond the barrier. *Tissue Barriers* 4:1–11. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1224963>
- Chadwick BP, Frischauf A-M (1997) Cloning and mapping of a human and mouse gene with homology to ecto-ATPase genes
- Conley JM, Radhakrishnan S, Valentino SA, Tantama M (2017) Imaging extracellular ATP with a genetically-encoded, ratiometric fluorescent sensor. *PLoS One* 12:1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187481>
- Di Virgilio F, Adinolfi E (2017) Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*

36:293–303. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>

- Dragić M, Zarić M, Mitrović N, Nedeljković N, Grković I (2019) Application of Gray Level Co-Occurrence Matrix Analysis as a New Method for Enzyme Histochemistry Quantification. *Microsc Microanal* 1–9. <https://doi.org/10.1017/S1431927618016306>
- English DP, Roque DM, Carrara L, Lopez S, Bellone S, Cocco E, Bortolomai I, Schwartz PE, Rutherford T, Santin AD (2013) HER2/neu gene amplification determines the sensitivity of uterine serous carcinoma cell lines to AZD8055, a novel dual mTORC1/2 inhibitor. *Gynecol Oncol* 131:753–758. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.033>
- Eritja N, Dolcet X, Matias-Guiu X (2013) Three-dimensional epithelial cultures: a tool to model cancer development and progression. *Histol Histopathol* 28:1245–56. <https://doi.org/10.14670/HH-28.1245>
- Eritja N, Llobet D, Domingo M, Santacana M, Yeramian A, Matias-Guiu X, Dolcet X (2010) A novel three-dimensional culture system of polarized epithelial cells to study endometrial carcinogenesis. *Am J Pathol* 176:2722–2731. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090974>
- Eritja N, Santacana M, Maiques O, Gonzalez-Tallada X, Dolcet X, Matias-Guiu X (2015) Modeling glands with PTEN deficient cells and microscopic methods for assessing PTEN loss: Endometrial cancer as a model. *Methods* 77:31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.001>
- Gu ZY, Jia SZ, Liu S, Leng JH (2020) Endometrial Organoids: A New Model for the Research of Endometrial-Related Diseases. *Biol Reprod* 103:918–926. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa124>
- Haas CB, Lovászi M, Braganhol E, Pacher P, Haskó G (2021) Ectonucleotidases in Inflammation, Immunity, and Cancer. *J Immunol* 206:1983–1990. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001342>
- Heremans R, Jan Z, Timmerman D, Vankelecom H (2021) Organoids of the Female Reproductive Tract: Innovative Tools to Study Desired to Unwelcome Processes. *Front Cell Dev Biol* 9:1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661472>
- Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, Verkhatsky A, Sperlagh B, Yu SG, Huang C, Tang Y (2021) From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 6:. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>

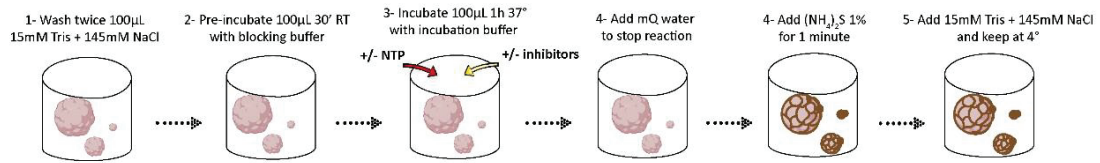
- Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Kaczmarek E, Csizmadia E, Bach FH, Robson SC (2000) Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation* 70:864–70. <https://doi.org/10.1097/00007890-200009270-00003>
- Karasaki S, Okigaki T (1976) Surface membrane nucleoside triphosphatase activity and tumorigenicity of cultured liver epithelial cells. *Cancer Res* 36:4491–9
- Kirchgesser M, Dahlmann N (1990) A Colorimetric Assay for the Determination of Acid Nucleoside Triphosphatase Activity. *Clin Chem Lab Med* 28:407–412. <https://doi.org/10.1515/cclm.1990.28.6.407>
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334:199–217. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0681-x>
- Losenkova K, Paul M, Irjala H, Jalkanen S, Yegutkin GG (2020) Histochemical approach for simultaneous detection of ectonucleotidase and alkaline phosphatase activity in tissues. *Methods Mol Biol* 2041:107–116
- Lou L, Kong S, Sun Y, Zhang Z, Wang H (2022) Human Endometrial Organoids: Recent Research Progress and Potential Applications. *Front Cell Dev Biol* 10:1–7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.844623>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Martín-Satué M, Rodríguez-Martínez A, Trapero C (2020) In Situ Identification of Ectoenzymes Involved in the Hydrolysis of Extracellular Nucleotides. In: *Immunohistochemistry - The Ageless Biotechnology*. IntechOpen
- Maru Y, Tanaka N, Itami M, Hippo Y (2019) Efficient use of patient-derived organoids as a preclinical model for gynecologic tumors. *Gynecol Oncol* 154:189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.05.005>
- Munkonda MN, Pelletier J, Ivanenkov V V., 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* 276:479–496. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06797.x>
- Pelletier J, Agonsanou H, Delvalle N, Fausther M, Salem M, Gulbransen B, Sévigny J (2017) Generation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies to human NTPDase2 including a blocking antibody. *Purinergic Signal* 13:293–304. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9561-8>
- Petruk N, Tuominen S, Åkerfelt M, Mattsson J, Sandholm J, Nees M, Yegutkin GG, Jukkola A, Tuomela J, Selander KS (2021) CD73 facilitates EMT progression and promotes lung metastases in triple-negative breast cancer. *Sci Rep* 11:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85379-z>
- Repen B, Schneider E, Alexiev U (2012) Optimization of a malachite green assay for detection of ATP hydrolysis by solubilized membrane proteins. *Anal Biochem* 426:103–105. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.04.016>
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>
- Rodríguez-Martínez A, Trapero C, Vidal A, Piulats JM, de Aranda IG, Sévigny J, Fernández-Montolí ME, Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M (2021) 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* 11:1–19. <https://doi.org/10.3390/jpm11050331>
- Shankaran A, Prasad K, Chaudhari S, Brand A, Satyamoorthy K (2021) Advances in development and application of human organoids. *3 Biotech* 11:1–22. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02815-7>
- Smith TM, Kirley TL (1998) Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1386:65–78. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00063-6)
- Stejskalová A, Vankelecom H, Sourouni M, Ho MY, Götte M, Almquist BD (2021) In vitro modelling of the physiological and diseased female reproductive system☆. *Acta Biomater*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.04.032>

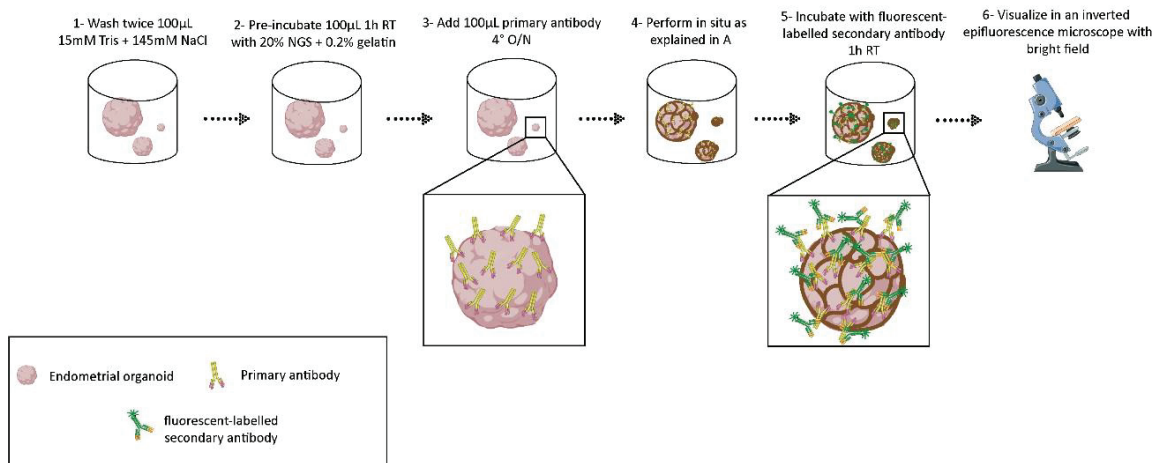
- Trapero C, Vidal A, Rodríguez-Martínez A, Sévigny J, Ponce J, Coroleu B, Matias-Guiu X, Martín-Satué M (2019) The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: a novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells. *Purinergic Signal* 15:225–236. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09656-3>
- Villamonte ML, Torrejón-Escribano B, Rodríguez-Martínez A, Trapero C, Vidal A, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Matías-Guiu X, Martín-Satué M (2018) Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity. *Histochem Cell Biol* 149:269–276. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1627-8>
- Wachstein M, Meisel E, Niedzwiedz A (1960) Histochemical demonstration of mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead-adenosine triphosphate technique. *J Histochem Cytochem* 8:387–8. <https://doi.org/10.1177/8.5.387>
- Yegutkin GG (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:473–497. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>
- Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>
- Zhang B, Cheng B, Li FS, Ding JH, Feng YY, Zhuo GZ, Wei HF, Zhao K (2015a) High expression of CD39/ENTPD1 in malignant epithelial cells of human rectal adenocarcinoma. *Tumor Biol* 36:9411–9419. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3683-9>
- Zhang B, Song B, Wang X, Chang XS, Pang T, Zhang X, Yin K, Fang GE (2015b) The expression and clinical significance of CD73 molecule in human rectal adenocarcinoma. *Tumor Biol* 36:5459–5466. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3212-x>
- Zimmermann H (2021) History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. *Biochem Pharmacol* 187:114322. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114322>
- Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>

## Figure legends

### A. In situ cytochemistry

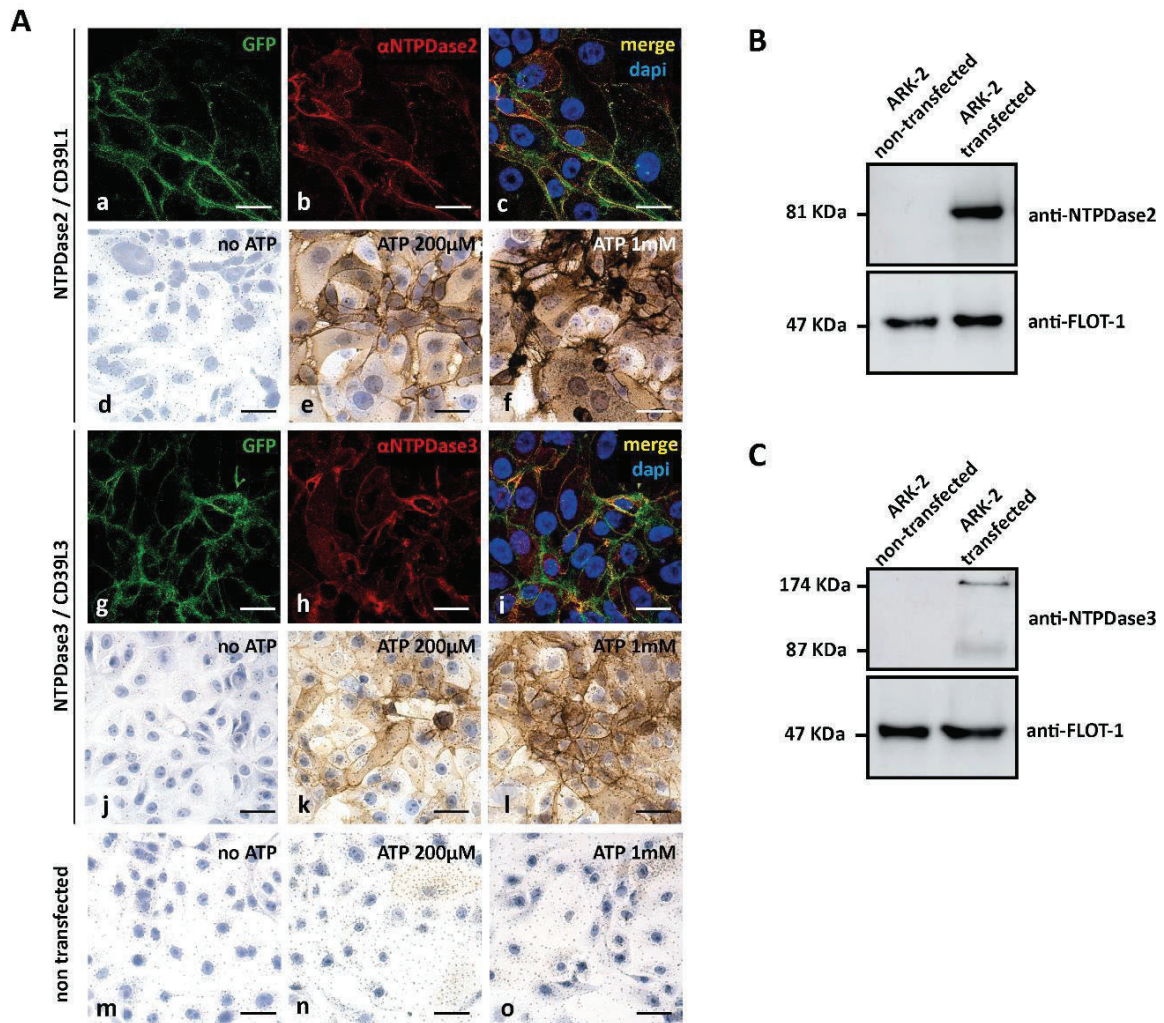


### B. Combined immunolabelling with in situ cytochemistry

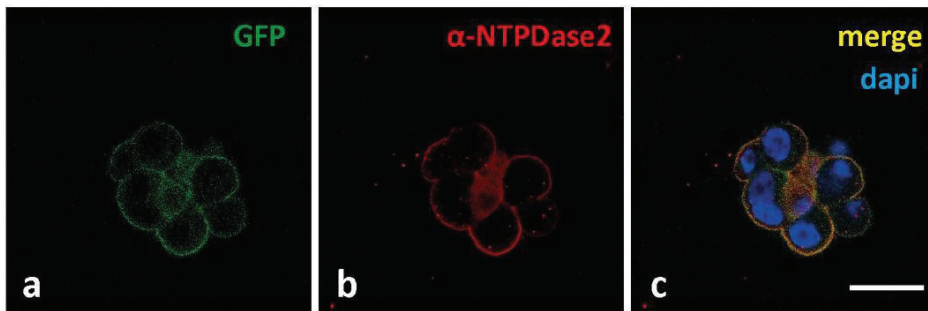
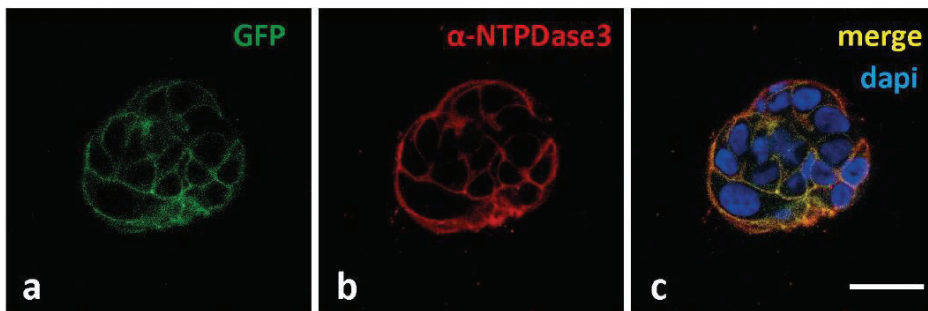


**Fig. 1** Illustration detailing the procedure of *in situ* enzyme cytochemistry alone (**A**) and in combination with immunolabeling (**B**) applied to organoids derived from endometrial carcinoma cell cultures for the co-visualization of the protein expression and enzyme activity of NTPDases. The two procedures were carried out in 96-well plates where organoids were formed on a Matrigel bed. Organoids were fixed with cold 4% PFA for 10 minutes. In the combined technique (**B**), the primary antibody has to be incubated before performing the *in situ* enzyme cytochemistry. Fluorescent secondary antibody was incubated after revealing the ATPase enzyme activity.

