



La senyalització purinèrgica al sistema reproductor. Paper de les ecto-nucleotidases a l'endometri no tumoral i amb adenocarcinoma

Elisabeth Aliagas Marín

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

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

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



Programa de Doctorat en Biomedicina

2011-2014

**La senyalització purinèrgica al sistema reproductor.
Paper de les ecto-nucleotidases a l'endometri no
tumoral i amb adenocarcinoma.**

Tesi doctoral

Elisabeth Aliagas Marín

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Directora

Dra. Mireia Martín Satué

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

Barcelona, 2014



Programa de Doctorat en Biomedicina

2011-2014

**La senyalització purinèrgica al sistema reproductor.
Paper de les ecto-nucleotidases a l'endometri no
tumoral i amb adenocarcinoma.**

Memòria presentada per Elisabeth Aliagas Marín per optar al títol de doctor per la

Universitat de Barcelona

La doctoranda,

Elisabeth Aliagas Marín

La directora de la tesi,

Dra. Mireia Martín Satué

Barcelona, 2014

“The part of my life I like most is the next one”

Pablo Picasso

A la meva germana,

ÍNDEX

“Facts are the air of scientists. Without them you can never fly”

Linus Pauling

LLISTAT D'ABREVIATURES	17
INTRODUCCIÓ	23
1. Senyalització purinèrgica	23
2. Vies d'alliberació dels nucleòtids i nucleòsids extracel·lulars	24
3. Receptors de nucleòsids i nucleòtids	25
4. Metabolisme extracel·lular de l'ATP i l'adenosina	27
5. Tipus i característiques de les ecto-nucleotidases	30
5.1 Família de les ecto-nucleòsid trifosfat difosfohidrolases (E-NTPDases/CD39)	30
5.1.1 Activitat enzimàtica de les E-NTPDases	30
5.1.2 Estructura molecular de les E-NTPDases	30
5.1.3 Localització cel·lular de les E-NTPDases	31
5.1.4 Distribució cel·lular i tissular de les E-NTPDases	31
5.1.5 Funcions fisiològiques i fisiopatològiques de les E-NTPDases	32
5.2 Família de les ecto-nucleòtid pirofosfatases/fosfodiesterases (E-NPPs)	33
5.2.1 Activitat enzimàtica de les E-NPPs	33
5.2.2 Estructura molecular de les E-NPPs	33
5.2.3 Localització cel·lular de les E-NPPs	33
5.2.4 Distribució cel·lular i tissular de les E-NPPs	33
5.2.5 Funcions fisiològiques i fisiopatològiques de les E-NPPs	34
5.3 Família de les fosfatases alcalines	34
5.3.1 Activitat enzimàtica de les fosfatases alcalines	34
5.3.2 Estructura molecular de les fosfatases alcalines	34
5.3.3 Localització cel·lular de les fosfatases alcalines	35
5.3.4 Distribució cel·lular i tissular de les fosfatases alcalines	35
5.3.5 Funcions fisiològiques i fisiopatològiques de les fosfatases alcalines	35
5.4 Família de les 5'-nucleotidases	35
5.4.1 Activitat enzimàtica de CD73	36
5.4.2 Estructura molecular de CD73	36
5.4.3 Localització cel·lular de CD73	36
5.4.4 Distribució cel·lular i tissular de CD73	36

5.4.5 Funcions fisiològiques i fisiopatològiques de CD73	37
6. Senyalització purinèrgica al sistema reproductor	37
6.1 Senyalització purinèrgica als òrgans reproductors masculins	38
6.2 Senyalització purinèrgica als òrgans reproductors femenins	41
6.2.1 Senyalització purinèrgica a l'endometri	43
7. Senyalització purinèrgica al càncer	44
7.1 Context general	44
7.2 Paper de l'ATP al càncer	45
7.3 Paper de l'adenosina al càncer	46
7.4 Paper de les ecto-nucleotidases al càncer	48
8. El càncer d'endometri	50
8.1 Senyalització purinèrgica al càncer d'endometri	52
OBJECTIUS	57
RESULTATS	61
CAPÍTOL 1. <i>Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidasa/CD73 along the mouse female estrous cycle</i>	65
CAPÍTOL 2. <i>Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium</i>	77
CAPÍTOL 3. <i>High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors</i>	91
CAPÍTOL 4. Validació de models cel·lulars per a l'estudi de les ecto-nucleotidases. Efecte del tamoxifen, l'anastrozol i l'estradiol	105
INTRODUCCIÓ	106
OBJECTIUS	107
MATERIALS I MÈTODES	107
RESULTATS	119
PRIMER APARTAT	119
SEGON APARTAT	135
DISCUSSIÓ	144
DISCUSSIÓ	153
CONCLUSIONS	163
BIBLIOGRAFIA	167

ANNEX 1	193
ANNEX 2	205
ANNEX 3	219
AGRAÏMENTS	233

LLISTAT D'ABREVIATURES

*"The scientist is not a person who gives the right answers,
is the one who asks the right questions"*

Claude Lévi-Strauss

LLISTAT D'ABREVIATURES

	2-MeSADP	2-metiltio ADP
A	α,β -meADP	Alfa, beta-metilen adenosina difosfat
	α,β -meATP	Alfa, beta-metilen adenosina trifosfat
	ACR	<i>Apyrase conserved regions</i> , regions conservades de l'apirasa
	ADA	Adenosina deaminasa
	ADK	Adenosina quinasa
	Ado	Adenosina
	ADP	Adenosina-5'-difosfat
	AMP	Adenosina-5'-monofosfat
	AMPC	Adenosina-5'-monofosfat cíclic
	ANOVA	<i>One-way analysis of variance</i>
	AP	<i>Alkaline phosphatase</i> , fosfatasa alcalina
	ATCC	<i>American type culture collection</i>
	ATP	Adenosina-5'-trifosfat
C	cDNA	DNA complementari
	CE	Carcinoma endometrial
	CF	Citometria de flux
	CHX	Cicloheximida
	CNT	<i>Concentrative nucleoside transporter</i> , transportadors de nucleòsids concentratius
D	DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
	DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> , dimetilsulfòxid
	DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , àcid desoxiribonucleic
E	E ₂	17 β Estradiol
	ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
	EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> , àcid tetraacètic del glicol d'etilè
	E-NPP	Ecto-nucleòtid pirofosfatasa/fosfodiesterasa
	ENT	<i>Equilibrative nucleoside transporter</i> , transportadors de nucleòsids equilibratius
	E-NTPDasa	Ecto-nucleòsid trifosfat difosfohidrolasa
F	F	<i>Forward</i>
	FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , sèrum fetal boví

	FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i> , receptor del factor de creixement de fibroblasts
G	GCAP	<i>Germ cell alkaline phosphatase</i> , fosfatasa alcalina germinal
	GPI	Glicosil fosfatidil inositol
H	HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
	HEPES	<i>2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid</i>
I	IAP	<i>Intestinal alkaline phosphatase</i> , fosfatasa alcalina intestinal
	IF	Immunofluorescència
K	kDa	Quilodaltons
M	M β CD	Metil- β -ciclodextrina
	MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
N	NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide reduced</i> , dinucleòtid d'adenina nicotinamida reduït
	NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced</i> , dinucleòtid d'adenina nicotinamida fosfat reduït
	NECA	<i>5'-N-etilcarboxamidoadenosina</i>
O	O.C.T	<i>Optimal cryostat temperature</i>
P	PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> , tampó de fosfat salí
	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacció en cadena de la polimerasa
	PFA	Paraformaldehid
	Pi	Fosfat inorgànic
	PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
	PLAP	<i>Placental alkaline phosphatase</i> , fosfatasa alcalina placentària
	PM	Pes molecular
	PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
	PPi	Pirofosfat inorgànic
	PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
	p/v	Parts per volum
R	R	<i>Reverse</i>
	RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , àcid ribonucleic
	rpm	Revolucions per minut
	RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
	RQ	<i>Relative quantification</i> , quantificació relativa

	RT-PCR	<i>Real time – polymerase chain reaction</i> , reacció en cadena de la polimerasa a temps real
S	SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
	SEM	<i>Standard error of the mean</i> , error estàndard de la mitja
	SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i> , modulador selectiu dels receptors d'estrògens
T	TA	Temperatura ambient
	TAM	Tamoxifen
	TBS	<i>Tris buffer solution</i>
	TLDA	<i>TaqMan low-density array</i>
	TNAP	<i>Tissue non specific alkaline phosphatase</i> , fosfatasa alcalina no específica de teixit
	TNP-ATP	[2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP]
U	U	Unitat
	UDP	Uridina-5'-difosfat
	UTP	Uridina-5'-trifosfat
V	v/v	Volum per volum
W	WB	Western Blot

INTRODUCCIÓ

“I would give everything I know for half of what I ignore”

René Descartes

INTRODUCCIÓ

La present tesi doctoral pretén contribuir al coneixement de la senyalització purinèrgica estudiant la seva implicació en els processos fisiològics i fisiopatològics que tenen lloc a l'aparell reproductor, així com en patologies relacionades amb aquest aparell com és el càncer d'endometri. Per aconseguir aquesta fita, he estudiat l'expressió i l'activitat de les ecto-nucleotidases, així com la regulació d'aquestes, a través de tècniques histològiques, immunològiques i moleculars.

1. SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA

Al 1972, Geoffrey Burnstock, proposa l'adenosina- 5'-trifosfat (ATP) com el transmissor que s'allibera en les vies de senyalització de tipus no colinèrgic i de tipus no adrenèrgic, i descriu per primera vegada la **senyalització purinèrgica**, on els nucleòtids extracel·lulars, com l'ATP, i els nucleòsids que deriven de la seva hidròlisi, com l'adenosina (Ado), actuen extracel·lularment com a molècules senyalitzadores (Burnstock, 1972). Des d'aleshores, el coneixement de la senyalització purinèrgica no ha parat de créixer.

L'ATP intracel·lular, present en totes les cèl·lules vives, és utilitzat principalment en processos que requereixen energia com per exemple el transport actiu, la motilitat cel·lular i la biosíntesi. A més, quan es troba en el compartiment extracel·lular, participa en múltiples processos biològics. Molts tipus cel·lulars, en condicions fisiològiques i, en especial, en condicions fisiopatològiques, alliberen ATP i altres nucleòtids i nucleòsids a l'espai extracel·lular on intervenen en una gran varietat de funcions biològiques. D'una banda, activen i regulen fenòmens a curt termini com la neurotransmissió, neuromodulació, secreció endocrina i exocrina, quimioatracció, contracció muscular i la inflamació aguda, i de l'altra, participen en respostes prolongades o a llarg termini com la proliferació cel·lular, la diferenciació, la migració, l'apoptosi, l'envelliment, i el càncer (revisat per Burnstock, 2009).

S'entén per senyalització purinèrgica el conjunt d'efectes biològics (autocrins i paracrins) produïts per les purines i les pirimidines en actuar com a lligands extracel·lulars. I, al complex molecular implicat en l'activació, la conservació i la terminació de la senyalització purinèrgica se li ha donat el nom de **purinoma**, i inclou tant els lligands, com els receptors, els transportadors/canals i els enzims de degradació (**Figura 11**). Alteracions en l'equilibri global i dinàmic d'aquest complex podrien causar l'aparició i/o la propagació de diverses patologies (revisat per Volonté i D'Ambrosi, 2009).

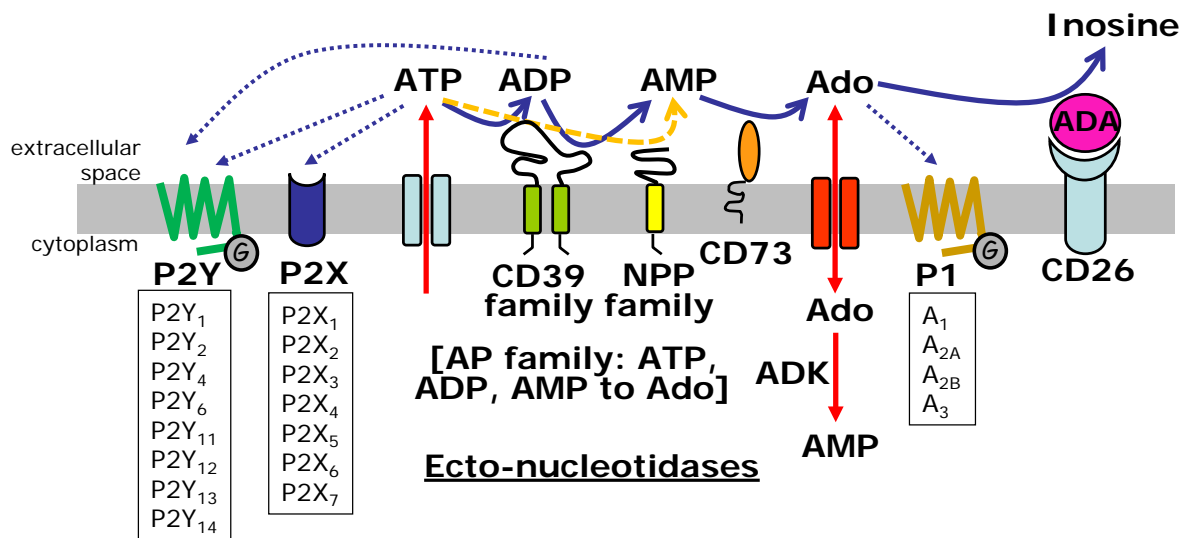


Figura I1. El purionoma. Complex molecular implicat en l'activació, la conservació i la terminació de la senyalització purinèrgica format per: els lligands extracel·lulars (ATP, ADP, AMP i Ado), els receptors purinèrgics (P1 i P2), els transportadors de nucleòtids i nucleòsids i els enzims de degradació (ecto-nucleotidases, ADA i ADK)

2. VIES D'ALLIBERACIÓ DELS NUCLEÒTIDS I NUCLEÒSIDS EXTRACEL·LULARS

L'alliberació d'ATP i altres nucleòtids té lloc a través de diferents mecanismes cel·lulars (**Figura I2**) que engloben vies lítiques com 1) la mort o el dany cel·lular produït en lesions, xocs traumàtics o certs estats inflamatoris (revisat per Bours et al., 2006) o vies no lítiques com 2) l'electrodifusió a través de canals iònics incloent hemicanals de conexina i canals activats per voltatge o estirament (Bahima et al., 2006; Nualart-Martí et al., 2013), 3) la difusió facilitada a través de transportadors específics o 4) l'exocitosi mitjançant vesícules i depenent de calci (Ca^{2+}) (Reigada et al., 2003).

Altres maneres d'explicar perquè els nucleòtids es troben fora de la cèl·lula són: 1) la baixa massa molecular d'aquests, 2) l'elevada taxa de difusió a l'espai extracel·lular, i 3) l'alt gradient de concentració entre els espais intracel·lular i extracel·lular.

L'alliberació de nucleòtids es produeix en teixits secretors i excitable com per exemple els terminals nerviosos, les cèl·lules cromafins, les cèl·lules dels acins pancreàtics i les plaquetes circulants. Aquests teixits emmagatzemen ATP i adenosina-5'-difosfat (ADP), juntament amb altres neurotransmissors i mediadors extracel·lulars, en grànuls especialitzats i regulen l'alliberació de les vesícules mitjançant l'exocitosi regulada pel Ca^{2+} . Els teixits no-excitable com per exemple les cèl·lules epitelials i endotelials, els astròcits i altres cèl·lules de la glia, els fibroblasts, els hepatòcits, els cardiomiòcits, els neutròfils i els macròfag i altres cèl·lules sanguínies, alliberen temporalment ATP sota estímuls de tipus mecànic com l'estrès tensional, la inflamació, la hipòxia, l'estirament, la pressió hidrostàtica i també en resposta a bradicinina, serotonina i altres agonistes farmacològics del

Ca^{2+} (revisat per Yegutkin, 2008). La diversitat de les condicions en què s'allibera ATP i/o ADP suggereix la implicació d'aquestes molècules en múltiples cascades de senyalització (revisat per Yegutkin, 2008).