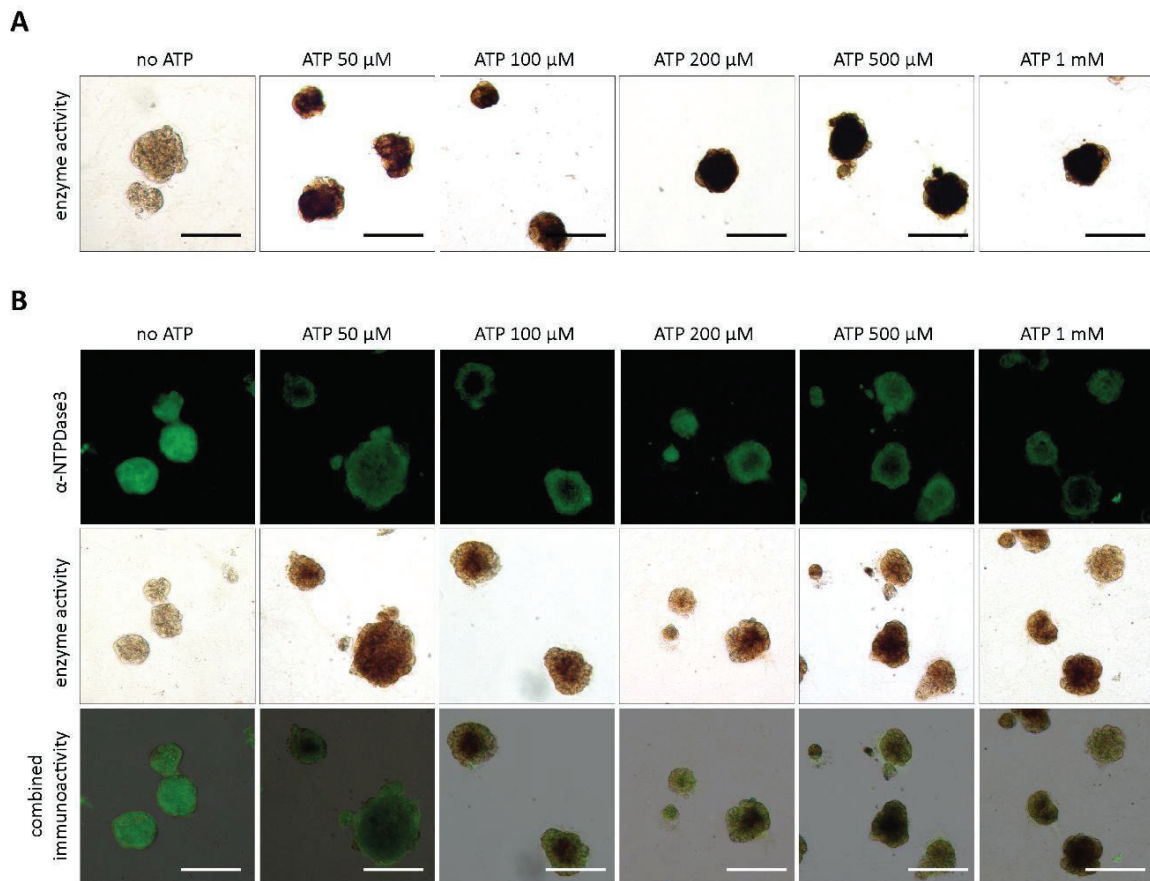




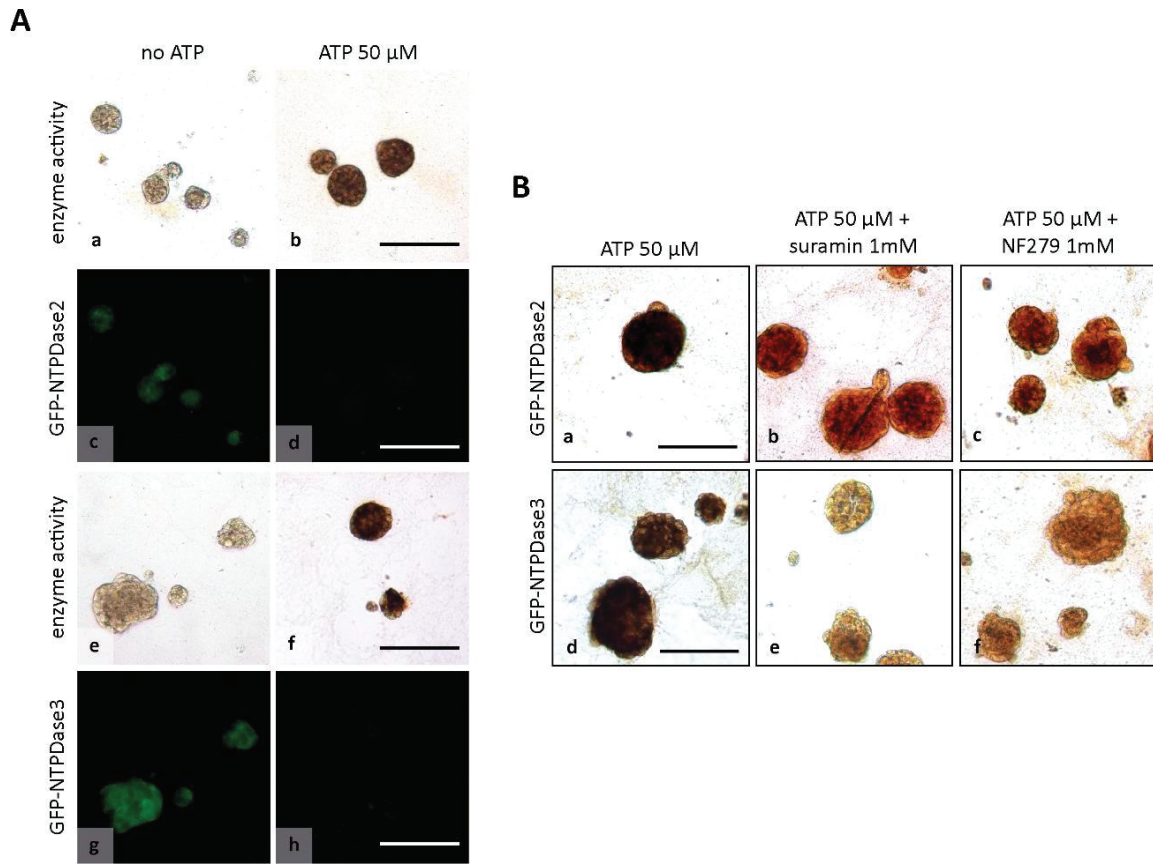
**Fig. 2 A** Confocal fluorescence (**a-c**, **g-i**) and *in situ* ATPase enzyme activity (**d-f**, **j-o**) images of ARK-2 cells transfected with GFP-NTPDase2 (**a-f**), with GFP-NTPDase3 (**g-i**), and non-transfected (**m-o**). The expression of the fused protein was detected at the cell membrane both by direct GFP fluorescence (green; **a**, **g**) and by immunofluorescence with the use of anti-NTPDase2 and anti-NTPDase3 antibodies (in red; **b**, **h**). Colocalization of green and red fluorescence is shown (yellow; **c**, **i**). Nuclei are seen in blue (*dapi*, **c**, **i**). An increase in the amount of hydrolyzed ATP is observed in cultures overexpressing NTPDase2 and NTPDase3 both at 200  $\mu$ M (**e**, **k**) and 1 mM (**f**, **l**) ATP, compared with non-transfected cultures (**n**, **o**). The controls of the experiment were performed in the absence of ATP (*no ATP*, **d**, **j**, **m**). Scale bars are 50  $\mu$ m (**d-f**, **j-o**) and 25  $\mu$ m (**a-c**, **g-i**). **B** Immunoblotting of membrane-enriched cell lysates showing the presence of the overexpressed proteins: an 81 KDa band in the case of GFP-NTPDase2 and two bands, of 174 and 87 KDa, respectively, for those transfected with GFP-NTPDase3. No bands were seen in the lanes of non-transfected cultures. Flotilin (**FLOT-1**) was used as a loading control of the experiments.

**A****B**

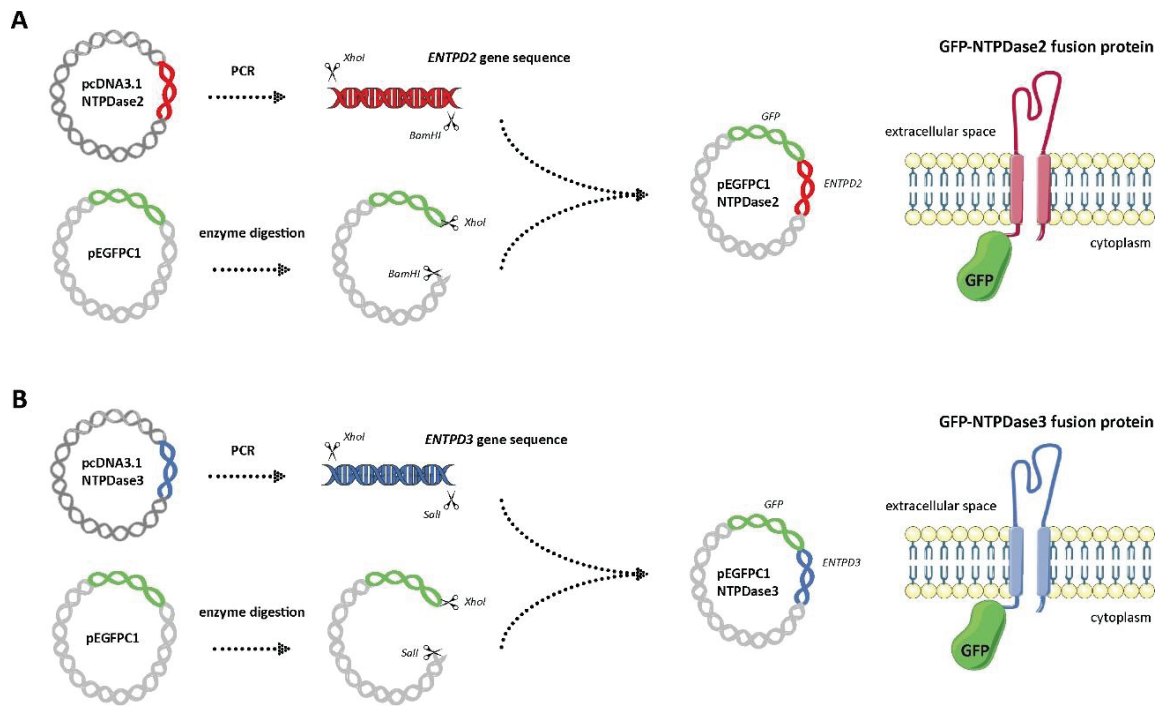
**Fig. 3** Confocal fluorescence images of organoids derived from EGFP-NTPDase2- (**A**) and EGFP-NTPDase3- (**B**) transfected ARK-2 cells. The GFP-associated fluorescence of the GFP-NTPDase2- (**Aa**) and GFP-NTPDase3- (**Ba**) expressing organoids lines the cell membrane, coinciding with the expression of NTPDase2 (**Ab**) and NTPDase3 (**Bb**), respectively, detected by immunofluorescence. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ .



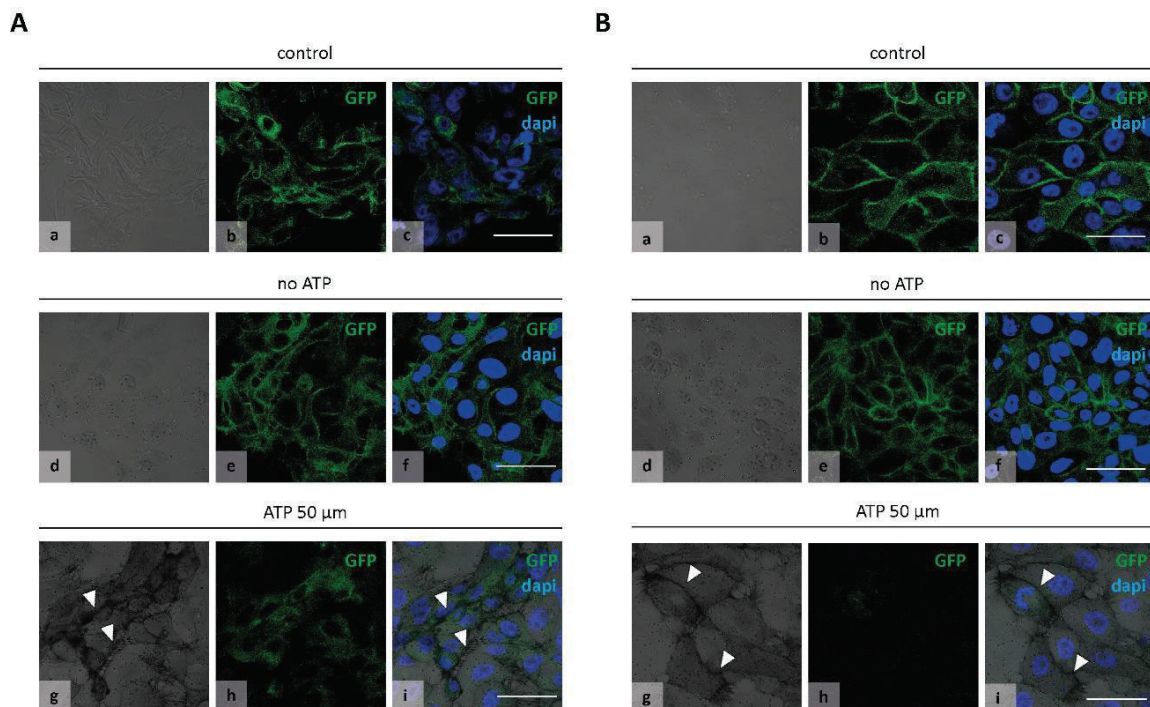
**Fig. 4** *In situ* ATPase enzyme cytochemistry alone (**A**) and in combination with immunofluorescence using a specific antibody anti-NTPDase3 (**B**) in organoids derived from EGFP-NTPDase3 overexpressing ARK-2 cells. Brown deposits corresponding to ATP hydrolysis are seen in all the ATP concentrations tested (50, 100, 200, 500  $\mu$ M, and 1 mM) with the brown color intensity progressively increasing with the ATP concentration. The control of the experiment was performed in the absence of ATP (*no ATP*). The combined technique (**B**) allowed co-visualization of protein expression and enzyme activity in each organoid. Note that in this case, the antibody anti-NTPDase3 used for immunodetection had an enzyme inhibitory effect as seen with the lighter brown deposits compared with **A**. Scale bars, 250  $\mu$ m.



**Fig. 5 A** *In situ* ATPase activity (**a, b, e, f**) and epifluorescence images (**c, d, g, h**) of EGFP-NTPDase2 (**a-d**) and EGFP-NTPDase3 (**e-h**) overexpressing ARK-2 cell-derived organoids. Brown deposits are formed in the presence of ATP (**b, f**) while a background is seen in the absence of substrate (*no ATP*, **a, e**). GFP-associated fluorescence signal was only detected in the controls with no ATP added to the reaction (**c, g**). When ATP is present, the GFP-associated fluorescence is undetectable, probably due to the phosphate deposits that quench the fluorescence (**d, h**). **B** *In situ* ATP activity of EGFP-NTPDase2- (**a-c**) and EGFP-NTPDase3- (**d-f**) transfected ARK-2 culture-derived organoids in the presence of 50  $\mu\text{M}$  of ATP (**a, d**), 1 mM suramin (**b, e**), and 1 mM NF279 (**c, f**). When the ectonucleotidase inhibitors suramin and NF279 are present (**b, c, e, f**) a significant decrease in the amount of hydrolyzed ATP is seen. Scale bars are 500  $\mu\text{m}$  (**A**) and 250  $\mu\text{m}$  (**B**).



**Suppl. 1** Cloning strategy to generate the plasmids expressing EGFP-NTPDase2 (**A**) and EGFP-NTPDase3 (**B**) fusion protein used for subsequent transfection into ARK-2 endometrial carcinoma cells.



**Suppl. 2** Confocal microscopy images of *in situ* ATP enzyme cytochemistry performed in EGFP-NTPDase2- (**A**) and GFP-NTPDase3- (**B**) transfected ARK-2 cells. The GFP signal is clearly detected in

the control condition (**b, c**), in which no cytochemistry procedure was applied, and in the absence of ATP (**e, f**), in which all the reagents of the cytochemistry assay were present except ATP. The GFP-associated signal of NTPDase2 and 3 is strongly decreased in the presence of ATP (**h, i**), where lead phosphate deposits (*arrowheads, g*) mask the fluorescence. Images a, d, and g were taken using bright field parameters. **Ai** and **Bi** are merged images of bright field and fluorescent EGFP-NTPDase2 (**A**) and EGFP-NTPDase3 (**B**) signal. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ .