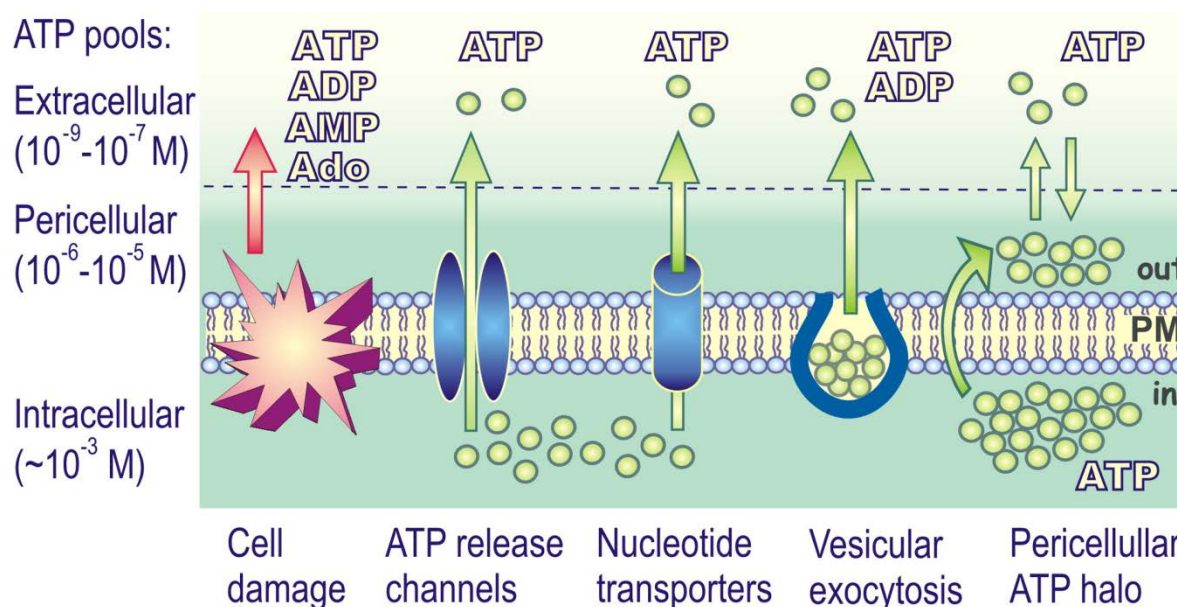


Figura 12. Vies d'alliberació dels nucleòtids i nucleòsids (Yegutkin, 2008)

La concentració extracel·lular d'adenosina ve determinada per l'acció dels enzims involucrats en el seu metabolisme i pel seu transport a través de la membrana plasmàtica. Així doncs, l'adenosina extracel·lular prové de: 1) el transport des del compartiment intracel·lular via transportadors de nucleòsids equilibratius (ENT), on la cèl·lula allibera adenosina per difusió facilitada (Molina-Arcas, Casado i Pastor-Anglada, 2009) i 2) el metabolisme extracel·lular de l'ATP per l'acció de les ectonucleotidases (Robson, Sévigny i Zimmermann, 2006). En situacions d'estrès cel·lular com la hipòxia, la isquèmia o els traumatismes, la concentració d'adenosina extracel·lular incrementa de manera sobtada (Benarroch, 2008; revisat per Kumar i Sharma, 2009; revisat per Eltzhig, 2009).

Un cop a l'espai extracel·lular, els diferents nucleòtids i nucleòsids actuen com a lligands d'una gran varietat de receptors situats a la superfície cel·lular anomenats receptors purinèrgics o **purinoceptors**, que en última instància, són els veritables reguladors de la senyalització purinèrgica i determinen la gran varietat d'efectes produïts per l'ATP i l'adenosina en actuar com a lligands extracel·lulars.

3. RECEPTORS DE NUCLEÒTIDS I NUCLEÒSIDS

Els principals nucleòtids extracel·lulars [ATP, ADP, uridina-5'-trifosfat (UTP) i uridina-5'-difosfat (UDP)] actuen a través de receptors purinèrgics de tipus P2, que es classifiquen segons criteris

farmacològics en dues subfamílies: els receptors P2X i els P2Y. Els receptors ionotròpics P2X són canals iònics dependents de lligand que permeten l'entrada a la cèl·lula de cations en resposta a la unió de l'ATP (únic lligand fisiològic conegut fins ara), i n'existeixen set subtipus (P2X₁₋₇). En canvi, els receptors metabotròpics P2Y, associats a proteïna G, engloben vuit subtipus de receptors (P2Y_{1, 2, 4, 6, 11-14}) que desencadenen el senyal, en resposta a la unió de diversos lligands purinèrgics (ATP, ADP, UTP, UDP, UDP-glucosa i UDP-galactosa), a través de diferents rutes. Així, els receptors P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ i P2Y₆ s'associen a proteïna G del tipus G_q i activen la fosfolipasa C. En canvi, els P2Y₁₂, P2Y₁₃ i P2Y₁₄ estan associats a proteïna G del tipus G_i i inhibeixen l'adenilat ciclase. Per últim, el receptor P2Y₁₁ pot actuar a través d'ambdues vies de senyalització (revisat per Boeynaems et al., 2005; revisat per Yegutkin, 2008; revisat per Di Virgilio, 2012).

Els receptors P2 estan àmpliament distribuïts. Així, els receptors P2X s'expressen al múscul llis, als sistemes nerviós central i cardiovascular, a les neurones sensibles i motores, i a cèl·lules del sistema immunitari entre d'altres (revisat per Surprenant i North, 2009). Els receptors P2Y s'expressen majoritàriament a les cèl·lules endotelials i epitelials en general, als osteoclasts, a la placenta, al ronyó, i també a cèl·lules del sistema immunitari (revisat per Burnstock, 2006).

Els principals agonistes dels receptors P2X són l'ATP i l' α,β -meATP, en canvi, dins les molècules activadores dels receptors P2Y podem trobar l'UTP i el 2-metiltilio ADP (2-MeSADP). Pel que fa als antagonistes, la suramina, el Brilliant Blue G, o el TNP-ATP [2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP], inactiven els receptors P2X, i el Reactive Blue 2 o la suramina, són els principals antagonistes dels receptors P2Y (revisat per von Kügelgen, 2006; revisat per Burnstock, 2007).

Pel que fa als nucleòsids extracel·lulars, l'adenosina exerceix els seus efectes a través de purinoceptors del tipus P1, dels quals se n'han clonat i caracteritzat 4 subtipus A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃, àmpliament distribuïts en l'organisme. Tots ells són membres de la família de receptors acoblats a proteïna G i principalment s'uneixen a l'adenilat ciclase a través de les subunitats- α de la proteïna G. Mentre que els subtipus A₁ i A₃ inhibeixen l'adenilat ciclase, els subtipus A_{2A} i A_{2B} l'activen (Fredholm et al., 2001; Benarroch, 2008).

Els principals efectes fisiològics mediatos pels diferents tipus de receptors de tipus P1 són la modulació dels sistemes cardiovascular, immunitari i nerviós central (Sun et al., 2001).

S'han identificat una gran varietat d'agonistes i d'antagonistes selectius per als receptors de tipus P1. Tots els agonistes coneguts dels receptors P1 presenten una estructura molt similar a la de l'adenosina, permetent petites modificacions. Alguns exemples són el CCPA per l'A₁, el CGS 21680 per l'A_{2A}, el NECA (5'-N-etilcarboxamidoadenosina) per l'A_{2B} i l'IB-MECA per l'A₃. En general, els

receptors P1 d'adenosina són inhibits per metilxantines com la cafeïna i la teofil·lina (revisat per Burnstock, 2007).

Els receptors P1 i P2, en resposta als canvis en la concentració local de nucleòtids i/o nucleòsids, regulen diversos processos biològics com: la quimiotaxis i la retenció de les cèl·lules del sistema immunitari en els llocs on hi ha inflamació, la fagocitosi i l'alliberació de citocines, la proliferació o la citotoxicitat.

4. METABOLISME EXTRACEL·LULAR DE L'ATP I L'ADENOSINA

Mentre que la concentració intracel·lular de l'ATP sol ser elevada (oscil·la entre 3 i 10 mM), la seva concentració extracel·lular és considerablement més baixa (10^4 vegades menor que a l'interior de la cèl·lula). En el plasma, la concentració fisiològica d'ATP, normalment, és submicromolar (varia entre 400 i 700 nM), mentre que la de l'adenosina oscil·la entre 40 i 80 nM (revisat per Bours et al., 2006). No obstant, les concentracions extracel·lulars d'ambdues molècules, ATP i adenosina, poden augmentar marcadament en condicions fisiopatològiques com per exemple la inflamació, la hipòxia i la isquèmia (revisat per Lazarowski et al., 2011).