# DISCUSIÓN





---

El ATP y la adenosina extracelulares juegan un papel en el cáncer. A través de la acción sobre sus receptores se hallan implicados en la progresión tumoral. Se propone que el aumento de la adenosina en el microambiente de los tumores ejerce un efecto inmunosupresor, favoreciendo la inmuno-evasión tumoral y el progreso de la enfermedad (Antonioli et al. 2014). En este contexto, el eje adenosinérgico compuesto por el tándem de enzimas CD39-CD73 se halla incrementado en varios tipos de cáncer (Zhang et al. 2015a, b; Mandapathil et al. 2018a, b). Este aumento se ha utilizado para el diseño de terapias antitumorales basadas en el bloqueo de CD39 y en especial de CD73, mediante el uso de anticuerpos, en diversos tipos de cáncer (Young et al. 2016; Perrot et al. 2019; Augustin et al. 2022). Este tándem es el más eficiente en la formación de adenosina, pero no se trata de las únicas enzimas que se expresan en los tumores capaces de generar adenosina (Stella et al. 2010; Li et al. 2019). Además, otros elementos de la señalización purinérgica también se han identificado en muestras tumorales, como es el caso de los receptores de nucleótidos P2 (Li et al. 2007; Colas et al. 2011).

Estudios previos del grupo han demostrado que en el endometrio no tumoral se expresan las cuatro familias de ectonucleotidasas y que participan en la fisiología de este (Aliagas et al. 2013; Trapero et al. 2019b) y que en el endometrio tumoral hay una elevada actividad enzimática de CD39 y CD73 en el estroma (Aliagas et al. 2014). Su acción secuencial podría ser la responsable de la formación de grandes cantidades de adenosina extracelular detectada en el microambiente tumoral, como sucede en varios tipos de tumores (Perrot et al. 2019). Teniendo en cuenta que estas no son las únicas ectonucleotidasas que se expresan en el cáncer, en la presente Tesis doctoral hemos realizado un estudio detallado de la expresión y función de las familias de ectonucleotidasas en el cáncer de endometrio.

El cáncer de endometrio es una de las patologías gineoncológicas más prevalentes en los países occidentales y está asociado a varias causas tanto genéticas como relacionadas con factores de riesgo, aunque la mayoría de las formas son de etiología espontánea. La heterogeneidad que presentan los de tumores de endometrio (Yeramian et al. 2013; Jové et al. 2016) demanda más investigación para el diagnóstico y el diseño de nuevas terapias que confluirían en mejorar la calidad de vida de las pacientes (Hutt et al. 2019).

La identificación de antígenos específicos, diferenciales, en los tumores, pretende mejorar la interpretación clínica del tumor y su pronóstico, el diagnóstico y la decisión del tratamiento. El desarrollo y validación de anticuerpos específicos contra antígenos de membrana celulares es por tanto de gran interés en la investigación oncológica.

En este trabajo nos hemos propuesto analizar el conjunto de ectonucleotidasas en los tumores de endometrio, más allá del tándem CD39-CD73 y conocer su papel en los tumores. Así, el Objetivo 1 de esta tesis doctoral ha consistido en evaluar la firma purinérgica, y en especial de las ectonucleotidasas, en el cáncer de endometrio. Para ello, hemos estudiado mediante inmunohistoquímica, tejido tumoral primario de pacientes con cáncer de endometrio. En el endometrio tumoral, las ectonucleotidasas predominantes son CD39 y CD73, y la expresión diferencial de CD73 se ha relacionado con el grado tumoral (Bowser et al. 2016; Kurnit et al. 2021). En el estroma de los tumores existe una elevada actividad adenosinérgica de este eje. NTPDasa2 también se expresa en el estroma, aunque su expresión desaparece en relación al fenotipo invasivo de los tumores.

Hemos confirmado la expresión de NTPDasa2 y NTPDasa3 en el componente epitelial de los tumores, con niveles significativamente más elevados en los tumores de bajo grado. En los tumores de alto grado la expresión epitelial de NTPDasa3 se pierde, lo que nos llevó a analizar su papel en el cáncer. Los fenotipos invasivos también pierden la expresión estromal de NTPDasa2. Según este patrón, en las células epiteliales tumorales en el cáncer de endometrio, el tándem más eficiente en la hidrólisis de ATP hasta adenosina, es NTPDasa3-CD73. Otros enzimas, como ADA, PLAP y CD26, también se han detectado en el estroma de tumores de endometrio sin cambios de expresión entre tipos tumorales. Por otra parte, hemos detectado niveles estromales más elevados de CD73 en los tumores de tipo *copy number high* caracterizados por presentar un microambiente inmunosupresor y poca respuesta a inmunoterapia (Piulats et al. 2017). La valoración de CD73 como otro posible marcador inmunohistoquímico de diagnóstico y progresión del cáncer de endometrio teniendo en cuenta a la clasificación molecular puede ser de gran utilidad.

De este estudio destaca el rol de las ectonucleotidasas NTPDasa2 y NTPDasa3 en el control de los mecanismos de progresión tumoral en el cáncer de endometrio. La NTPDasa2 se ha relacionado con un control de la homeostasis de varios tipos de células madre, sobre todo neuronales (Zippel et al. 2012; Scarfi 2014; Roszek and Wujak 2018). En el endometrio no tumoral, la expresión de NTPDasa2 se confina al estroma de la capa basal y al polo apical de las células epiteliales glandulares y luminales, sin cambios durante el ciclo menstrual. Además, las células madre mesenquimales endometriales son positivas para NTPDasa2 lo que refuerza la teoría de que tiene una importante función reguladora en los nichos progenitores de varias localizaciones (Trapero et al. 2019b). En este sentido, hemos ampliado los estudios sobre la NTPDasa2 haciendo una extensa evaluación de su expresión epitelial y estromal en los diferentes tumores de endometrio disponibles.

En el componente epitelial, los tumores de bajo grado presentan un patrón de expresión de NTPDasa2 apical, asociado a los cilios, similar al endometrio no tumoral. La presencia de cilios se ha relacionado con tumores más diferenciados y de bajo grado, lo que coincide con los resultados. En los tumores de alto grado, NTPDasa2 presenta una distribución más general en la membrana celular, con expresión en toda su superficie. Los tumores de grado intermedio presentan ambos patrones de expresión combinados, indicando un estado de transición. Estos resultados indican que la NTPDasa2 podría promover fenotipos invasivos y malignos en el cáncer de endometrio, como se ha descrito en el carcinoma hepatocelular, donde la ectoenzima promueve el crecimiento tumoral y el mantenimiento de las células supresoras derivadas de la estirpe mieloide, permitiendo a las células tumorales escapar del sistema inmunitario natural. En los gliomas se ha detectado una baja actividad ectoenzimática de NTPDasa2, donde el aumento de expresión favorece la progresión tumoral en modelos animales de cáncer (Chiu et al. 2017).

Por otro lado, en el estroma tumoral, la expresión de NTPDasa2 se limita a la unión tumor-miometrio, pero los fenotipos invasivos pierden esta. La homeostasis endometrial normal depende de la integridad de la unión endometrial-miometrial, el área de contacto íntimo entre la parte más profunda parte de la basal y el miometrio, y alteraciones en el endometrio-miometrio zona de unión (por ejemplo, cambios en el

---

grosor) puede conducir a trastornos como la endometriosis, adenomiosis e incluso cáncer. Los tumores sin invasión miometrial mantienen la expresión de NTPDasa2 en la unión tumor-miometrio, que también se identifica en lesiones no malignas derivadas del estroma endometrial basal, como la adenomiosis. Es de gran interés el estudio de la NTPDasa2 en el estroma tumoral, ya que a diferencia de otros marcadores como IFITM1/CD225, que tiene elevada expresión en todo el conjunto del estroma, NTPDasa2 tiene una localización más precisa que podría ayudar a diferenciar la invasión del cáncer de endometrio de otras entidades.

Estudios previos han demostrado la pérdida de NTPDasa2 como mecanismo de inducción de fenotipos similares a miofibroblastos en el hígado (Jhandier et al. 2005). La adopción de estos fenotipos se ha descrito en varios tipos de cáncer como fenómeno asociado a la invasión estromal (De Wever and Mareel 2002; Kawashiri et al. 2009; Otranto et al. 2012). Este fenotipo es adquirido en los tumores, por los denominados fibroblastos asociados a cáncer de tipo II (CAF, del inglés *cancer-associated fibroblast*) que tienen expresión de la actina del músculo liso (SMA, del inglés *smooth muscle actin*) (Augsten 2014). Los CAFs de tipo II, positivos para SMA están presentes en las zonas invasivas endometriales y, por lo tanto, carecen de la expresión de la NTPDasa2. Los CAFs además han sido propuestos como activadores de los mecanismos de invasión en los tumores de endometrio (Subramaniam et al. 2013; Teng et al. 2016). Además, se ha detectado la presencia de células madre mesenquimales endometriales perivasculares (eMSC) que co expresan la proteína SUSD2 y NTPDasa2 también en muestras de cáncer de endometrio.

La NTPDasa2, por lo tanto, podría estar ejerciendo un control de la diferenciación estromal hacia fenotipos de tipo miofibroblasto con alta capacidad invasiva en el cáncer de endometrio. Su pérdida representaría un menor control y una consecuente mayor progresión tumoral y malignidad. Los niveles más altos de expresión génica de *ENTPD2* en pacientes con cáncer de endometrio también coinciden con un mejor pronóstico clínico de la enfermedad. Nuestros resultados apuntan a la utilidad de NTPDasa2 como marcador de invasión tumoral en EC, especialmente en los casos en los que coexiste con otras alteraciones del endometrio, como la adenomiosis, lo que en ocasiones dificulta la evaluación de parámetros de invasión tumoral (Ali A et al. 2007). En los casos de zonas con presencia de invasión miometrial y adenomiosis, el análisis de la expresión de

NTPDasa2 podría ayudar a la diferenciación, ya que la adenomiosis conserva NTPDasa2 mientras que las áreas tumorales invasivas y desmoplásticas del tumor carecen de expresión.

La falta de aproximaciones experimentales para el estudio de estas moléculas en diferentes modelos, y el auge de nuevas metodologías de estudio como los organoides en tres dimensiones o los *xenografts* derivados de pacientes (PDX, del inglés *patient-derived xenografts*) en patología ginecológica (Heremans et al. 2021), nos ha llevado diseñar nuevas herramientas moleculares para el estudio de la señalización purinérgica en este contexto.

A partir de los resultados obtenidos del objetivo 1, planteamos el desarrollo de un modelo celular de estudio de NTPDasa2 y de NTPDasa3. Así, subclonamos *ENTPD2* y *ENTPD3* en vectores de expresión para transfectar células y sobreexpresar estas proteínas como proteínas de fusión a EGFP en células de cáncer de endometrio, utilizando como modelo la línea de cáncer de tipo seroso ARK-2. Demostramos que tanto NTPDasa2 como NTPDasa3 se expresan en la membrana celular, donde tienen la actividad hidrolítica de la proteína nativa, siendo así herramientas moleculares válidas para estudiar la actividad enzimática monitorizando la fluorescencia de GFP en la membrana celular. Ello nos permitió utilizar estas células para estudios en cultivos celulares en 3D y en un modelo de tumorigénesis en ratón. Los organoides actualmente representan un interesante modelo para el estudio de diferentes patologías puesto que recrean las características tridimensionales de las células en su entorno natural y mantienen propiedades que se observan en los tumores de origen (Boretto et al. 2019; Gu et al. 2020).

Hemos generado organoides derivados de las células transfectadas, confirmando su uso como modelo de estudio. Hemos comprobado la funcionalidad de la técnica combinada de la visualización de la expresión de las ectoenzimas y su actividad enzimática, descrita anteriormente solo en tejido oviductal (Villamonte et al. 2018), en nuestro modelo de sobreexpresión tanto en dos como en tres dimensiones usando los organoides tumorales. Estos, además, son sensibles al uso de inhibidores de la función de las ectonucleotidasas. Sin embargo, hay que tener en cuenta la expresión de otros

---

elementos participantes que puedan influir en el comportamiento de los organoides, como puede ser CD73, donde en células de cáncer de cérvix se ha observado una disminución de éste en esferoides con afectación en la adhesión y migración celulares (Iser IC et al 2021).

El modelo celular de sobreexpresión de NTPDasas puede usarse para el cribado de compuestos, moléculas y terapias dirigidas a la inhibición enzimática de las NTPDasas.

En el componente epitelial de los tumores, la expresión de NTPDasa3 disminuye con el grado tumoral. Además, las pacientes afectadas de cáncer de endometrio con mayor nivel de *ENTPD3* tienen tasas más altas de supervivencia y mejor progresión clínica de la enfermedad, fenómeno también observado en las pacientes de cáncer de mama (Li et al. 2019). Niveles altos combinados de *ENTPD2* y *ENTPD3* también resultan en valores más favorables. Por otro lado, una elevada expresión de los genes *CD39* y *ENT5* se relaciona con un peor pronóstico en varios tipos de cáncer, influyendo positivamente en el efecto inmunosupresor antitumoral de la adenosina generada (Deaglio et al. 2007; Borsellino et al. 2007; Shi et al. 2019).

Los ensayos celulares in vitro han mostrado que la sobreexpresión de NTPDasa3 disminuye la proliferación e incrementa la migración celular. Además, los organoides en tres dimensiones con sobreexpresión de NTPDasa3 son de un tamaño menor. In vivo, las células NTPDasa3<sup>+</sup> forman tumores subcutáneos más pequeños que las células sin expresión de NTPDasa3, coincidiendo con lo observado in vitro y poniendo en evidencia la relación entre NTPDasa3 y la progresión tumoral.

Hemos analizado diferentes vías relacionadas con proliferación y migración. Las células que expresan NTPDasa3 tienen niveles inferiores de AKT en su forma fosforilada Ser473. AKT/PKB es una serina/treonina quinasa que promueve la supervivencia, proliferación y crecimiento celular, donde la expresión disminuida observada puede relacionarse con la menor proliferación celular. En el cáncer de endometrio, FGFR2, un receptor del tipo tirosina-quinasa que activa la señalización de la vía AKT, se halla frecuentemente mutado, asociándose a un fenotipo de sobreactivación (Dutt et al. 2008; Cheung et al. 2011). En este trabajo, demostramos que la expresión de FGFR2 disminuye en las células que sobreexpresan NTPDasa3. En este caso, la expresión de NTPDasa3, al

---

disminuir la expresión en superficie de FGFR2 y frenar la señalización de AKT, estaría atenuando las vías de proliferación tumoral, como se demuestra en estudios en cultivos e in vivo.

Los elementos que participan en los procesos de migración e invasión tumorales son diversos y la interacción entre las células y el microambiente tumoral es fundamental. En estos mecanismos, las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y las integrinas se engloban como proteínas celulares relacionadas con la migración, invasión y metástasis tumorales ya que sirven como interacción entre las células tumorales, el microambiente tumoral y la matriz extracelular. Se conoce que fluctuaciones en los niveles de MMP e integrinas influyen en la motilidad de las células tumorales (Brooks et al. 1996).

Asimismo, los mecanismos que rigen la migración celular en los tumores determinan a diferentes patrones migratorios: (i) uno colectivo o epitelial, con alta adhesión y remodelación de la matriz extracelular, y (ii) otro individual o ameboide, caracterizado por mayor velocidad de movimiento, poca adhesión y remodelación de la matriz (Panková et al. 2010; Krakhmal et al. 2015). Aquí demostramos que la sobreexpresión de NTPDasa3 conlleva la disminución de las metaloproteinasas de matriz MMP2 y MMP14, así como de las integrinas beta2 y beta3. Esta combinación está a favor de la adopción de un fenotipo ameboide por parte de las células, que favorecería su capacidad migratoria. El mecanismo ya se ha propuesto en diferentes tipos celulares tumorales, incluido el hepatocarcinoma (Crosas-Molist et al. 2017; López-Luque et al. 2019) y también el cáncer de endometrio. Por último, el estudio clínico de la cohorte del TCGA de pacientes muestra además una fuerte asociación entre niveles altos de *ENTPD3* y los de las MMPs y las integrinas como un buen pronóstico de la enfermedad.

Estos dos mecanismos propuestos de disminución de la proliferación y aumento de la migración parecen tener sentido en el cáncer de endometrio. El cambio en la expresión de NTPDasa3, junto con el fenotipo de migración de estas células coincide con la adquisición de un fenotipo ameboide, que comporta un tipo de motilidad epitelial que se caracteriza por fenotipos altamente móviles, no adhesivos, con niveles bajos de integrinas del grupo beta y con una disminución de los componentes de remodelación de la matriz extracelular. Proponemos un papel como supresor tumoral para NTPDasa3, que actuaría mediante mecanismos aún por dilucidar, regulando los niveles de



receptores de crecimiento tumoral en superficie y regulando la migración mediante el control de la transición epitelial-ameboide.

La adición de concentraciones semejantes de ATP a las del microambiente tumoral causa un incremento en la proliferación y migración de las células, crecimiento bastante preeminente en las células que sobre expresan NTPDasa3. Esto podría explicarse por una recuperación de la expresión de receptores de crecimiento, integrinas y metaloproteinasas de matriz en presencia de ATP extracelular, como hemos demostrado.

En células tumorales de cáncer de mama, se conoce que el ATP extracelular induce migración tumoral e incrementa la transición epitelio-mesénquima activando AKT e incrementando las MMPs (Yang et al. 2019).

En nuestro modelo, consideramos que el ATP va a ser hidrolizado en mayor proporción por las células que sobreexpresan NTPDasa3. En esta situación, el análisis de los receptores de ATP y adenosina y por consiguiente de la expresión y actividad de CD73 en nuestro modelo celular podría ser esclarecedor para comprender el impacto del ATP y sus derivados en el espacio extracelular y el comportamiento celular. El tratamiento con ATP extracelular en dosis micromolares, induce proliferación y migración, por medio de la activación del receptor P2Y<sub>2</sub>, en diversos tipos de cáncer como es el carcinoma hepatocelular y gliomas, donde se ha postulado como posible regulador del ciclo celular. En líneas celulares de carcinoma de endometrio se ha detectado expresión de este receptor (Katzur et al. 1999), por lo cual este mecanismo podría ocurrir perfectamente en otras células de cáncer de endometrio.

Futuros experimentos podrían ir encaminados en conocer la relación existente entre NTPDasa3 y estos procesos de supervivencia y motilidad celulares, con el uso de herramientas de proteómica e interactómica entre NTPDasa3 y las metaloproteinasas e integrinas. Además, el estudio del microambiente tumoral en el cáncer de endometrio resulta de gran interés, como por ejemplo, conocer los niveles extracelulares de ATP y adenosina o descifrar la expresión de marcadores inmunológicos en los diferentes tipos de tumores para poder establecer un patrón de expresión de las ectonucleotidasas y las posibles consecuencias que conlleva cada situación en el estado inmunológico del tumor.

Con las herramientas moleculares generadas en esta tesis sería interesante conocer el papel exacto del ATP y la adenosina extracelular generados y poder aplicarlo en los modelos celulares en tres dimensiones y en el modelo animal. El uso de inhibidores, además, podría ser útil en los modelos animales de crecimiento tumoral para determinar qué vías relacionadas con la señalización purinérgica pueden ser una buena diana de estudio para crear terapias antitumorales dirigidas.



# CONCLUSIONES



Las conclusiones derivadas de la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. Las cuatro familias de ectonucleotidasas se expresan en el cáncer de endometrio, con un alto grado de heterogeneidad tumoral.
2. En la célula epitelial endometrial tumoral predominan las ectoenzimas NTPDasa2, NTPDasa3 y CD73.
3. En el estroma endometrial tumoral predomina el tándem CD39-CD73.
4. En el estroma endometrial tumoral también se expresa NTPDasa2 pero su expresión queda limitada a la unión tumor-miometrio.
5. La pérdida de expresión de NTPDasa2 en el estroma tumoral se relaciona con la adquisición del fenotipo invasivo en los tumores de endometrio.
6. Pacientes afectadas de carcinoma de endometrio con mayor expresión génica de *ENTPD2* y *ENTPD3* tienen mejor pronóstico.
7. En el cáncer de endometrio NTPDasa3 se expresa en el componente epitelial de los tumores y su expresión disminuye al aumentar el grado del tumor, coincidiendo con un papel de supresor tumoral.
8. La sobreexpresión de NTPDasa3 en cultivos celulares disminuye la proliferación y aumenta la migración celulares de modo dependiente del ATP extracelular.
10. La sobreexpresión de NTPDasa3 conlleva cambios de expresión génica y proteica en vías relacionadas con la proliferación y la migración.
11. La sobreexpresión de NTPDasa3 disminuye la expresión del receptor de crecimiento FGFR2 y atenúa la activación por fosforilación de AKT.
12. La sobreexpresión de NTPDasa3 disminuye las metaloproteinasas de matriz y las integrinas de tipo beta, en concordancia con la adopción de un fenotipo celular ameboide con mayor capacidad migratoria.
13. Las células ARK-2 forman tumores subcutáneos en un modelo de ratón, pero la sobreexpresión de NTPDasa3 limita el crecimiento de estos tumores.

14. Tanto NTPDasa2 como NTPDasa3, como proteínas de fusión con GFP se expresan en la membrana celular y mantienen la actividad enzimática de las proteínas nativas, resultado un modelo útil para el estudio de inhibidores en cultivos celulares 2-D y 3-D.

# BIBLIOGRAFÍA





- Abeler VM, Kjørstad KE (1990) Serous papillary carcinoma of the endometrium: a histopathological study of 22 cases. *Gynecol Oncol* 39:266–71. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(90\)90250-o](https://doi.org/10.1016/0090-8258(90)90250-o)
- Adinolfi E, De Marchi E, Orioli E, Pegoraro A, Di Virgilio F (2019) Role of the P2X7 receptor in tumor-associated inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 47:59–64. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.02.012>
- Aerts I, Martin J-J, De Deyn PP, Van Ginniken C, Van Ostade X, Kockx M, Dua G, Slegers H (2011) The expression of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (E-NPP1) is correlated with astrocytic tumor grade. *Clin Neurol Neurosurg* 113:224–9. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2010.11.018>
- Akhtar M, Al Hyassat S, Elaiwy O, Rashid S, Al-Nabet ADMH (2019) Classification of Endometrial Carcinoma: New Perspectives Beyond Morphology. *Adv Anat Pathol* 26:421–427. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000251>
- Al-Rashida M, Qazi SU, Batool N, Hameed A, Iqbal J (2017) Ectonucleotidase inhibitors: a patent review (2011-2016). *Expert Opin Ther Pat* 27:1291–1304. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1369958>
- 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)* 199:191–7. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x>
- Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M (2014) High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators Inflamm* 2014:. <https://doi.org/10.1155/2014/509027>
- Aliagas E, Vidal A, Torrejón-Escribano B, Taco M del R, Ponce J, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Condom E, Martín-Satué M (2013) Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal* 9:227–237. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9345-0>
- Allard D, Chrobak P, Allard B, Messaoudi N, Stagg J (2019) Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. *Immunol Lett* 205:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.05.001>
- Alvarez EA, Brady WE, Walker JL, Rotmensch J, Zhou XC, Kendrick JE, Yamada SD, Schilder JM, Cohn DE, Harrison CR, Moore KN, Aghajanian C (2013) Phase II trial of combination bevacizumab and temsirolimus in the treatment of recurrent or persistent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 129:22–7. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.12.022>
- Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I (2005) Endometrial cancer. *Lancet* 366:491–505. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67063-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67063-8)
- Ambros RA, Ross JS, Kallakury B V, Malfetano J, Kim Y, Hwang J, Breese K, Figge J (1995a) p53 gene status in endometrial carcinomas showing diffuse positivity for p53 protein by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 8:441–5

- Ambros RA, Sherman ME, Zahn CM, Bitterman P, Kurman RJ (1995b) Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation. *Hum Pathol* 26:1260–7. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90203-1)
- Amoroso F, Salaro E, Falzoni S, Chiozzi P, Giuliani AL, Cavallesco G, Maniscalco P, Puozzo A, Bononi I, Martini F, Tognon M, Di Virgilio F (2016) P2X7 targeting inhibits growth of human mesothelioma. *Oncotarget* 7:49664–49676. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10430>
- Anderson R, Theron AJ, Steel HC, Nel JG, Tintinger GR (2020) ADP-Mediated Upregulation of Expression of CD62P on Human Platelets Is Critically Dependent on Co-Activation of P2Y1 and P2Y12 Receptors. *Pharmaceuticals (Basel)* 13:. <https://doi.org/10.3390/ph13120420>
- Angeles MA, Martínez-Gómez C, Migliorelli F, Voglimacci M, Figurelli J, Motton S, Tanguy Le Gac Y, Ferron G, Martinez A (2018) Novel Surgical Strategies in the Treatment of Gynecological Malignancies. *Curr Treat Options Oncol* 19:73. <https://doi.org/10.1007/s11864-018-0582-5>
- Antonoli L, Haskó G, Fornai M, Colucci R, Blandizzi C (2014) Adenosine pathway and cancer: where do we go from here? *Expert Opin Ther Targets* 18:973–7. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.925883>
- Augsten M (2014) Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. *Front Oncol* 4:62. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00062>
- Augustin RC, Leone RD, Naing A, Fong L, Bao R, Luke JJ (2022) Next steps for clinical translation of adenosine pathway inhibition in cancer immunotherapy. *J Immunother cancer* 10:. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004089>
- Banno K, Yanokura M, Iida M, Masuda K, Aoki D (2014) Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics. *J Obstet Gynaecol Res* 40:1957–67. <https://doi.org/10.1111/jog.12442>
- Barra F, Evangelisti G, Ferro Desideri L, Di Domenico S, Ferraioli D, Vellone VG, De Cian F, Ferrero S (2019) Investigational PI3K/AKT/mTOR inhibitors in development for endometrial cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 28:131–142. <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1558202>
- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sévigny J, Finger TE (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol* 497:1–12. <https://doi.org/10.1002/cne.20954>
- Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Déjou C, Giustiniani J, Laheurte C, Cochaud S, Laprevotte E, Funck-Brentano E, Hemon P, Gros L, Bec N, Larroque C, Alberici G, Bensussan A, Eliaou J-F (2015) Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res* 3:254–65. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0018>
- Belcher SM, Zsarnovszky A, Crawford PA, Hemani H, Spurling L, Kirley TL (2006)

- Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. *Neuroscience* 137:1331–46.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.08.086>
- Berchuck A, Rodriguez G, Kinney RB, Soper JT, Dodge RK, Clarke-Pearson DL, Bast RC (1991) Overexpression of HER-2/neu in endometrial cancer is associated with advanced stage disease. *Am J Obstet Gynecol* 164:15–21.  
[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(91\)90615-x](https://doi.org/10.1016/0002-9378(91)90615-x)
- Bhattarai S, Freundlieb M, Pippel J, Meyer A, Abdelrahman A, Fiene A, Lee S-Y, Zimmermann H, Yegutkin GG, Sträter N, El-Tayeb A, Müller CE (2015)  $\alpha,\beta$ -Methylene-ADP (AOPCP) Derivatives and Analogues: Development of Potent and Selective ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Inhibitors. *J Med Chem* 58:6248–63.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00802>
- Blackburn MR, Gao X, Airhart MJ, Skalko RG, Thompson LF, Knudsen TB (1992) Adenosine levels in the postimplantation mouse uterus: quantitation by HPLC-fluorometric detection and spatiotemporal regulation by 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. *Dev Dyn* 194:155–68.  
<https://doi.org/10.1002/aja.1001940208>
- Blass-Kampmann S, Kindler-Röhrborn A, Deissler H, D'Urso D, Rajewsky MF (1997) In vitro differentiation of neural progenitor cells from prenatal rat brain: common cell surface glycoprotein on three glial cell subsets. *J Neurosci Res* 48:95–111.  
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4547\(19970415\)48:2<95::aid-jnr2>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4547(19970415)48:2<95::aid-jnr2>3.0.co;2-7)
- Bokhman J V (1983) Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15:10–7. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(83\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0090-8258(83)90111-7)
- Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, Killiam E, Baquero M, Hanna J, Anagnostou V, Rimm D (2010) Antibody validation. *Biotechniques* 48:197–209.  
<https://doi.org/10.2144/000113382>
- Boretto M, Maenhoudt N, Luo X, et al (2019) Patient-derived organoids from endometrial disease capture clinical heterogeneity and are amenable to drug screening. *Nat Cell Biol* 21:1041–1051. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0360-z>
- Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110:1225–32.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>
- Bowser JL, Blackburn MR, Shipley GL, Molina JG, Dunner K, Broaddus RR (2016) Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression. *J Clin Invest* 126:220–238. <https://doi.org/10.1172/JCI79380>
- Bowser JL, Broaddus RR (2016) CD73s protection of epithelial integrity: Thinking beyond the barrier. *Tissue Barriers* 4:1–11.  
<https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1224963>

- Braun N, Sévigny J, Mishra SK, Robson SC, Barth SW, Gerstberger R, Hammer K, Zimmermann H (2003) Expression of the ecto-ATPase NTPDase2 in the germinal zones of the developing and adult rat brain. *Eur J Neurosci* 17:1355–64. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02567.x>
- Brooks PC, Strömlad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell* 85:683–93. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81235-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81235-0)
- Bruns RF, Lu GH, Pugsley TA (1986) Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* 29:331–46
- Buchet R, Millán JL, Magne D (2013) Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Methods Mol Biol* 1053:27–51. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-562-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-562-0_3)
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509–81
- Burnstock G (2016) Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371:. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0422>
- Burnstock G (2006) Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147:S172–S181. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706429>
- Burnstock G, Verkhratsky A (2010) Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* 1:e9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2009.11>
- Caduff RF, Johnston CM, Frank TS (1995) Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. *Am J Pathol* 146:182–8
- Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS (1996) Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 148:1671–8
- Campos-Contreras A del R, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG (2020) Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells* 9:1612. <https://doi.org/10.3390/cells9071612>
- Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, et al (2013) Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 497:67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>
- Carbone A, Cozzi M, Gloghini A, Pinto A (1994) CD26/dipeptidyl peptidase IV expression in human lymphomas is restricted to CD30-positive anaplastic large cell and a subset of T-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 25:1360–5. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0046-8177(94)90098-1)
- Casarin J, Multinu F, Pasupathy K, Weaver A, McGree M, Tortorella L, Torres D, Kumar A, Langstraat C, Huang Y, Ghezzi F, Mariani A, Glaser G (2018) Frozen Section for Detection of Lymph Nodes After Cervical Injection with Indocyanine Green (ICG) for Sentinel Lymph Node Technique in Endometrial Cancer Staging. *Ann Surg Oncol* 25:3692–3698. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-6698-9>

- Cheung LWT, Hennessy BT, Li J, Yu S, Myers AP, Djordjevic B, Lu Y, Stemke-Hale K, Dyer MD, Zhang F, Ju Z, Cantley LC, Scherer SE, Liang H, Lu KH, Broaddus RR, Mills GB (2011) High Frequency of *PIK3R1* and *PIK3R2* Mutations in Endometrial Cancer Elucidates a Novel Mechanism for Regulation of PTEN Protein Stability. *Cancer Discov* 1:170–185. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0039>
- Chiang S, Soslow RA (2014) Updates in diagnostic immunohistochemistry in endometrial carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 31:205–15. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2014.03.002>
- Chiu DK-C, Tse AP-W, Xu IM-J, Di Cui J, Lai RK-H, Li LL, Koh H-Y, Tsang FH-C, Wei LL, Wong C-M, Ng IO-L, Wong CC-L (2017) Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 8:517. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00530-7>
- Cicenas J (2008) The potential role of Akt phosphorylation in human cancers. *Int J Biol Markers* 23:1–9. <https://doi.org/10.5301/jbm.2008.618>
- Colas E, Perez C, Cabrera S, et al (2011) Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. *Int J cancer* 129:2435–44. <https://doi.org/10.1002/ijc.25901>
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2:351–60. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-5302-5>
- Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, Marth C, Nout R, Querleu D, Mirza MR, Sessa C, ESMO-ESGO-ESTRO Endometrial Consensus Conference Working Group (2016) ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and Follow-up. *Int J Gynecol cancer* 26:2–30. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000609>
- Concin N, Matias-Guiu X, Vergote I, et al (2021) ESGO/ESTRO/ESP guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 31:12–39. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-002230>
- Creutzberg CL, Nout RA (2011) The role of radiotherapy in endometrial cancer: current evidence and trends. *Curr Oncol Rep* 13:472–8. <https://doi.org/10.1007/s11912-011-0191-y>
- Crosas-Molist E, Bertran E, Rodriguez-Hernandez I, Herraiz C, Cantelli G, Fabra À, Sanz-Moreno V, Fabregat I (2017) The NADPH oxidase NOX4 represses epithelial to amoeboid transition and efficient tumour dissemination. *Oncogene* 36:3002–3014. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.454>
- Csóka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, Deitch EA, Spolarics Z, Németh ZH, Haskó G (2008) Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J* 22:3491–9. <https://doi.org/10.1096/fj.08-107458>
- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as