La concentració d'ATP i d'adenosina a l'espai extracel·lular ve regulada per enzims anomenats genèricament ecto-enzims o **ecto-nucleotidases**, localitzats majoritàriament a la membrana plasmàtica o a l'espai intersticial i en fluids corporals (en la seva forma soluble). La principal funció de les ecto-nucleotidases és hidrolitzar l'ATP i els productes derivats de la seva hidròlisi, com l'ADP i l'adenosina-5-monofosfat (AMP), a través de diferents reaccions enzimàtiques representades a la **Figura I3**.

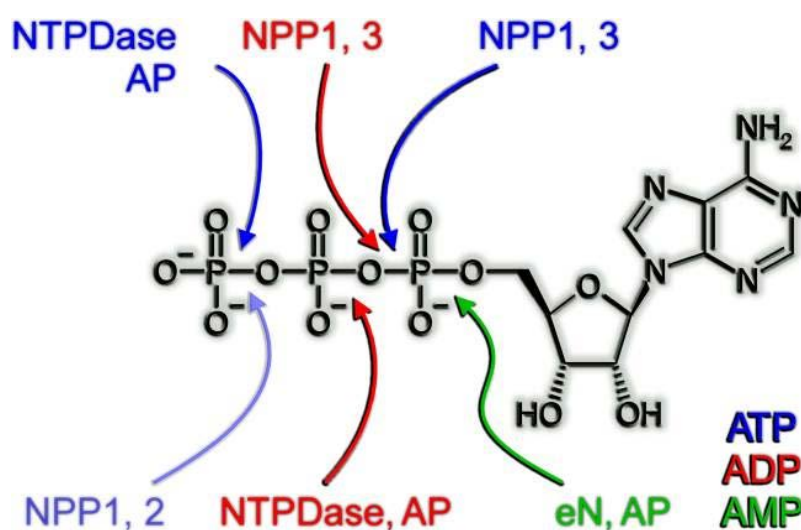


Figura I3. Hidròlisi seqüencial de l'ATP, l'ADP i l'AMP, principals substrats de les ecto-nucleotidases [NTPDases, NPPs, AP i 5'-nucleotidases (eN)] (Zimmermann, Zebisch i Sträter, 2012)

Existeixen quatre famílies d'ecto-nucleotidases (**Figura I4**): a) la família de les **ectonucleòsid trifosfat difosfohidrolases** (E-NTPDases) o família CD39 consta de vuit membres (NTPDasa 1-8) quatre dels quals s'expressen a la membrana plasmàtica (NTPDasa 1, 2, 3 i 8) i hidrolitzen amb diferents afinitats l'ATP i l'ADP fins a AMP, b) la família de les **ecto-nucleòtid pirofosfatases/fosfodiesterases** (E-NPPs) conté set membres (NPP 1-7) dels quals tres (NPP 1, 2 i 3) hidrolitzen l'AMP cíclic (AMPC) fins AMP, i l'ATP i l'ADP fins AMP, c) les **fosfatases alcalines** (AP: de l'anglès *alkaline phosphatase*), catalitzen la degradació de nucleòtids tri-, di- i monofosfats indistintament, i d) la família de les **5'-nucleotidases**, amb l'ecto-5'-nucleotidasa o CD73 (anomenada a partir d'ara CD73) com a únic membre de membrana que actua extracel·lularment desfosforilant l'AMP fins adenosina. Totes elles es troben, principalment, a la superfície cel·lular de pràcticament tots els tipus de cèl·lules, presenten diferents patrons de distribució i, comparteixen parcialment, l'especificitat pel substrat. Les ecto-nucleotidases, actuen conjuntament i de manera seqüencial disminuint les cascades de senyalització iniciades per l'ATP, però també, generen intermediaris amb propietats senyalitzadores, com per exemple, l'adenosina (revisat per Zimmermann, 2000; revisat per Yegutkin, 2008; revisat per Kukulski, Lévesque i Sévigny, 2011; revisat per Al-Rashida i Iqbal, 2013).

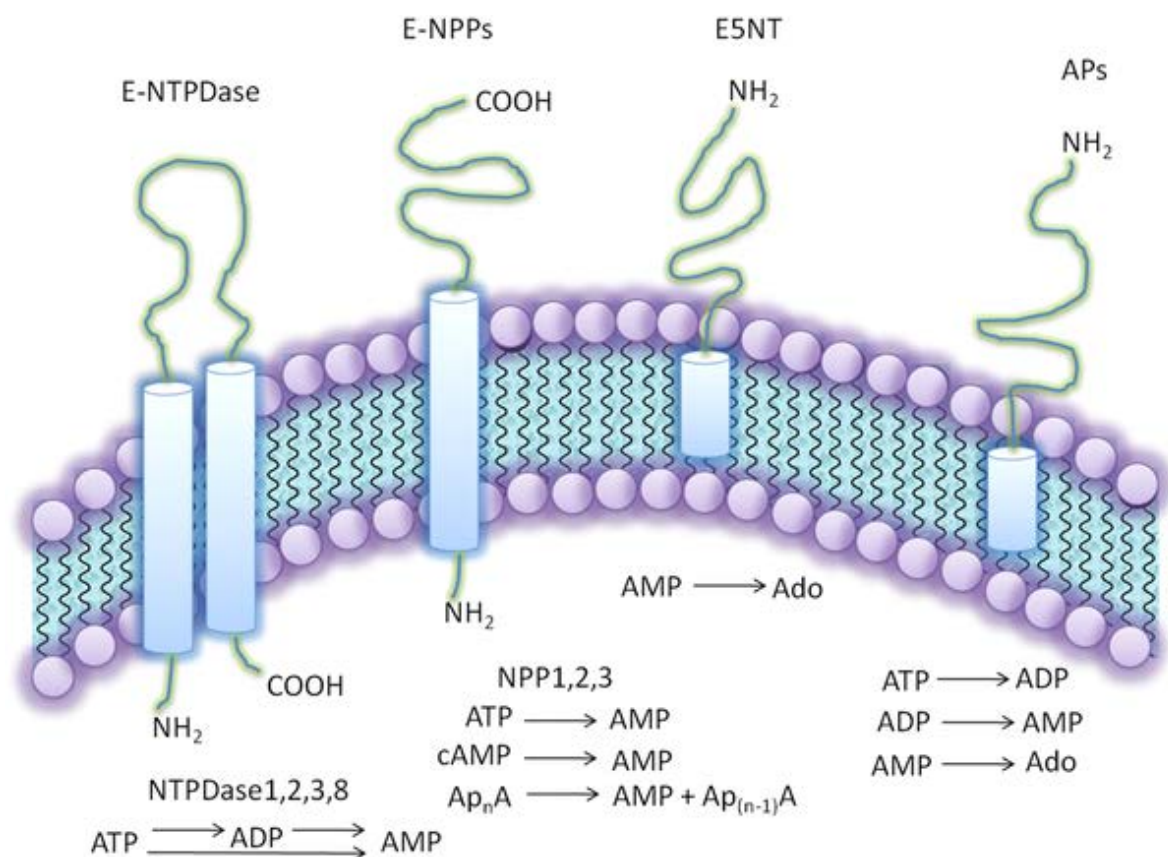


Figura I4. Principals ecto-nucleotidases implicades en el metabolisme dels nucleòtids i nucleòsids extracel·lulars com l'ATP, l'ADP, l'AMP i l'Ado; les E-NTPDases, les E-NPPs, l'E5NT/CD73 i les APs (Al-Rashida i Iqbal, 2013)

Tal com hem explicat, la concentració extracel·lular d'adenosina, està regulada directament per l'enzim que controla la seva formació (CD73), però també, per l'acció d'altres dos enzims anomenats adenosina deaminasa (ADA) i adenosina quinasa (ADK). L'ADA, a través de reaccions de desaminació, inactiva de manera irreversible l'adenosina i la 2'-deoxiadenosina en inosina i 2'-deoxiinosina respectivament, contribuint així, a l'eliminació d'adenosina del compartiment extracel·lular. L'ADA, tot i ser un enzim principalment citosòlic, es pot trobar expressat a la membrana plasmàtica, com a ecto-enzim (ecto-ADA), en associació amb el seu receptor específic CD26 o, alternativament, unit a receptors d'adenosina A₁ o A_{2b}. L'ADK, enzim intracel·lular, catalitza la fosforilació de l'adenosina per formar AMP. L'absorció cel·lular d'adenosina depèn del seu gradient de concentració, per tant, l'ADK indirectament regula l'absorció d'adenosina ja que controla els nivells d'adenosina intracel·lulars. A més, la família de les APs i l'autotaxina (variant post-transcripcional de l'NPP2) són capaces d'hidrolitzar l'AMP formant adenosina, i per tant, participen també en la regulació dels nivells extracel·lulars d'adenosina (revisat per Bours et al., 2006).