- an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6:184–92. <https://doi.org/10.1038/nrc1819>
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905–27. <https://doi.org/10.1101/gad.13.22.2905>
- De Wever O, Mareel M (2002) Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol Chem* 383:55–67. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.006>
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J-F, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257–65. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>
- Dedes KJ, Wetterskog D, Mendes-Pereira AM, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Vatcheva R, Savage K, Mackay A, Lord CJ, Ashworth A, Reis-Filho JS (2010) PTEN deficiency in endometrioid endometrial adenocarcinomas predicts sensitivity to PARP inhibitors. *Sci Transl Med* 2:53ra75. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001538>
- Di Virgilio F, Adinolfi E (2017) Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* 36:293–303. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>
- Doñate F, Raitano A, Morrison K, et al (2016) AGS16F Is a Novel Antibody Drug Conjugate Directed against ENPP3 for the Treatment of Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 22:1989–99. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1542>
- Dutt A, Salvesen HB, Chen T-H, et al (2008) Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8713–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803379105>
- Dwyer KM, Deaglio S, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC (2007) CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 3:171–80. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9050-y>
- Elliott S, Sinclair A, Collins H, Rice L, Jelkmann W (2014) Progress in detecting cell-surface protein receptors: the erythropoietin receptor example. *Ann Hematol* 93:181–192. <https://doi.org/10.1007/s00277-013-1947-2>
- English DP, Roque DM, Carrara L, Lopez S, Bellone S, Cocco E, Bortolomai I, Schwartz PE, Rutherford T, Santin AD (2013) HER2/neu gene amplification determines the sensitivity of uterine serous carcinoma cell lines to AZD8055, a novel dual mTORC1/2 inhibitor. *Gynecol Oncol* 131:753–758. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.033>
- Enterline H, Coman D (1950) The ameboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer* 3:1033–8. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:6<1033::aid-cncr2820030612>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:6<1033::aid-cncr2820030612>3.0.co;2-r)
- Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG (1999) hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 155:1767–72. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65492-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65492-2)

- Faas MM, Sáez T, de Vos P (2017) Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Mol Aspects Med* 55:9–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.002>
- Fadare O, Zheng W, Crispens MA, Jones HWI, Khabele D, Gwin K, Liang SX, Mohammed K, Desouki MM, Parkash V, Hecht JL (2013) Morphologic and other clinicopathologic features of endometrial clear cell carcinoma: a comprehensive analysis of 50 rigorously classified cases. *Am J Cancer Res* 3:70–95
- Farré X, Guillén-Gómez E, Sánchez L, Hardisson D, Plaza Y, Lloberas J, Casado FJ, Palacios J, Pastor-Anglada M (2004) Expression of the nucleoside-derived drug transporters hCNT1, hENT1 and hENT2 in gynecologic tumors. *Int J cancer* 112:959–66.  
<https://doi.org/10.1002/ijc.20524>
- Feng Y-Z, Shiozawa T, Horiuchi A, Shih H-C, Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Nikaido T, Konishi I (2005) Intratumoral heterogeneous expression of p53 correlates with p53 mutation, Ki-67, and cyclin A expression in endometrioid-type endometrial adenocarcinomas. *Virchows Arch* 447:816–22. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-0029-9>
- Freeman SJ, Aly AM, Kataoka MY, Addley HC, Reinhold C, Sala E (2012) The revised FIGO staging system for uterine malignancies: implications for MR imaging. *Radiographics* 32:1805–27. <https://doi.org/10.1148/rg.326125519>
- Friedl P, Alexander S (2011) Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147:992–1009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>
- Fuss B, Baba H, Phan T, Tuohy VK, Macklin WB (1997) Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci* 17:9095–103
- Gargett CE, Schwab KE, Deane JA (2016) Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum Reprod Update* 22:137–63. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv051>
- Gatius S, Cuevas D, Fernández C, Roman-Canal B, Adamoli V, Piulats JM, Eritja N, Martin-Satue M, Moreno-Bueno G, Matias-Guiu X (2018) Tumor Heterogeneity in Endometrial Carcinoma: Practical Consequences. *Pathobiology* 85:35–40.  
<https://doi.org/10.1159/000475529>
- Gilks CB, Oliva E, Soslow RA (2013) Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 37:874–81.  
<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31827f576a>
- Gillman TA, Pennefather JN (1998) Evidence for the presence of both P1 and P2 purinoceptors in the rat myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:592–599.  
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1998.tb02257.x>
- Glass R, Bardini M, Robson T, Burnstock G (2001) Expression of nucleotide P2X receptor subtypes during spermatogenesis in the adult rat testis. *Cells Tissues Organs* 169:377–87. <https://doi.org/10.1159/000047905>
- Gnaiger E (2001) Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol*



- 128:277–97. [https://doi.org/10.1016/s0034-5687\(01\)00307-3](https://doi.org/10.1016/s0034-5687(01)00307-3)
- Goding JW, Grobden B, Slegers H (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638:1–19. [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(03\)00058-9](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(03)00058-9)
- Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ (1999) Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol* 1:457–459. <https://doi.org/10.1038/15693>
- Gordon JL (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233:309–19. <https://doi.org/10.1042/bj2330309>
- Gorodeski G (1995) Regulation of the paracellular permeability of cultured human cervical epithelium by a nucleotide receptor. *J Soc Gynecol Investig* 2:716–720. [https://doi.org/10.1016/1071-5576\(95\)00020-F](https://doi.org/10.1016/1071-5576(95)00020-F)
- Greig AVH, Linge C, Healy V, Lim P, Clayton E, Rustin MHA, McGrouther DA, Burnstock G (2003) Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *J Invest Dermatol* 121:315–27. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12379.x>
- Grygorczyk R, Boudreault F, Ponomarchuk O, Tan JJ, Furuya K, Goldgewicht J, Kenfack FD, Yu F (2021) Lytic Release of Cellular ATP: Physiological Relevance and Therapeutic Applications. *Life* 11:700. <https://doi.org/10.3390/life11070700>
- Gu ZY, Jia SZ, Liu S, Leng JH (2020) Endometrial Organoids: A New Model for the Research of Endometrial-Related Diseases. *Biol Reprod* 103:918–926. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa124>
- Guo X, Li Q, Pi S, Xia Y, Mao L (2021) G protein-coupled purinergic P2Y receptor oligomerization: Pharmacological changes and dynamic regulation. *Biochem Pharmacol* 192:114689. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114689>
- Hammami A, Allard D, Allard B, Stagg J (2019) Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy. *Semin Immunol* 42:101304. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101304>
- Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES (1996) Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 157:4634–40
- Häusler SFM, Montalbán del Barrio I, Strohschein J, Chandran PA, Engel JB, Hönig A, Ossadnik M, Horn E, Fischer B, Krockenberger M, Heuer S, Seida AA, Junker M, Kneitz H, Kloor D, Klotz K-N, Dietl J, Wischhusen J (2011) Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* 60:1405–18. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1040-4>
- Heremans R, Jan Z, Timmerman D, Vankelecom H (2021) Organoids of the Female Reproductive Tract: Innovative Tools to Study Desired to Unwelcome Processes. *Front Cell Dev Biol* 9:1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661472>

- Herrington C, WHO C.T.O (2020) WHO Classification of Tumours. Female Genital Tumors, 5th edn. International Agency for Research on Cancer
- Holton FA, Holton P (1954) The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol* 126:124–40.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005198>
- Hou JY, McAndrew TC, Goldberg GL, Whitney K, Shahabi S (2014) A clinical and pathologic comparison between stage-matched endometrial intraepithelial carcinoma and uterine serous carcinoma: is there a difference? *Reprod Sci* 21:532–7. <https://doi.org/10.1177/1933719113503414>
- Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM, Ritterhouse LL, Watkins JC, Rodig S, Stover E, Strickland KC, D'Andrea AD, Wu CJ, Matulonis UA, Konstantinopoulos PA (2015) Association of Polymerase e-Mutated and Microsatellite-Unstable Endometrial Cancers With Neoantigen Load, Number of Tumor-Infiltrating Lymphocytes, and Expression of PD-1 and PD-L1. *JAMA Oncol* 1:1319–23.  
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2151>
- Huang J, Chen M-N, Du J, Liu H, He Y-J, Li G-L, Li S-Y, Liu W-P, Long X-Y (2016) Differential Expression of Adenosine P1 Receptor ADORA1 and ADORA2A Associated with Glioma Development and Tumor-Associated Epilepsy. *Neurochem Res* 41:1774–83. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1893-1>
- Huang R, Rosenbach M, Vaughn R, Provvedini D, Rebbe N, Hickman S, Goding J, Terkeltaub R (1994) Expression of the murine plasma cell nucleotide pyrophosphohydrolase PC-1 is shared by human liver, bone, and cartilage cells. Regulation of PC-1 expression in osteosarcoma cells by transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 94:560–7. <https://doi.org/10.1172/JCI117370>
- Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M (1997) Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* 90:1600–10
- Humber CE, Tierney JF, Symonds RP, Collingwood M, Kirwan J, Williams C, Green JA (2007) Chemotherapy for advanced, recurrent or metastatic endometrial cancer: a systematic review of Cochrane collaboration. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 18:409–20. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl417>
- Hutchings G, Gevaert T, Deprest J, Nilius B, Williams O, De Ridder D (2009) The effect of extracellular adenosine triphosphate on the spontaneous contractility of human myometrial strips. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 143:79–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.12.004>
- Hutt S, Tailor A, Ellis P, Michael A, Butler-Manuel S, Chatterjee J (2019) The role of biomarkers in endometrial cancer and hyperplasia: a literature review. *Acta Oncol* 58:342–352. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1540886>
- Huvila J, Pors J, Thompson EF, Gilks CB (2021) Endometrial carcinoma: molecular subtypes, precursors and the role of pathology in early diagnosis. *J Pathol* 253:355–365. <https://doi.org/10.1002/path.5608>

- Jacques-Silva MC, Bernardi A, Rodnight R, Lenz G (2004) ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. *Oncology* 67:450–9. <https://doi.org/10.1159/000082930>
- Jhandier MN, Kruglov EA, Lavoie EG, Sévigny J, Dranoff JA (2005) Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J Biol Chem* 280:22986–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412371200>
- Jiang N, Dai Q, Su X, Fu J, Feng X, Peng J (2020) Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep* 47:4587–4629. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05435-1>
- Jiang T, Xu X, Qiao M, Li X, Zhao C, Zhou F, Gao G, Wu F, Chen X, Su C, Ren S, Zhai C, Zhou C (2018) Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. *BMC Cancer* 18:267. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4073-7>
- Jin-Hua P, Goding JW, Nakamura H, Sano K (1997) Molecular cloning and chromosomal localization of PD-1beta (PDNP3), a new member of the human phosphodiesterase I genes. *Genomics* 45:412–5. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4949>
- Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4:253–65. <https://doi.org/10.1038/nrc1317>
- Jové M, Gatus S, Yeramian A, Portero-Otin M, Eritja N, Santacana M, Colas E, Ruiz M, Pamplona R, Matias-Guiu X (2016) Metabotyping human endometrioid endometrial adenocarcinoma reveals an implication of endocannabinoid metabolism. *Oncotarget* 7:52364–52374. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10564>
- Kameoka J, Ichinohasama R, Inoue H, Yamamoto J, Yokoyama H, Tomiya Y, Yamada M, Ishizawa K, Harigae H, Sawai T, Sasaki T (2006) CD26, together with cell surface adenosine deaminase, is selectively expressed on ALK-positive, but not on ALK-negative, anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 47:2181–8. <https://doi.org/10.1080/10428190600773396>
- Katoh Y, Katoh M (2009) FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *Int J Mol Med* 23:307–11. [https://doi.org/10.3892/ijmm\\_00000132](https://doi.org/10.3892/ijmm_00000132)
- Katzur AC, Koshimizu T, Tomić M, Schultze-Mosgau A, Ortmann O, Stojilkovic SS (1999) Expression and responsiveness of P2Y2 receptors in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4085–91. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.11.6119>
- Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Hase T, Nakaya H, Ohara T, Kato K, Yamamoto E (2009) Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 31:1346–53. <https://doi.org/10.1002/hed.21097>
- Kelgandre DC, Pathak J, Patel S, Ingale P, Swain N (2016) Adenosine Deaminase - a Novel Diagnostic and Prognostic Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian*

- Pacific J Cancer Prev 17:1865–1868.  
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.4.1865>
- Khakh BS, Burnstock G (2009) The double life of ATP. *Sci Am* 301:84–90, 92.  
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican1209-84>
- Khalifa MA, Mannel RS, Haraway SD, Walker J, Min KW (1994) Expression of EGFR, HER-2/neu, P53, and PCNA in endometrioid, serous papillary, and clear cell endometrial adenocarcinomas. *Gynecol Oncol* 53:84–92.  
<https://doi.org/10.1006/gyno.1994.1092>
- Khin EE, Kikkawa F, Ino K, Kajiyama H, Suzuki T, Shibata K, Tamakoshi K, Nagasaka T, Mizutani S (2003) Dipeptidyl peptidase IV expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma and its inverse correlation with tumor grade. *Am J Obstet Gynecol* 188:670–6. <https://doi.org/10.1067/mob.2003.169>
- Krakhmal N V, Zavyalova M V, Denisov E V, Vtorushin S V, Perelmuter VM (2015) Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae* 7:17–28
- Kurman RJ, Carcangiu M, Herrington CS (2014) WHO Classification of tumors of the female reproductive organs, Cuarta edi
- Kurnit KC, Draisey A, Kazen RC, Chung C, Phan LH, Harvey JB, Feng J, Xie S, Broaddus RR, Bowser JL (2021) Loss of CD73 shifts transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) from tumor suppressor to promoter in endometrial cancer. *Cancer Lett* 505:75–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.030>
- Kvåle G, Heuch I, Ursin G (1988) Reproductive factors and risk of cancer of the uterine corpus: a prospective study. *Cancer Res* 48:6217–21
- Labasi JM, Petrushova N, Donovan C, McCurdy S, Lira P, Payette MM, Brissette W, Wicks JR, Audoly L, Gabel CA (2002) Absence of the P2X<sub>7</sub> Receptor Alters Leukocyte Function and Attenuates an Inflammatory Response. *J Immunol* 168:6436–6445.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6436>
- Langer D, Hammer K, Koszalka P, Schrader J, Robson S, Zimmermann H (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res* 334:199–217. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0681-x>
- Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100:95–97.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90115-5)
- Lavoie EG, Fausther M, Kauffenstein G, Kukulski F, Künzli BM, Friess H, Sévigny J (2010) Identification of the ectonucleotidases expressed in mouse, rat, and human Langerhans islets: potential role of NTPDase3 in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E647-56. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00126.2010>
- Lavoie EG, Gulbransen BD, Martín-Satué M, Aliagas E, Sharkey KA, Sévigny J (2011) Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:G608-20.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00207.2010>

- Lax SF (2004) Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch* 444:213–23. <https://doi.org/10.1007/s00428-003-0947-3>
- Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L (2000) The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer* 88:814–24
- Lazarowski ER (2012) Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal* 8:359–73. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9304-9>
- Lee HY, Murata J, Clair T, Polymeropoulos MH, Torres R, Manrow RE, Liotta LA, Stracke ML (1996) Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 218:714–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0127>
- Lee NK, Cheung MK, Shin JY, Husain A, Teng NN, Berek JS, Kapp DS, Osann K, Chan JK (2007) Prognostic factors for uterine cancer in reproductive-aged women. *Obstet Gynecol* 109:655–62. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000255980.88205.15>
- Lehmann S, Te Boekhorst V, Odenthal J, Bianchi R, van Helvert S, Ikenberg K, Ilina O, Stoma S, Xandry J, Jiang L, Grenman R, Rudin M, Friedl P (2017) Hypoxia Induces a HIF-1-Dependent Transition from Collective-to-Amoeboid Dissemination in Epithelial Cancer Cells. *Curr Biol* 27:392–400. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.057>
- León-Castillo A, Britton H, McConechy MK, McAlpine JN, Nout R, Kommoss S, Brucker SY, Carlson JW, Epstein E, Rau TT, Bosse T, Church DN, Gilks CB (2020) Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol* 250:323–335. <https://doi.org/10.1002/path.5372>
- Li M, Qi Y, Chen M, Wang Z, Zeng D, Xiao Y, Li S, Lin H, Wei X, Zhang G (2019) GATA Binding Protein 3 Boosts Extracellular ATP Hydrolysis and Inhibits Metastasis of Breast Cancer by Up-regulating Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 3. *Int J Biol Sci* 15:2522–2537. <https://doi.org/10.7150/ijbs.35563>
- Li X, Qi X, Zhou L, Catera D, Rote NS, Potashkin J, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI (2007) Decreased expression of P2X7 in endometrial epithelial pre-cancerous and cancer cells. *Gynecol Oncol* 106:233–43. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.03.032>
- Li X, Zhou L, Feng Y-H, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI (2006) The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1906–13. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0407>
- Liang S, Zhang Y (2021) Clinical pathological characteristics and survival of high-grade endometrioid carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 47:3644–3651. <https://doi.org/10.1111/jog.14839>
- Liu H, Kuang X, Zhang Y, et al (2020) ADORA1 Inhibition Promotes Tumor Immune Evasion by Regulating the ATF3-PD-L1 Axis. *Cancer Cell* 37:324–339.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.02.006>
- Llobet D, Pallares J, Yeramian A, Santacana M, Eritja N, Velasco A, Dolcet X, Matias-Guiu