A la següent figura es pot observar la complexitat del metabolisme dels nucleòtids i nucleòsids extracel·lulars i els diferents enzims implicats en aquesta via metabòlica (**Figura 15**).

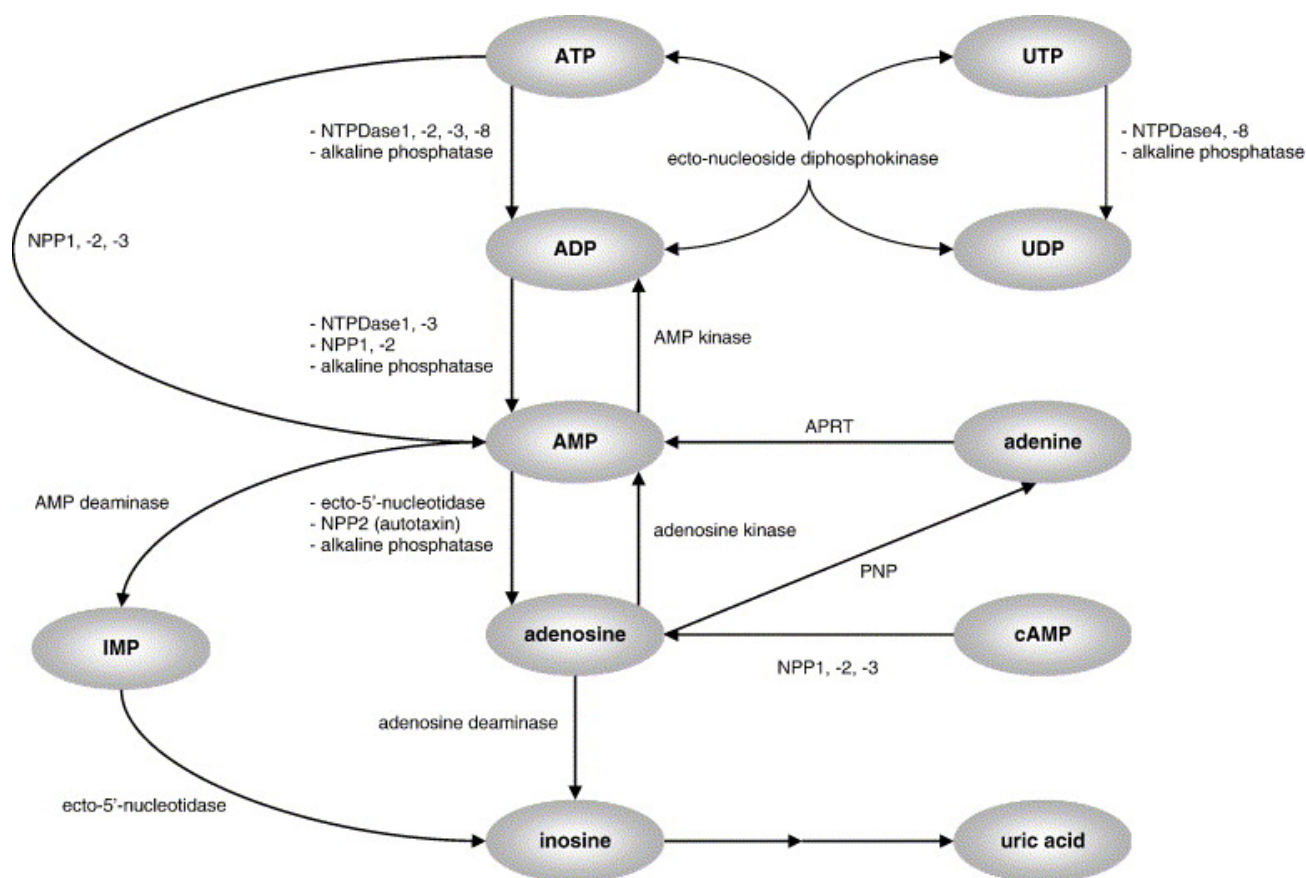


Figura 15. Esquema de les principals vies de conversió de l'ATP i l'adenosina (Bours et al., 2006)

Resumint, en el control dels nivells extracel·lulars de nucleòtids i nucleòsids hi ha involucrats una gran varietat d'enzims que participen simultàniament en vies de generació, degradació o conversió dels nucleòtids i nucleòsids, i per tant, resulten ser essencials en la regulació de la senyalització purinèrgica generada per l'ATP i l'adenosina. La coexistència de totes aquestes vies metabòliques a la superfície cel·lular, on a més es localitzen els receptors de l'ATP i l'adenosina, és determinant per a la duració, magnitud i naturalesa de la senyalització purinèrgica.

5. TIPUS I CARACTERÍSTIQUES DE LES ECTO-NUCLEOTIDASES

A continuació, detallem informació relativa als principals tipus d'ecto-nucleotidases, dedicant especial atenció a l'activitat enzimàtica, a l'estructura molecular, a la localització cel·lular i subcel·lular, a l'expressió en cèl·lules i teixits i a les funcions fisiològiques i fisiopatològiques d'aquests enzims en tractar-se dels principals objectes d'estudi d'aquesta tesi.

5.1 FAMÍLIA DE LES ECTO-NUCLEÒSID TRIFOSFAT DIFOSFOHIDROLASES (E-NTPDases/CD39)

5.1.1 ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LES E-NTPDases

Dins de les ecto-nucleotidases, la família més extensa és la de les E-NTPDases que consta de vuit membres, quatre dels quals s'expressen a la membrana plasmàtica (NTPDasa 1, 2, 3 i 8) i hidrolitzen amb diferents afinitats una gran varietat de nucleòtids trifosfats (per exemple l'ATP i l'UTP) i difosfats (com l'ADP i l'UDP). No són capaços, però, de desfosforilar els monofosfats (com l'AMP). Requereixen la presència de cations divalents com el Ca^{2+} o el magnesi (Mg^{2+}) en concentracions mil·limolars per a assolir la màxima activitat, i en absència, romanen inactius (Kukulski et al., 2005).

L'NTPDasa1 o CD39 (inicialment anomenada apirasa i, a partir d'ara CD39 en aquest treball) hidrolitza pràcticament per igual l'ATP i l'ADP en una proporció aproximada de 1:0.8, en canvi, l'NTPDasa2 és molt eficient hidrolitzant l'ATP però ineficient amb l'ADP, presentant una proporció d'hidròlisi ATP:ADP de 1:0.03. Les NTPDases 3 i 8 degraden preferentment l'ATP, amb un ràtio d'hidròlisi ATP:ADP de 1:0.3 (revisat per Zimmermann, Zebisch i Sträter, 2012).

5.1.2 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LES E-NTPDases

Els membres de la família de les E-NTPDases poden ser classificats en dos grups segons la seva estructura molecular. El primer grup inclou les NTPDases 1, 2, 3, 4, 7 i 8. L'estructura molecular d'aquests enzims consisteix en un domini amino-terminal citoplasmàtic, un domini transmembrana seguit d'un domini catalític extracel·lular glicosilat, on hi ha cinc dominis proteics de seqüència molt conservada, anomenats regions conservades de l'apirasa (ACR), un segon domini transmembrana i finalment un domini carboxi-terminal citoplasmàtic. Aquesta estructura és molt semblant a la de la

família de purinoceptors P2X (revisat per Goding, 2000). Les regions ACR serien clau per a l'activitat catalítica de l'enzim, però no influirien en la preferència dels substrats a hidrolitzar. El segon grup inclou les NTPDases 5 i 6, les quals no presenten ni el segon domini transmembrana ni el domini carboxi-terminal hidrofòbic. A més, el domini amino-terminal hidrofòbic pot ser alliberat, resultant una forma soluble i secretada de l'enzim (revisat per Zimmermann, Zebisch i Sträter, 2012).

Les NTPDases 1, 2, 3 i 8 són proteïnes força glicosilades amb una massa molecular aproximada de 70-80 KDa.

5.1.3 LOCALITZACIÓ CEL·LULAR DE LES E-NTPDases

Les NTPDases 1, 2, 3 i 8 de mamífers, com el ratolí, la rata o els humans, es localitzen a la superfície cel·lular, mentre que, les NTPDases 4, 5, 6, i 7 es troben a l'interior de la cèl·lula. Les NTPDases 4 i 7 es localitzen, especialment al lumen d'òrgans cel·lulars com l'aparell de Golgi, el reticle endoplasmàtic, els lisosomes i les vacuoles autofàgiques. A més existeixen formes solubles, com en el cas de les NTPDases 5 i 6 (revisat per Robson, Sévigny i Zimmermann, 2006).

5.1.4 DISTRIBUCIÓ CEL·LULAR I TISSULAR DE LES E-NTPDases

Les E-NTPDases es troben àmpliament distribuïdes en molts tipus de cèl·lules i de teixits, on presenten una expressió diferencial, i sovint, comparteixen localització. No només s'expressen a mamífers, sinó que també es troben en plantes, cucs i protozous.

CD39 és la principal E-NTPDasa de la vasculatura, expressant-se tant a les cèl·lules endotelials com al múscul llis. També és expressada per neutròfils, monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules epitelials i per la microglia. Es troba expressada en òrgans com el fetge, el pàncrees exocrí i el ronyó, concretament al conducte col·lector de la medul·la i a l'extremitat ascendent de la nansa de Hendle (Shirley, Vekaria i Sévigny, 2009), així com en òrgans reproductors com els testicles i l'epidídim i en cèl·lules de la granulosa ovàrica (Martín-Satué et al., 2009). En general la seva expressió ve modulada per citocines inflamatòries, l'estrès oxidatiu i la hipòxia. Incrementa en processos de diferenciació i progressió tumoral (revisat per Robson, Sévigny i Zimmermann, 2006).

L'NTPDasa2, es troba especialment associada a la adventícia dels vasos sanguinis, al teixit connectiu, als perícits microvasculars d'alguns teixits, a diferents tipus de cèl·lules glials del sistema nerviós central i perifèric, al fetge, i al cor (revisat per Robson, Sévigny i Zimmermann, 2006).

L'NTPDasa3 es va identificar inicialment a neurones del cervell. També s'expressa a cèl·lules epitelials tant de revestiment com glandulars. Així es localitza a l'aparell digestiu, tant als acins secretors com als conductes excretors de les glàndules salivals, a l'esòfag, i a l'estómac (Lavoie et al., 2011). També

s'expressa a les nefrones del ronyó (Shirley, Vekaria i Sévigny, 2009) i als sistemes reproductors femení (als oviductes) i masculí (als epidídimis i glàndules annexes). Recentment, s'ha identificat a les cèl·lules β pancreàtiques dels illots de Langerhans (Syed et al., 2013).

L'NTPDasa8 ha estat l'última E-NTPDasa en ser clonada, i s'expressa predominantment al fetge, als hepatòcits, en associació amb els canalicles biliars (Fausther et al., 2007)

5.1.5 FUNCIONS FISIOLÒGIQUES I FISIOPATOLÒGIQUES DE LES E-NTPDases

Les E-NTPDases participen en múltiples processos biològics, tant de curta durada, com l'agregació plaquetària i la transmissió sinàptica, com de llarga durada, com la proliferació cel·lular, la diferenciació, la motilitat, la mort cel·lular, la regeneració tissular i el càncer (Robson, Sévigny i Zimmermann, 2006).

CD39 participa en el control de l'homeòstasi, regulant el flux sanguini (també durant la inflamació vascular), en les reaccions trombòtiques, promovent l'activació endotelial i inhibint l'agregació plaquetària (Robson et al., 2005), en la regeneració de teixits i òrgans, organitzant el reclutament de cèl·lules mare hematopoètiques (Schmelzle et al., 2013), i resulta essencial en processos com l'angiogènesi i la vasculogènesi (Goepfert et al., 2001). Regula les respostes inflamàtores, fomentant el reclutament, l'activació i la polarització dels limfòcits T naïve, essent per tant, un enzim clau en el transplantament d'òrgans i de cèl·lules (Dwyer et al., 2007). A més, CD39 es troba sobreexpressada en diversos tipus de càncer, com per exemple el càncer colorectal, el càncer pancreàtic, i el càncer de cap i coll. En aquesta tesi hem estudiat la seva expressió al càncer d'endometri, on hem demostrat que també hi ha una elevada expressió d'aquest enzim (veure **capítol 3**).

L'NTPDasa2 actua com a factor trombo regulador, promovent l'agregació plaquetària, i com a factor homeostàtic. S'expressa en zones del cervell adult on persisteix la neurogènesi, com per exemple les zones subventriculars dels ventricles laterals on s'associa amb cèl·lules mare (del tipus B) i al gir dentat de l'hipocamp on s'associa amb cèl·lules neuronals progenitores, suggerint un possible paper d'aquest enzim en el control de la neurogènesi del cervell adult (Braun et al., 2003). L'NTPDasa2 es troba sobreexpressada en alguns tumors del sistema nerviós central, com els gliomes (Braganhol et al., 2012).

L'NTPDasa3 està implicada en la neurotransmissió (Kiss et al., 2009), en la secreció i la neurotransmissió entèrica (Lavoie et al., 2011) i modula la secreció d'insulina (Syed et al., 2013). La seva expressió està augmentada en el càncer de bufeta (Rockenbach et al., 2014).

L'NTPDasa8 participa en funcions biològiques del fetge com per exemple el control de la composició i secreció del flux biliar (Fausther et al., 2007).

5.2 FAMÍLIA DE LES ECTO-NUCLEÒTID PIROFOSFATASES/FOSFODIESTERASES (E-NPPs)

5.2.1 ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LES E-NPPs

La família de les E-NPPs consta de set membres (NPP 1-7) numerats per ordre de descobriment. Hidrolitzen específicament una gran varietat de substrats, així doncs, són capaços d'hidrolitzar enllaços pirofosfat i fosfodièster presents a nucleòtids, àcids nucleics, sucres, èsters de fosfats i lisofosfolípids. Només els tres primers membres, NPP1 (anteriorment anomenada PC-1), NPP2 i NPP3, són capaços d'hidrolitzar nucleòtids i, per tant, tenen rellevància en el context de la senyalització purinèrgica. Les NPPs 6 i 7 hidrolitzen només enllaços fosfodièster i lisofosfolípids. Els substrats de les NPPs 4 i 5 romanen desconeguts. L'àmplia varietat de substrats hidrolitzables per les E-NPPs suggereix múltiples implicacions en processos fisiològics (revisat per Yegutkin, 2008).

5.2.2 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LES E-NPPs

Les NPP 1 i 3 són glicoproteïnes transmembrana de tipus II formades per un domini amino-terminal intracel·lular curt, un únic domini transmembrana, i un domini extracel·lular llarg que conté el centre catalític (*nuclease-like*) de l'enzim. Per contra, les NPPs 4 i 7 són proteïnes transmembrana de tipus I amb un domini carboxi-terminal intracel·lular, un domini extracel·lular significativament petit comparat amb el dels altres membres, i una estructura oligomèrica encara desconeguda. L'NPP2 se sintetitza com a pre-pro-enzim i només existeix com a proteïna secretada. S'han identificat, també, formes solubles de les NPPs 1, 3, 6 i 7 però es desconeixen els mecanismes pels quals es formen (revisat per Stefan, Jansen i Bollen, 2005).

5.2.3 LOCALITZACIÓ CEL·LULAR DE LES E-NPPs

Els membres d'aquesta família han estat localitzats en diferents compartiments cel·lulars, però especialment, es localitzen a la membrana plasmàtica de cèl·lules polaritzades (revisat per Goding, Grobber i Slegers, 2003).

5.2.4 DISTRIBUCIÓ CEL·LULAR I TISSULAR DE LES E-NPPs

Les NPPs 1, 2 i 3, per separat o combinades, s'expressen en molts tipus cel·lulars on realitzen múltiples funcions aparentment no relacionades.