- X (2009) Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *J Clin Pathol* 62:777–85.  
<https://doi.org/10.1136/jcp.2008.056101>
- Lohman AW, Isakson BE (2014) Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett* 588:1379–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.004>
- Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, Stagg J (2013) CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 110:11091–11096.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1222251110>
- Loomis WH, Namiki S, Ostrom RS, Insel PA, Junger WG (2003) Hypertonic Stress Increases T Cell Interleukin-2 Expression through a Mechanism That Involves ATP Release, P2 Receptor, and p38 MAPK Activation. *J Biol Chem* 278:4590–4596.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207868200>
- López-Luque J, Bertran E, Crosas-Molist E, Maiques O, Malfettone A, Caja L, Serrano T, Ramos E, Sanz-Moreno V, Fabregat I (2019) Downregulation of Epidermal Growth Factor Receptor in hepatocellular carcinoma facilitates Transforming Growth Factor- $\beta$ -induced epithelial to amoeboid transition. *Cancer Lett* 464:15–24.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.08.011>
- Lopez S, Schwab CL, Cocco E, Bellone S, Bonazzoli E, English DP, Schwartz PE, Rutherford T, Angioli R, Santin AD (2014) Taselisib, a selective inhibitor of PIK3CA, is highly effective on PIK3CA-mutated and HER2/neu amplified uterine serous carcinoma in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 135:312–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.08.024>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lu X-X (2013) Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 19:1912.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i12.1912>
- MacKay HJ, Freixinos VR, Fleming GF (2020) Therapeutic Targets and Opportunities in Endometrial Cancer: Update on Endocrine Therapy and Nonimmunotherapy Targeted Options. *Am Soc Clin Oncol Educ book Am Soc Clin Oncol Annu Meet* 40:1–11. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_280495](https://doi.org/10.1200/EDBK_280495)
- Mandapathil M, Boduc M, Netzer C, Güldner C, Roessler M, Walliczek-Dworschak U, Jahns E, Stuck B (2018a) CD73 expression in lymph node metastases in patients with head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 138:180–184.  
<https://doi.org/10.1080/00016489.2017.1378436>
- Mandapathil M, Boduc M, Roessler M, Güldner C, Walliczek-Dworschak U, Mandic R (2018b) Ectonucleotidase CD39 expression in regional metastases in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 138:428–432.  
<https://doi.org/10.1080/00016489.2017.1405278>

- Marjoniemi V-M (2004) Immunohistochemistry in gynaecological pathology: a review. *Pathology* 36:109–119. <https://doi.org/10.1080/00313020410001671948>
- Mathur A, Ware C, Davis L, Gazdar A, Pan B-S, Lutterbach B (2014) FGFR2 is amplified in the NCI-H716 colorectal cancer cell line and is required for growth and survival. *PLoS One* 9:e98515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098515>
- Matias-Guiu X, Prat J (2013) Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology* 62:111–23. <https://doi.org/10.1111/his.12053>
- Maxwell GL, Risinger JI, Gumbs C, Shaw H, Bentley RC, Barrett JC, Berchuck A, Futreal PA (1998) Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Res* 58:2500–3
- McAlpine J, Leon-Castillo A, Bosse T (2018) The rise of a novel classification system for endometrial carcinoma; integration of molecular subclasses. *J Pathol* 244:538–549. <https://doi.org/10.1002/path.5034>
- McCluggage WG (2002) Recent advances in immunohistochemistry in gynaecological pathology. *Histopathology* 40:309–26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01384.x>
- McHugh BJ, Murdoch A, Haslett C, Sethi T (2012) Loss of the integrin-activating transmembrane protein Fam38A (Piezo1) promotes a switch to a reduced integrin-dependent mode of cell migration. *PLoS One* 7:e40346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040346>
- Minelli A, Liguori L, Bellazza I, Mannucci R, Johansson B, Fredholm BB (2004) Involvement of A1 adenosine receptors in the acquisition of fertilizing capacity. *J Androl* 25:286–92. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02789.x>
- Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz JE, Wang Y, Liu S (2005) RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biol Ther* 4:1355–60. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.12.2196>
- Mittal D, Sinha D, Barkauskas D, Young A, Kalimutho M, Stannard K, Caramia F, Haibe-Kains B, Stagg J, Khanna KK, Loi S, Smyth MJ (2016) Adenosine 2B Receptor Expression on Cancer Cells Promotes Metastasis. *Cancer Res* 76:4372–82. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0544>
- Moesta AK, Li X-Y, Smyth MJ (2020) Targeting CD39 in cancer. *Nat Rev Immunol* 20:739–755. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0376-4>
- Montserrat N, Mozos A, Llobet D, Dolcet X, Pons C, de Herreros AG, Matias-Guiu X, Prat J (2012) Epithelial to mesenchymal transition in early stage endometrioid endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 43:632–43. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.06.021>
- Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez C, Sarrió D, Cassia R, García-Rostán G, Prat J, Guo M, Herman JG, Matías-Guiu X, Esteller M, Palacios J (2002) Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 21:7981–90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205924>

- Murali R, Davidson B, Fadare O, Carlson JA, Crum CP, Gilks CB, Irving JA, Malpica A, Matias-Guiu X, McCluggage WG, Mittal K, Oliva E, Parkash V, Rutgers JKL, Staats PN, Stewart CJR, Tornos C, Soslow RA (2019) High-grade Endometrial Carcinomas: Morphologic and Immunohistochemical Features, Diagnostic Challenges and Recommendations. *Int J Gynecol Pathol* 38 Suppl 1:S40–S63. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000491>
- Murali R, Soslow RA, Weigelt B (2014) Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol* 15:e268-78. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70591-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70591-6)
- Myers AP (2013) New strategies in endometrial cancer: targeting the PI3K/mTOR pathway--the devil is in the details. *Clin cancer Res* 19:5264–74. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0615>
- Neven P, Vergote I (1998a) Should tamoxifen users be screened for endometrial lesions? *Lancet* 351:155–7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)78216-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)78216-7)
- Neven P, Vergote I (1998b) Controversies regarding tamoxifen and uterine carcinoma. *Curr Opin Obstet Gynecol* 10:9–14. <https://doi.org/10.1097/00001703-199802000-00003>
- Ngu S-F, Ngan HY, Chan KK (2021) Role of adjuvant and post-surgical treatment in gynaecological cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2021.09.001>
- Ni X, Wan W, Ma J, Liu X, Zheng B, He Z, Yang W, Huang L (2021) A Novel Prognostic Biomarker of Luminal Breast Cancer: High CD39 Expression Is Related to Poor Survival. *Front Genet* 12:682503. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.682503>
- Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MKK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen J-F, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M (2006) A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13132–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>
- Orsaria M, Londero AP, Marzinotto S, Di Loreto C, Marchesoni D, Mariuzzi L (2016) Placental type alkaline phosphatase tissue expression in ovarian serous carcinoma. *Cancer Biomark* 17:479–486. <https://doi.org/10.3233/CBM-160665>
- Otranto M, Sarrazy V, Bonté F, Hinz B, Gabbiani G, Desmouliere A (2012) The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling. *Cell Adh Migr* 6:203–219. <https://doi.org/10.4161/cam.20377>
- Oza AM, Elit L, Tsao M-S, Kamel-Reid S, Biagi J, Provencher DM, Gotlieb WH, Hoskins PJ, Ghatage P, Tonkin KS, Mackay HJ, Mazurka J, Sederias J, Ivy P, Dancey JE, Eisenhauer EA (2011) Phase II study of temsirolimus in women with recurrent or metastatic endometrial cancer: a trial of the NCIC Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 29:3278–85. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.1578>
- Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R (2005) CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl*



- Acad Sci U S A 102:9583–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501050102>
- Panková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J (2010) The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci* 67:63–71. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0132-1>
- Parkash V, Carcangiu ML (1997) Endometrioid endometrial adenocarcinoma with psammoma bodies. *Am J Surg Pathol* 21:399–406. <https://doi.org/10.1097/00000478-199704000-00005>
- Pastor-Anglada M, Cano-Soldado P, Molina-Arcas M, Lostao MP, Larráyoz I, Martínez-Picado J, Casado FJ (2005) Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res* 107:151–164. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.005>
- Pavlidou A, Vlahos NF (2014) Molecular alterations of PI3K/Akt/mTOR pathway: a therapeutic target in endometrial cancer. *ScientificWorldJournal* 2014:709736. <https://doi.org/10.1155/2014/709736>
- Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F (2008) Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 3:e2599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002599>
- Perrot I, Michaud H-A, Giraudon-Paoli M, et al (2019) Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. *Cell Rep* 27:2411–2425.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.091>
- Piulats JM, Guerra E, Gil-Martín M, Roman-Canal B, Gatus S, Sanz-Pamplona R, Velasco A, Vidal A, Matias-Guiu X (2017) Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 145:200–207
- Piulats JM, Matias-Guiu X (2016) Immunotherapy in Endometrial Cancer: In the Nick of Time. *Clin Cancer Res* 22:5623–5625. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1820>
- Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandonà D, Savaglio E, Di Virgilio F (2007) Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* 109:3856–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-031377>
- Praetorius HA, Leipziger J (2009) ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal* 5:433–46. <https://doi.org/10.1007/s11302-009-9146-2>
- Rafehi M, Burbiel JC, Attah IY, Abdelrahman A, Müller CE (2017) Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective P2Y2 receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic Signal* 13:89–103. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9542-3>
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413–92
- Redegeld F, Filippini A, Sitkovsky M (1991) Comparative studies of the cytotoxic T lymphocyte-mediated cytotoxicity and of extracellular ATP-induced cell lysis.

- Different requirements in extracellular Mg<sup>2+</sup> and pH. *J Immunol* 147:3638–45
- Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J (1993) Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 53:5100–3
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>
- Robson SC, Wu Y, Sun X, Knosalla C, Dwyer K, Enyoloji K (2005) Ectonucleotidases of CD39 family modulate vascular inflammation and thrombosis in transplantation. *Semin Thromb Hemost* 31:217–33. <https://doi.org/10.1055/s-2005-869527>
- Rockenbach L, Braganhol E, Dietrich F, Figueiró F, Pugliese M, Edelweiss MIA, Morrone FB, Sévigny J, Battastini AMO (2014) NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. *Purinergic Signal* 10:421–30. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9405-8>
- Rodríguez-Martínez A, Trapero C, Vidal A, Piulats JM, de Aranda IG, Sévigny J, Fernández-Montolí ME, Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M (2021) 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* 11:1–19. <https://doi.org/10.3390/jpm11050331>
- Rodriguez EF, Monaco SE, Khalbuss W, Austin RM, Pantanowitz L (2013) Abdominopelvic washings: A comprehensive review. *Cytojournal* 10:7. <https://doi.org/10.4103/1742-6413.111080>
- Roelofs H, Manes T, Janszen T, Millán JL, Oosterhuis JW, Looijenga LH (1999) Heterogeneity in alkaline phosphatase isozyme expression in human testicular germ cell tumours: An enzyme-/immunohistochemical and molecular analysis. *J Pathol* 189:236–44. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199910\)189:2<236::AID-PATH411>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199910)189:2<236::AID-PATH411>3.0.CO;2-J)
- Roh M, Wainwright DA, Wu JD, Wan Y, Zhang B (2020) Targeting CD73 to augment cancer immunotherapy. *Curr Opin Pharmacol* 53:66–76. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2020.07.001>
- Rossi EC, Kowalski LD, Scalici J, Cantrell L, Schuler K, Hanna RK, Method M, Ade M, Ivanova A, Boggess JF (2017) A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial): a multicentre, prospective, cohort study. *Lancet Oncol* 18:384–392. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30068-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30068-2)
- Roszek K, Wujak M (2018) How to influence the mesenchymal stem cells fate? Emerging role of ectoenzymes metabolizing nucleotides. *J Cell Physiol* 234:320–334. <https://doi.org/10.1002/jcp.26904>
- Sabeh F, Shimizu-Hirota R, Weiss SJ (2009) Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J*

- Cell Biol 185:11–9. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807195>
- Sadej R, Skladanowski AC (2012) Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim Pol* 59:647–52
- Salvesen HB, Carter SL, Mannelqvist M, et al (2009) Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma associates aggressive tumors with indicators of PI3 kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4834–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806514106>
- Sandhu B, Perez-Matos MC, Tran S, Singhal G, Syed I, Feldbrügge L, Mitsuhashi S, Pelletier J, Huang J, Yalcin Y, Csizmadia E, Tiwari-Heckler S, Enjyoji K, Sévigny J, Maratos-Flier E, Robson SC, Jiang ZG (2021) Global deletion of NTPDase3 protects against diet-induced obesity by increasing basal energy metabolism. *Metabolism* 118:154731. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154731>
- Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, Tada A, Furusato M, Terashima Y, Siegal GP, Parker SL, Kohler MF, Berchuck A (1993) Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res* 53:1906–10
- Scarfi S (2014) Purinergic receptors and nucleotide processing ectoenzymes: Their roles in regulating mesenchymal stem cell functions. *World J Stem Cells* 6:153. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i2.153>
- Schmid R, Evans RJ (2019) ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. *Annu Rev Physiol* 81:43–62. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114259>
- Schneider EM, Vorlaender K, Ma X, Du W, Weiss M (2006) Role of ATP in trauma-associated cytokine release and apoptosis by P2X7 ion channel stimulation. *Ann N Y Acad Sci* 1090:245–52. <https://doi.org/10.1196/annals.1378.027>
- Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, D'Arena G, Coscia M, Tripodo C, Inghirami G, Robson SC, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S (2011) CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood* 118:6141–6152. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374728>
- Shepherd JH (1989) Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 96:889–92. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1989.tb03341.x>
- Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ (1995) p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol* 26:1268–74. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90204-x](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90204-x)
- Shi L, Feng M, Du S, Wei X, Song H, Yixin X, Song J, Wenxian G (2019) Adenosine Generated by Regulatory T Cells Induces CD8<sup>+</sup> T Cell Exhaustion in Gastric Cancer through A2aR Pathway. *Biomed Res Int* 2019:1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/4093214>
- Shoji K, Oda K, Kashiwama T, et al (2012) Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BE235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial

- carcinomas. PLoS One 7:e37431. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037431>
- Silverberg SG, De Giorgi LS (1973) Clear cell carcinoma of the endometrium. Clinical, pathologic, and ultrastructural findings. *Cancer* 31:1127–40. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197305\)31:5<1127::aid-cncr2820310514>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197305)31:5<1127::aid-cncr2820310514>3.0.co;2-e)
- Simko V (1991) Alkaline phosphatases in biology and medicine. *Dig Dis* 9:189–209. <https://doi.org/10.1159/000171304>
- Slater M, Danieletto S, Gidley-Baird A, Teh LC, Barden JA (2004) Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology* 44:206–15. <https://doi.org/10.1111/j.0309-0167.2004.01798.x>
- Slomovitz BM, Coleman RL (2012) The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 18:5856–64. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0662>
- Slomovitz BM, Jiang Y, Yates MS, Soliman PT, Johnston T, Nowakowski M, Levenback C, Zhang Q, Ring K, Munsell MF, Gershenson DM, Lu KH, Coleman RL (2015) Phase II study of everolimus and letrozole in patients with recurrent endometrial carcinoma. *J Clin Oncol* 33:930–6. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3401>
- Sneddon P, Westfall DP (1984) Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are co-transmitters in the guinea-pig vas deferens. *J Physiol* 347:561–80. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015083>
- Soslow RA (2013) High-grade endometrial carcinomas - strategies for typing. *Histopathology* 62:89–110. <https://doi.org/10.1111/his.12029>
- Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, Azambuja AA, Barrios CH, Morrone FB, Oliveira Battastini AM (2010) Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol* 28:260–7. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2009.01.035>
- Stelloo E, Jansen AML, Osse EM, Nout RA, Creutzberg CL, Ruano D, Church DN, Morreau H, Smit VTHBM, van Wezel T, Bosse T (2017) Practical guidance for mismatch repair-deficiency testing in endometrial cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 28:96–102. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw542>
- Su X, Zhan P, Gavine PR, Morgan S, Womack C, Ni X, Shen D, Bang Y-J, Im S-A, Ho Kim W, Jung E-J, Grabsch HI, Kilgour E (2014) FGFR2 amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer* 110:967–75. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.802>
- Subramaniam KS, Tham ST, Mohamed Z, Woo YL, Mat Adenan NA, Chung I (2013) Cancer-Associated Fibroblasts Promote Proliferation of Endometrial Cancer Cells. *PLoS One* 8:e68923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068923>
- Syed SK, Kauffman AL, Beavers LS, Alston JT, Farb TB, Ficorilli J, Marcelo MC, Brenner MB, Bokvist K, Barrett DG, Efanov AM (2013) Ectonucleotidase NTPDase3 is abundant in pancreatic  $\beta$ -cells and regulates glucose-induced insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305:E1319-26.