Les NPPs 1, 2 i 3 s'expressen principalment als epitelis de: vies respiratòries, fetge, intestí i cervell. Així doncs, trobem l'NPP1 associada a la membrana basolateral dels hepatòcits, i a la membrana

apical de l'epiteli respiratori. També s'expressa a limfòcits B i T, així com en diferents òrgans i teixits: cor, placenta, testicles, os, cartílag, i endotelis. Curiosament, l'NPP1 no es localitza al cervell però s'expressa abundantment en tumors cerebrals astrocítics. L'NPP3 s'expressa a la membrana apical dels hepatòcits, colangiòcits, enteròcits, cèl·lules epitelials del plexe coroïdal i cèl·lules neurals progenitores. També s'expressa a òrgans com l'úter i la pròstata. L'NPP2 és secretada per oligodendròcits i per diferents cèl·lules tumorals promovent el creixement tumoral, l'angiogènesi i la metastasi. Està present en fluids corporals com el plasma i el fluid cerebrospinal. També s'ha detectat la seva expressió a l'ovari, la placenta, l'intestí prim, el cartílag, l'os i als epitelis (revisat per Goding, 2000; revisat per Goding, Grobben i Slegers, 2003; revisat per Stefan, Jansen i Bollen, 2006; revisat per Chernogorova i Zeiser, 2012).

5.2.5 FUNCIONS FISIOLÒGIQUES I FISIOPATOLÒGIQUES DE LES E-NPPs

Les E-NPPs, a part de modular la senyalització purinèrgica participant en el reciclatge de nucleòtids i regulant els nivells extracel·lulars de pirofosfat inorgànic (PPi), intervenen en d'altres funcions fisiològiques com l'estimulació de la motilitat cel·lular, la senyalització a través de receptors d'insulina, la formació i secreció de la bilis, i les reaccions al·lèrgiques. L'expressió defectuosa d'aquests enzims afecta la mineralització de l'os, la motilitat i la migració cel·lular, afavoreix l'angiogènesi i la invasió de cèl·lules tumorals, i es relaciona amb patologies com la diabetis de tipus 2 (revisat per Goding, Grobben i Slegers, 2003).

5.3 FAMÍLIA DE LES FOSFATASES ALCALINES

5.3.1 ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE LES FOSFATASES ALCALINES

Les fosfatases alcalines són metaloenzims ubicus que pertanyen a una família de proteïnes ecto-fosfomonoesterases no específiques. Presenten seqüències homòlogues amb una gran quantitat d'enzims, i degraden específicament una àmplia varietat de substrats. Així doncs, no només hidrolitzen nucleòsids 5'-tri-, -di-, i -monofosfats, sinó que també alliberen fosfat inorgànic (Pi) d'una gran varietat de compostos orgànics incloent proteïnes i àcids grassos. A més, són capaces d'hidrolitzar PPi. Així, un únic enzim d'aquesta família podria catalitzar tota la cadena d'hidròlisi de l'ATP produint els respectius nucleòsids (Zimmermann, 2001).

5.3.2 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LES FOSFATASES ALCALINES

Llevat d'alguna excepció, les fosfatases alcalines són enzims homodimèrics i els seus centres catalítics contenen tres ions metàl·lics, dos zincs (Zn^{2+}) i un Mg^{2+} , necessaris per a l'activitat enzimàtica, essent òptima a pH alcalí (de 8 a 11).

5.3.3 LOCALITZACIÓ CEL·LULAR DE LES FOSFATASES ALCALINES

Les fosfatases alcalines es troben presents a la natura des de bacteris fins a mamífers. Les de mamífers són ecto-enzims ancorats a la membrana plasmàtica via glicosil fosfatidil inositol (GPI) (revisat per Millán, 2006), tot i que s'han detectat formes solubles d'aquests enzims en el sèrum, indicant que podrien ser secretats (revisat per Yegutkin, 2008).

5.3.4 DISTRIBUCIÓ CEL·LULAR I TISSULAR DE LES FOSFATASES ALCALINES

En els adults, les fosfatases alcalines es troben presents en molts teixits, i per exemple a l'intestí prim, el ronyó, l'os, la placenta i les cèl·lules germinals són molt abundants. A l'embrió, tots els teixits en estadis primerencs del desenvolupament són rics en fosfatases alcalines.

Existeixen diferents isoenzims de les fosfatases alcalines. Aquestes es poden classificar, en funció del teixit on es troben expressades, en dos grups: les fosfatases alcalines no específiques de teixit (TNAP: de l'anglès *tissue non specific alkaline phosphatase*), expressades abundantment a l'os, al fetge, al ronyó i al sistema nerviós en desenvolupament, i les fosfatases alcalines específiques de teixit que inclouen la fosfatasa alcalina placentària (PLAP: de l'anglès *placental alkaline phosphatase*), la intestinal (IAP: de l'anglès *intestinal alkaline phosphatase*) i la germinal (GCAP: de l'anglès *germ cell alkaline phosphatase*) (revisat per Al-Rashida i Iqbal, 2013).

5.3.5 FUNCIONS FISIOLÒGIQUES I FISIOPATOLÒGIQUES DE LES FOSFATASES ALCALINES

La TNAP intervé, principalment, en la mineralització de l'os generant el Pi necessari per a la cristal·lització de la hidroxiapatita (Millán, 2006; revisat per Yegutkin, 2008). Alteracions en l'activitat d'aquest enzim causen hipofosfatàsia i osteomalàcia. La PLAP regula el transport de immunoglobulina G a través de la placenta, i també, el creixement i remodelació dels teixits fetals. La IAP està involucrada en l'absorció i detoxificació intestinal de lípids i en la regulació del pH a la superfície intestinal (revisat per Lallès, 2014). Estudis realitzats amb ratolins deficientes en IAP demostren que la manca d'aquest enzim comporta obesitat, hiperlipidèmia i esteatosi hepàtica (revisat per Buchet, Millán i Magne, 2013). La GCAP s'expressa als testicles i està sobreexpressada al càncer testicular.

5.4 FAMÍLIA DE LES 5'-NUCLEOTIDASES

L'únic membre d'aquesta família expressat a la membrana plasmàtica capaç de desfosforilar l'AMP extracel·lular fins adenosina, i per tant, amb rellevància dins el context de la senyalització purinèrgica és CD73. Algunes de les característiques més importants d'aquest enzim es descriuen a continuació.

5.4.1 ACTIVITAT ENZIMÀTICA DE CD73

L'enzim CD73 catalitza l'últim pas de la cadena de degradació dels nucleòtids extracel·lulars: hidrolitza l'AMP generant adenosina i Pi. Per tant, és l'enzim responsable de a) la darrera etapa de la formació d'adenosina extracel·lular, a partir dels nucleòtids d'adenina alliberats al compartiment extracel·lular, b) la posterior activació dels receptors de tipus P1 d'adenosina, i c) la terminació de la senyalització produïda pel nucleòtids extracel·lulars en unir-se als receptors de tipus P2 (revisat per Zimmermann, 2000; Sträter, 2006).

5.4.2 ESTRUCTURA MOLECULAR DE CD73

Nombrosos estudis coincideixen en l'existència de fins a 3 tipus diferents de CD73: l'enzim ancorat a la membrana, l'enzim soluble derivat de l'enzim ancorat a la membrana, i l'enzim citosòlic, que estructuralment, difereix de l'enzim de membrana (revisat per Al-Rashida i Iqbal, 2013).

L'estructura molecular de l'enzim de membrana està formada per dues subunitats glicoproteiques unides per enllaços no covalents i amb ions metàl·lics al domini amino-terminal. Es troba ancorat a la membrana extracel·lular, via GPI i pot ser tallat per fosfolipases endògenes alliberant, així, l'enzim al compartiment extracel·lular i generant-ne la forma soluble (Sträter, 2006).

5.4.3 LOCALITZACIÓ CEL·LULAR DE CD73

L'enzim CD73 es troba ancorat a la membrana extracel·lular d'hepatòcits, fibroblasts, cèl·lules epitelials (incloses les endotelials), limfòcits i cèl·lules glials entre d'altres. S'ha localitzat també al compartiment intracel·lular d'hepatòcits, adipòcits, i limfòcits en associació amb l'aparell de Golgi i els lisosomes (revisat per Al-Rashida i Iqbal, 2013). La seva localització a la membrana està associada als *lipid rafts* (revisat per Allard, Turcotte i Stagg, 2012).