---

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00328.2013>

- Tafe LJ, Riggs ER, Tsongalis GJ (2014) Lynch syndrome presenting as endometrial cancer. *Clin Chem* 60:111–21. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.206888>
- Talhok A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, Yang W, Senz J, Boyd N, Karnezis AN, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN (2015) A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer* 113:299–310. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.190>
- Talhok A, McConechy MK, Leung S, Yang W, Lum A, Senz J, Boyd N, Pike J, Anglesio M, Kwon JS, Karnezis AN, Huntsman DG, Gilks CB, McAlpine JN (2017) Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer* 123:802–813. <https://doi.org/10.1002/cncr.30496>
- Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM (1998) Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280:1614–7. <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1614>
- Tanaka T, Terai Y, Fujiwara S, Tanaka Y, Sasaki H, Tsunetoh S, Yamamoto K, Yamada T, Ohmichi M (2018) The detection of sentinel lymph nodes in laparoscopic surgery can eliminate systemic lymphadenectomy for patients with early stage endometrial cancer. *Int J Clin Oncol* 23:305–313. <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1196-9>
- Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L (1997) p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 150:177–85
- Teng F, Tian W-Y, Wang Y-M, Zhang Y-F, Guo F, Zhao J, Gao C, Xue F-X (2016) Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. *J Hematol Oncol* 9:8. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0231-4>
- Trapero C, Martín-Satué M (2020) Purinergic Signaling in Endometriosis-Associated Pain. *Int J Mol Sci* 21:8512. <https://doi.org/10.3390/ijms21228512>
- Trapero C, Vidal A, Fernández-Montolí ME, Coroleu B, Tresserra F, Barri P, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Ponce J, Matias-Guiu X, Martín-Satué M (2019a) 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* 20:. <https://doi.org/10.3390/ijms20225532>
- Trapero C, Vidal A, Rodríguez-Martínez A, Sévigny J, Ponce J, Coroleu B, Matias-Guiu X, Martín-Satué M (2019b) The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: a novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells. *Purinergic Signal* 15:225–236. <https://doi.org/10.1007/s11302-019-09656-3>
- Tu MT, Luo SF, Wang CC, Chien CS, Chiu CT, Lin CC, Yang CM (2000) P2Y(2) receptor-mediated proliferation of C(6) glioma cells via activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway. *Br J Pharmacol* 129:1481–9. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703182>
- Turcotte M, Spring K, Pommey S, Chouinard G, Cousineau I, George J, Chen GM, Gendoo DMA, Haibe-Kains B, Karn T, Rahimi K, Le Page C, Provencher D, Mes-

- Masson A-M, Stagg J (2015) CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res* 75:4494–503. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3569>
- van den Heerik ASVM, Horeweg N, de Boer SM, Bosse T, Creutzberg CL (2021) Adjuvant therapy for endometrial cancer in the era of molecular classification: radiotherapy, chemoradiation and novel targets for therapy. *Int J Gynecol cancer* 31:594–604. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-001822>
- van Gool IC, Eggink FA, Freeman-Mills L, Stelloo E, Marchi E, de Bruyn M, Palles C, Nout RA, de Kroon CD, Osse EM, Klenerman P, Creutzberg CL, Tomlinson IP, Smit VT, Nijman HW, Bosse T, Church DN (2015) POLE Proofreading Mutations Elicit an Antitumor Immune Response in Endometrial Cancer. *Clin Cancer Res* 21:3347–3355. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0057>
- Vázquez-Cuevas FG, Martínez-Ramírez AS, Robles-Martínez L, Garay E, García-Carrancá A, Pérez-Montiel D, Castañeda-García C, Arellano RO (2014) Paracrine stimulation of P2X7 receptor by ATP activates a proliferative pathway in ovarian carcinoma cells. *J Cell Biochem* 115:1955–66. <https://doi.org/10.1002/jcb.24867>
- Villamonte ML, Torrejón-Escribano B, Rodríguez-Martínez A, Trapero C, Vidal A, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Matías-Guiu X, Martín-Satué M (2018) Characterization of ecto-nucleotidases in human oviducts with an improved approach simultaneously identifying protein expression and in situ enzyme activity. *Histochem Cell Biol* 149:269–276. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1627-8>
- Vogelstein B, Kinzler KW (1992) p53 function and dysfunction. *Cell* 70:523–6. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90421-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90421-8)
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789–99. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- von Kügelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110:415–32. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.08.014>
- Vongtau HO, Lavoie EG, Sévigny J, Molliver DC (2011) Distribution of ecto-nucleotidases in mouse sensory circuits suggests roles for nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3 in nociception and mechanoreception. *Neuroscience* 193:387–98. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.07.044>
- Vultaggio-Poma V, Sarti AC, Di Virgilio F (2020) Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells* 9:. <https://doi.org/10.3390/cells9112496>
- Wachstein M, Meisel E (1957) Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH; with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am J Clin Pathol* 27:13–23. <https://doi.org/10.1093/ajcp/27.1.13>
- Wang D, Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307–20. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
- Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, Yin L, Shao Z, Ou Z, Zhou P (2008) Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer

- cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 134:365–372. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0292-z>
- Wink MR, Braganhol E, Tamajusuku ASK, Casali EA, Karl J, Barreto-Chaves ML, Sarkis JF, Battastini AMO (2003) Extracellular adenine nucleotides metabolism in astrocyte cultures from different brain regions. *Neurochem Int* 43:621–8. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(03\)00094-9](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(03)00094-9)
- Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, et al (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118–45. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.2775>
- Wu HY, Broderick GA, Suh JK, Hypolite JA, Levin RM (1993) Effects of purines on rabbit corpus cavernosum contractile activity. *Int J Impot Res* 5:161–7
- Xie R, Xu J, Wen G, Jin H, Liu X, Yang Y, Ji B, Jiang Y, Song P, Dong H, Tuo B (2014) The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J Biol Chem* 289:19137–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540047>
- Xiong L, Wen Y, Miao X, Yang Z (2014) NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial–mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell Tissue Res* 355:365–374. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1752-1>
- Yang H, Geng Y-H, Wang P, Zhou Y-T, Yang H, Huo Y-F, Zhang H-Q, Li Y, He H-Y, Tian X-X, Fang W-G (2019) Extracellular ATP promotes breast cancer invasion and epithelial–mesenchymal transition via hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  signaling. *Cancer Sci* 110:2456–2470. <https://doi.org/10.1111/cas.14086>
- Yano T, Horie K, Kanamoto R, Kitagawa H, Funakoshi I, Yamashina I (1987) Immunoaffinity purification and characterization of nucleotide pyrophosphatase from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 147:1061–9. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(87\)80178-x](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(87)80178-x)
- Yano Y (2004) Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-1 (E-NPP1/PC-1) and -3 (E-NPP3/CD203c/PD-I $\beta$ /B10/gp130RB13-6) in inflammatory and neoplastic bile duct diseases. *Cancer Lett* 207:139–147. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.11.002>
- Yano Y, Hayashi Y, Sano K, Shinmaru H, Kuroda Y, Yokozaki H, Yoon S, Kasuga M (2003) Expression and localization of ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I-3 (E-NPP3/CD203c/PD-I beta/B10/gp130RB13-6) in human colon carcinoma. *Int J Mol Med* 12:763–6
- Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P (2008) Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol* 8:393–412. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.08.004>
- Yegutkin GG (2014) Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit Rev*

- Biochem Mol Biol 49:473–497. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>
- Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>
- Yen T-T, Wang T-L, Fader AN, Shih I-M, Gaillard S (2020) Molecular Classification and Emerging Targeted Therapy in Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Pathol* 39:26–35. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000585>
- Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, Catusus L, Abal M, Colas E, Reventos J, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X (2013) Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene* 32:403–413. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.76>
- Yin F-F, Zhao L-J, Ji X-Y, Duan N, Wang Y-K, Zhou J-Y, Wei L-H, He X-J, Wang J-L, Li X-P (2019) Intra-tumor heterogeneity for endometrial cancer and its clinical significance. *Chin Med J (Engl)* 132:1550–1562. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000286>
- Yip L, Woehrle T, Corriden R, Hirsh M, Chen Y, Inoue Y, Ferrari V, Insel PA, Junger WG (2009) Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J* 23:1685–93. <https://doi.org/10.1096/fj.08-126458>
- Young A, Ngiow SF, Barkauskas DS, Sult E, Hay C, Blake SJ, Huang Q, Liu J, Takeda K, Teng MWL, Sachsenmeier K, Smyth MJ (2016) Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell* 30:391–403. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.025>
- Zaher DM, El-Gamal MI, Omar HA, Aljareh SN, Al-Shamma SA, Ali AJ, Zaib S, Iqbal J (2020) Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. *Arch Pharm (Weinheim)* 353:e2000011. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000011>
- Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP (1995) The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 75:81–6. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950101\)75:1<81::aid-cnrcr2820750114>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950101)75:1<81::aid-cnrcr2820750114>3.0.co;2-f)
- Zhang B, Cheng B, Li FS, Ding JH, Feng YY, Zhuo GZ, Wei HF, Zhao K (2015a) High expression of CD39/ENTPD1 in malignant epithelial cells of human rectal adenocarcinoma. *Tumor Biol* 36:9411–9419. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3683-9>
- Zhang B, Song B, Wang X, Chang XS, Pang T, Zhang X, Yin K, Fang GE (2015b) The expression and clinical significance of CD73 molecule in human rectal adenocarcinoma. *Tumor Biol* 36:5459–5466. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3212-x>
- Zhang X, Liang SX, Jia L, Chen N, Fadare O, Schwartz PE, Kong B, Zheng W (2009) Molecular identification of “latent precancers” for endometrial serous carcinoma in benign-appearing endometrium. *Am J Pathol* 174:2000–6.



- 
- <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081085>
- Zhang Y, Ding J, Wang L (2019) The role of P2X7 receptor in prognosis and metastasis of colorectal cancer. *Adv Med Sci* 64:388–394.  
<https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.05.002>
- Zheng W, Xiang L, Fadare O, Kong B (2011) A proposed model for endometrial serous carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 35:e1–e14.  
<https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318202772e>
- Zimmermann H (1992) 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285 ( Pt 2:345–65. <https://doi.org/10.1042/bj2850345>
- Zimmermann H (2016) Extracellular ATP and other nucleotides—ubiquitous triggers of intercellular messenger release. *Purinergic Signal* 12:25–57.  
<https://doi.org/10.1007/s11302-015-9483-2>
- Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502.  
<https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>
- 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* 21:884–900.  
<https://doi.org/10.1089/scd.2010.0576>
- Zylka MJ (2011) Pain-relieving prospects for adenosine receptors and ectonucleotidases. *Trends Mol Med* 17:188–96. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.12.006>

# ANEXO 1

In situ identification of ectoenzymes involved in  
the hydrolysis of extracellular nucleotides



# 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.

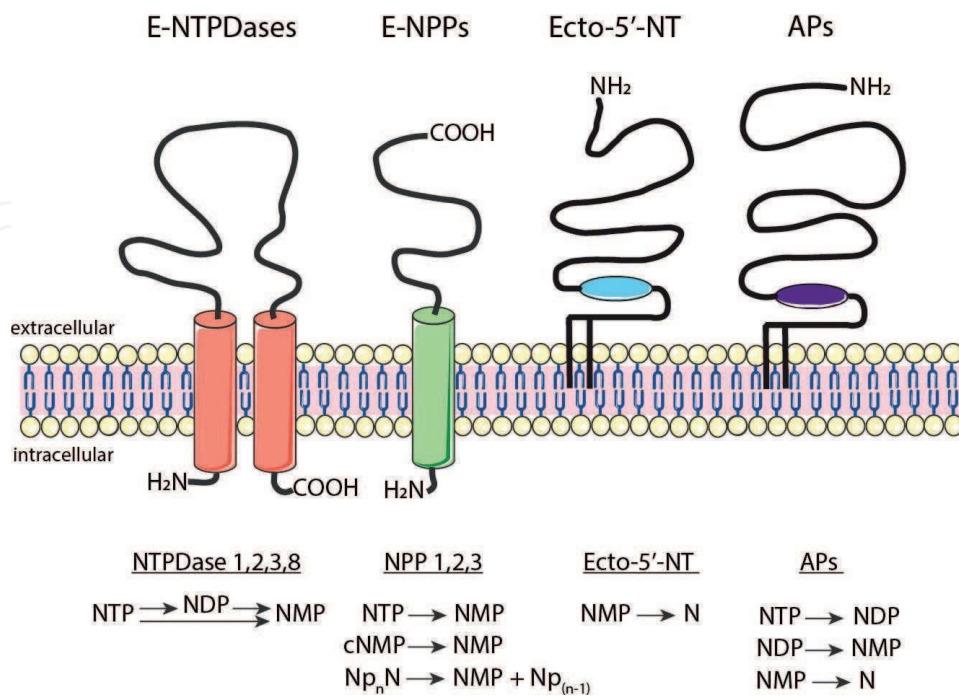
There are four families of membrane-bound ecto-nucleotidases. Other nucleotidases act intracellularly but are not studied here. The main features of ecto-nucleotidases are included in **Figure 1** and summarized below:

### 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<sup>2+</sup> 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

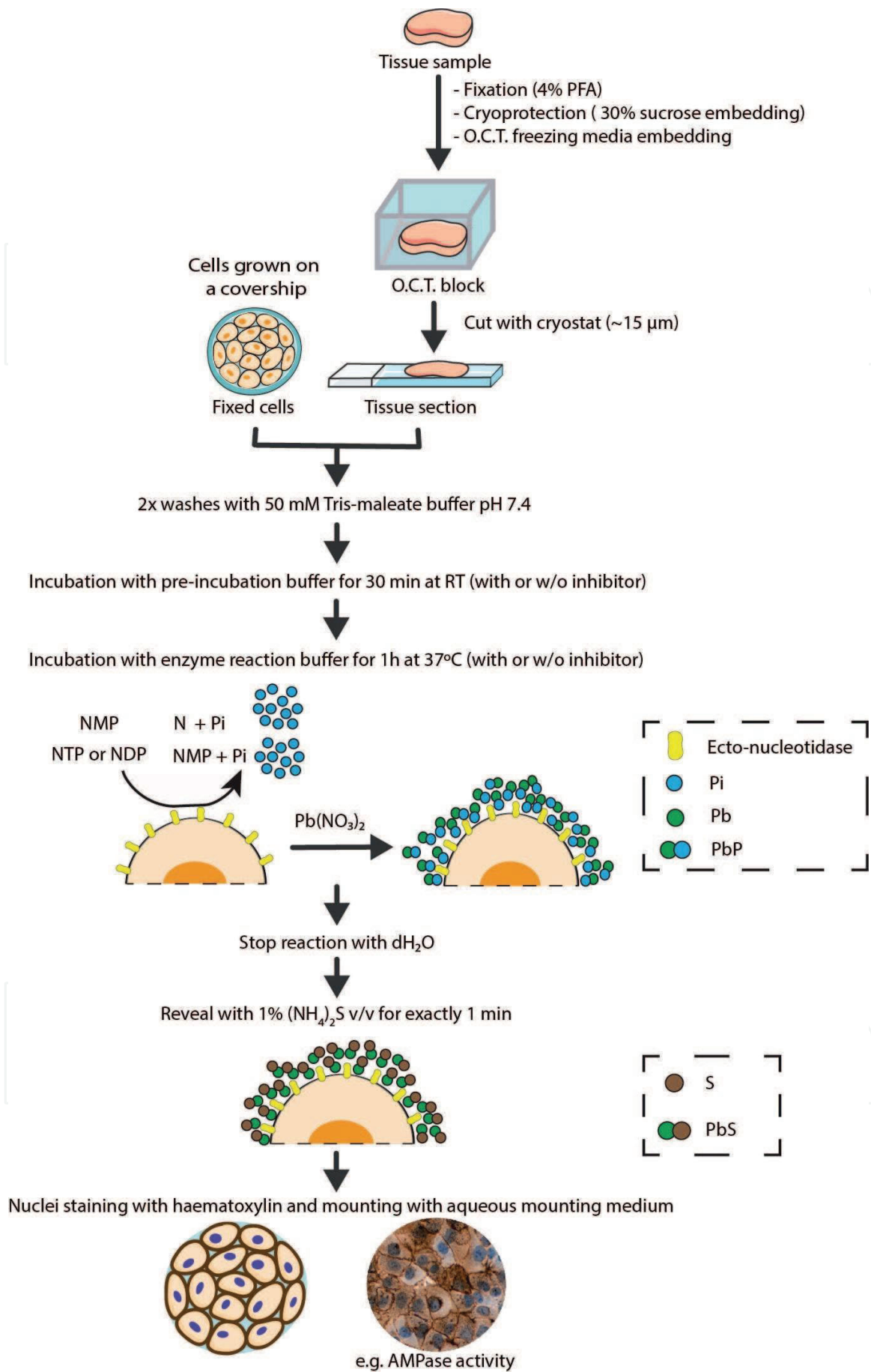
The protocol detailed here for the detection of E-NTPDases, E-NPPs, and eN is based on the Wachstein-Meisel lead phosphate method [18], and the protocol for AP identification is based on the Gossrau method [19], with some modifications.

### 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 (V=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

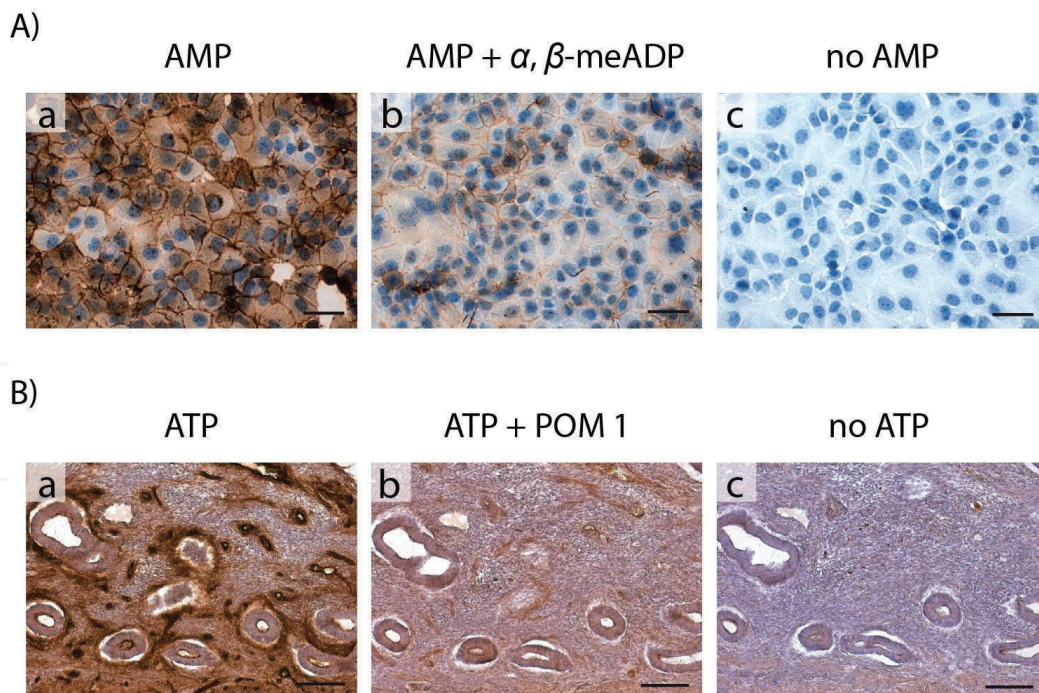
  

ENZYME REACTION BUFFER			
Reagent	Stock Solution	Final Concentration	Volume (V=1mL)
Tris-maleate	200 mM	50 mM	250 µL
Sucrose	1 M	0.25 M	250 µL
Dextran	10 %	3 %	300 µL
MnCl <sub>2</sub>	1 M	5 mM	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	1 M	2 mM	2 µL
CaCl <sub>2</sub>	1 M	2 mM	2 µL
Levamisole	250 mM	2.5 mM	10 µL
Pb(NO <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**).



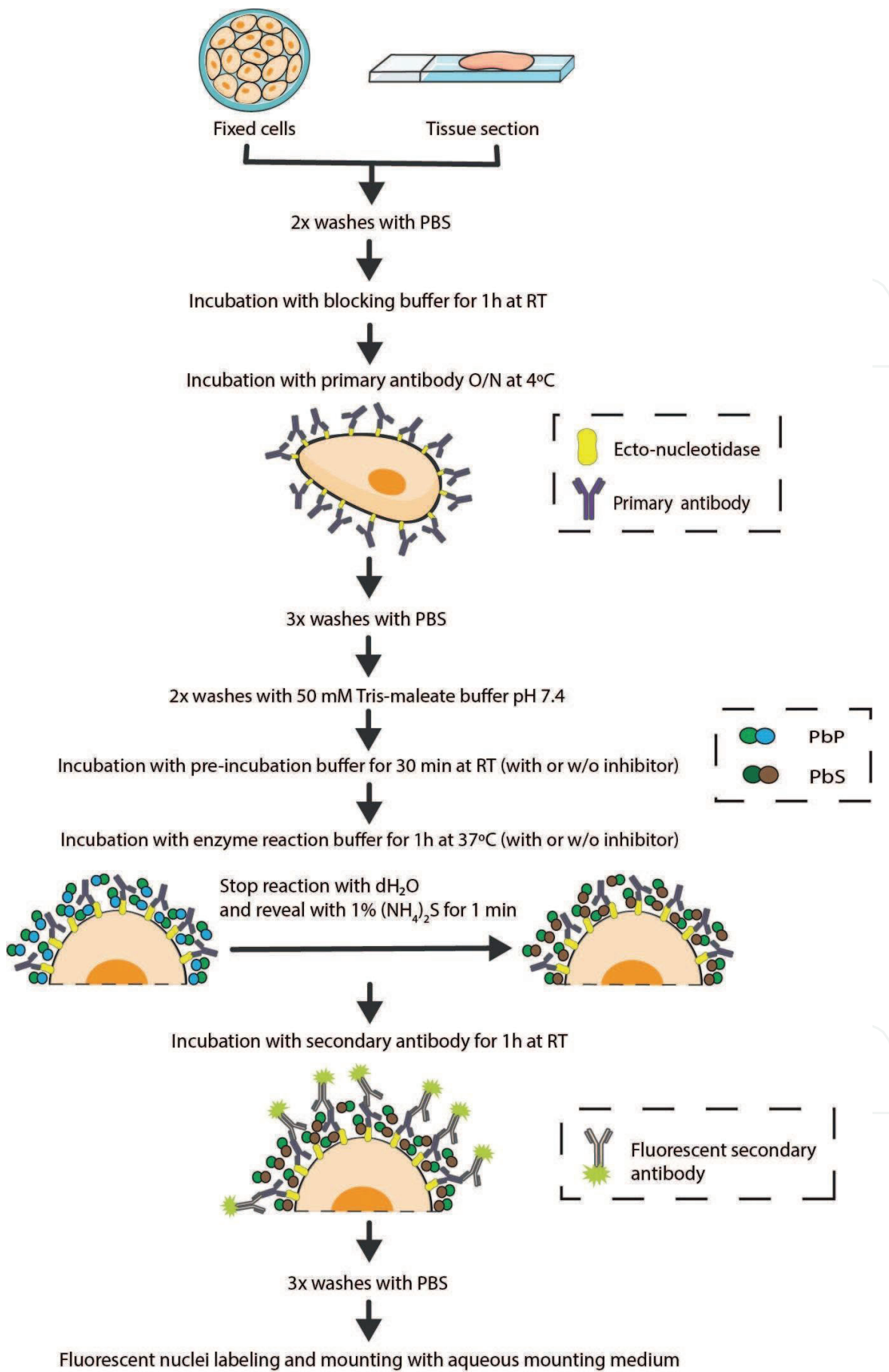
**Figure 3.**  
(A) *In situ* AMPase activity in the endometrial carcinoma human HEC-1B cell line in the presence of 1 mM AMP (a). Note that most of the activity is located at the cell membrane, where CD73 is expressed. Incubation in the presence of the inhibitor  $\alpha, \beta$ -methylene-ADP ( $\alpha, \beta$ -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  $\mu$ m (a) and 200  $\mu$ 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  $MgCl_2$  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.



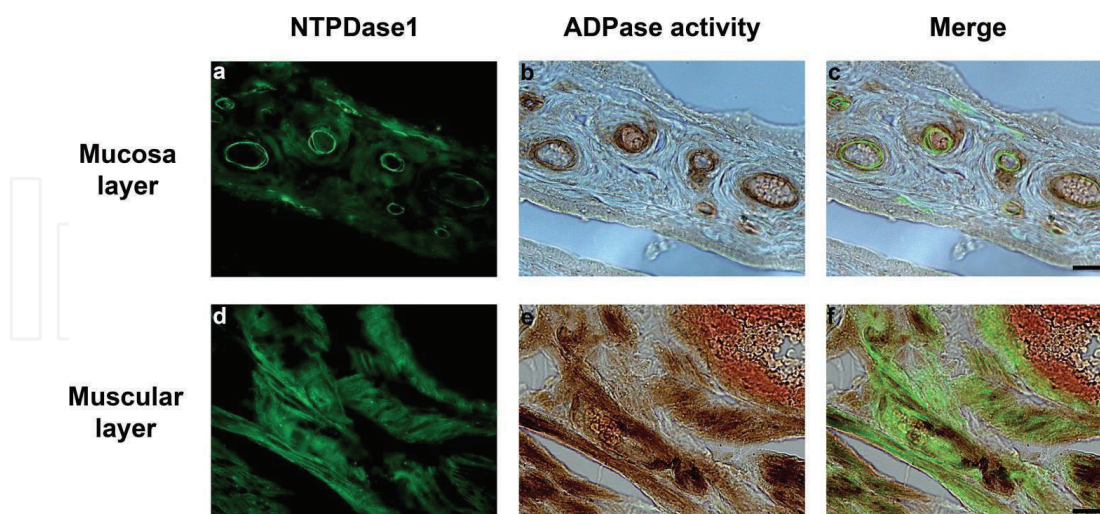
**Figure 4.** Scheme including the main steps of the method combining immunofluorescence and *in situ* ecto-nucleotidase activity detection protocols.

### 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.

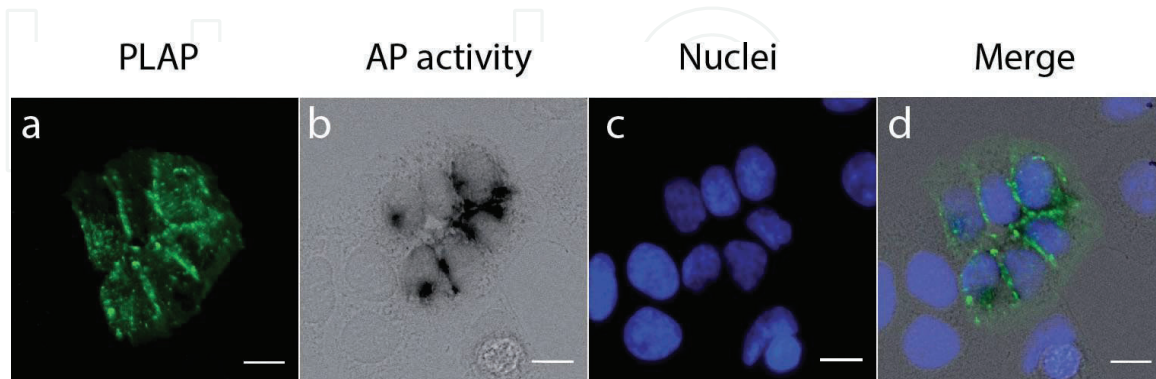
We recommend that histochemistry be performed between primary and secondary antibody incubations, but other protocols are also feasible. This is of interest when using inhibitory antibodies. In these cases the in situ histochemistry should be performed at the beginning of the procedure. It also has to 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  $\mu\text{m}$ . 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, Ansell) 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.


### 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





## ANEXO 2

Portada de la revista *Histochemistry and Cell Biology*, año 2018, volumen 149(3).

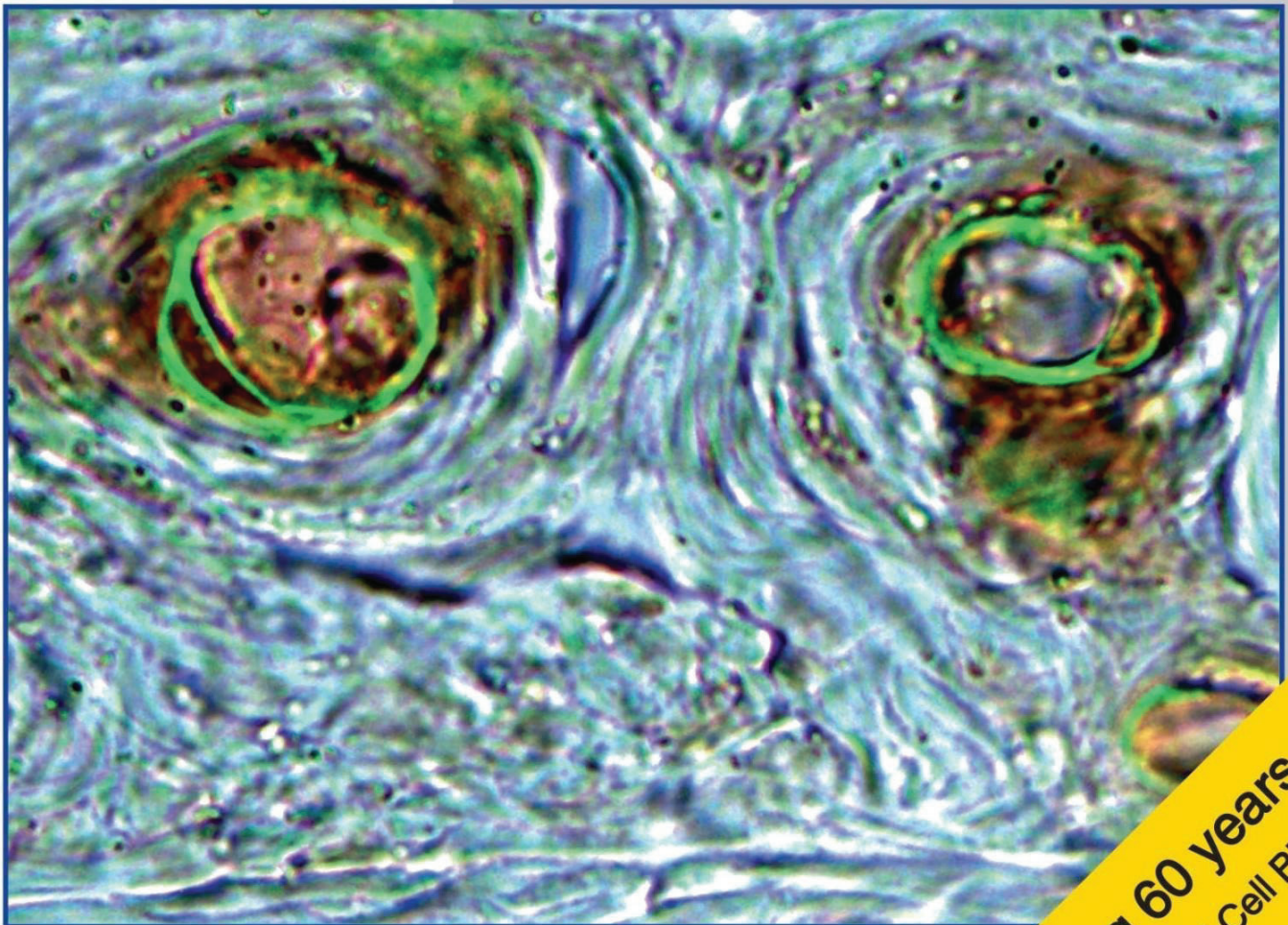


# Histochemistry and Cell Biology

**Free!  
Color!**

Volume 149 / Number 3 / March 2018

Online submission: <https://www.editorialmanager.com/hacb/>



 Springer

**Celebrating 60 years**  
of Histochemistry and Cell Biology