5.4.4 DISTRIBUCIÓ CEL·LULAR I TISSULAR DE CD73

CD73 s'expressa de manera ubíqua. Així doncs, CD73 es localitza i s'expressa en diversos òrgans com el colon, el fetge, els ronyons, el cervell, els pulmons i el cor, i en teixits com l'endoteli vascular, el múscul llis i les mucoses (revisat per Colgan et al., 2006). El treball presentat en aquesta tesi demostra que l'enzim també s'expressa als òrgans reproductors masculins com els testicles, la vesícula seminal i la pròstata, i als femenins com els ovaris, els oviductes i l'úter (veure **capítol 1** i **annex 1**). A més, s'expressa a cèl·lules epitelials i mioepitelials de glàndules mamàries, així com als fibròcits de l'estroma glandular mamari (Krüger et al., 1991).

5.4.5 FUNCIONS FISIOLÒGIQUES I FISIOPATOLÒGIQUES DE CD73

Si bé la principal funció de l'enzim CD73 és hidrolitzar l'AMP fins adenosina, també se li atribueixen funcions no enzimàtiques com l'activació de limfòcits T, la transducció de senyals a través de la membrana plasmàtica i la participació en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular (Sträter, 2006; revisat per Yegutkin, 2008). A més, els efectes antiinflamatoris, immunosupressors, vasodilatadors i antidiürètics produïts per l'adenosina extracel·lular, són també atribuïbles a CD73, en ser l'enzim encarregat de regular la seva concentració extracel·lular. Aquest enzim, també, promou el creixement tumoral i l'angiogènesi i està involucrat amb la resistència als fàrmacs (revisat per Al-Rashida i Iqbal, 2013). L'expressió de CD73 està incrementada en molts tipus de càncer, com per exemple el càncer de mama (Wang et al., 2008), el càncer colorectal (Wu et al., 2012) i el càncer de pròstata (Yang, Du i Zu, 2013). A la present tesi demostrem que també es troba present al càncer d'endometri (veure **capítol 3**).

A la present tesi doctoral, hem estudiat minuciosament l'expressió i l'activitat de les ectonucleotidases a l'aparell reproductor femení en condicions normals i patològiques.

6. SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA AL SISTEMA REPRODUCTOR

Recentment ha estat àmpliament revisada la senyalització purinèrgica en els sistemes reproductors masculí i femení (revisat per Burnstock, 2014). Està ben demostrat que la senyalització purinèrgica intervé en la regulació fisiològica dels òrgans reproductors masculins i femenins, i que influeix en diversos aspectes de la biologia de la reproducció. D'un banda, l'ATP extracel·lular a través de receptors de tipus P2X₁, provoca la contracció dels conductes deferents, la vesícula seminal, la pròstata i l'úter, i per tant, participa en totes aquelles funcions que requereixen contracció muscular com per exemple l'erecció del penis, l'ejaculació, el transport de l'òvul pels oviductes, el part i la lactància. També intervé en la síntesi i secreció tant exocrina (producció de moc), com endocrina (secreció d'hormones) i en l'espermatogènesi. D'altra banda, l'adenosina extracel·lular, controla les contraccions del miometri (Gillman i Pennefather, 1998), regula els fenòmens post-implantacionals (Blackburn et al., 1992) i el metabolisme fetal (Sawa, Asakura i Power, 1991) durant l'embaràs, i participa en la capacitació dels espermatozoides, necessària per a la fecundació de l'òocit, al seu pas a través de les vies genitals femenines (Minelli et al., 2004; Schuh, Hille i Babcock, 2007; Fraser, 2008; Minelli et al., 2008). A més, s'ha descrit l'expressió dels receptors d'adenosina en espermatozoides de mamífers (Minelli et al., 2000), on l'expressió d'aquests varia en funció del seu estat de capacitació (Adeoya-Osiguwa i Fraser, 2002). Els receptors d'adenosina, però, no han estat encara estudiats en els òrgans reproductors femenins.

En els darrers anys, l'expressió dels receptors de l'ATP de tipus P2X ha estat identificada a l'aparell reproductor masculí (Lee, Bardini i Burnstock, 2000) i femení murí (Arase et al., 2009) amb canvis marcats al llarg del cicle (Bardini, Lee i Burnstock, 2000) i durant l'implantació (Slater, Murphy i Barden, 2002) i l'embaràs (Miyoshi et al., 2010). Així, per exemple, P2X₇ s'expressa de manera diferencial a l'epiteli germinal de l'ovari durant el cicle estral (Vázquez-Cuevas et al., 2013). L'expressió i l'activitat enzimàtica de CD73 ha estat descrita a l'aparell reproductor masculí humà (Konrad et al., 1998).

Les aportacions del nostre grup demostren expressió de les NTPDases 1, 2 i 3 a l'aparell reproductor murí (Martín-Satué et al., 2009) i de CD73 als òrgans reproductors masculins (Martín-Satué et al., 2010; veure **annex 1**). Aquest últim treball descriu, a més, la coexpressió de dues ecto-nucleotidases, NTPDasa3 i CD73, a les cèl·lules principals de l'epidídim, evidenciant la implicació d'aquests dos enzims en el control de la composició del fluid espermàtic, i per tant, en la fertilitat masculina. El paper de les ecto-nucleotidases en el context de la fertilitat femenina i en patologies relacionades amb el sistema reproductor, no havia estat encara estudiada.

Durant aquesta tesi doctoral, s'ha estudiat l'expressió de les ecto-nucleotidases a l'aparell reproductor femení murí (veure **capítol 1**), a l'endometri funcional i atròfic humà (veure **capítol 2**), i al càncer d'endometri (veure **capítol 3**).

6.1 SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA ALS ÒRGANS REPRODUCTORS MASCULINS

La senyalització purinèrgica intervé en la fisiologia i en la fisiopatologia dels següents òrgans reproductors masculins: penis, testicles, conductes deferents, vesícules seminals, epidídim, pròstata i també als espermatozoides. A continuació, descriurem el paper de la senyalització purinèrgica en algunes de les funcions reproductives més importants i en determinades patologies de l'aparell reproductor.

L'ATP i l'adenosina, intervenen en l'erecció del penis. L'ATP a través dels receptors P2Y₄ presents en el múscul llis dels cossos cavernosos del penis, provoca la relaxació dels músculs cavernosos, permetent així l'entrada de sang i, per tant, l'erecció del penis (Tong et al., 1992; Wu et al., 1993; Levin, Hypolite i Broderick, 1995). La disminució de l'activació d'aquests receptors comporta la contracció dels músculs, frenant l'entrada de sang i per tant, l'erecció reverteix. Un estudi més recent demostra que l'activació dels receptors A₁ d'adenosina durant l'erecció del penis, redueix l'alliberació de noradrenalina i provoca la relaxació dels músculs cavernosos, facilitant així l'erecció (Ning et al., 2012). Per tant, alteracions en la senyalització produïda per l'ATP i l'adenosina extracel·lulars estarien relacionades amb la disfunció erèctil. Per exemple, als ratolins deficients en ADA, l'excés d'adenosina

en el teixit erèctil del penis els hi causa priapisme, és a dir, l'erecció continuada del penis almenys durant quatre hores en absència d'excitació sexual (Mi et al., 2008). Els ratolins deficients en CD73, tenen disminuïda la funció erèctil degut a la reducció de la producció endògena d'adenosina (Wen et al., 2011). Els homes amb disfunció erèctil vasculogènica tenen disminuïda l'activitat ecto-nucleotidàsica de CD39 en els cossos cavernosos, on l'acumulació d'ATP extracel·lular comporta la dessensibilització dels receptors de tipus P2 dificultant, així, l'erecció del penis (Faria et al., 2008). Recentment, s'ha proposat l'ús de l'ATP, en combinació amb altres substàncies amb efectes relaxants com l'òxid nítric, en el tractament de la disfunció erèctil (Hupertan et al., 2012). A més, les vies de senyalització activades per l'adenosina en el penis, estan sent estudiades per avaluar-ne la seva utilitat com a possibles dianes terapèutiques en el tractament d'aquesta patologia (revisat per Wen i Xia, 2012).

La senyalització purinèrgica està involucrada, també, en d'altres funcions reproductives que requereixen contracció com l'ejaculació. Així doncs, l'ATP estimula la contracció dels conductes deferents durant l'ejaculació, facilitant així, el transport de l'esperma des dels testicles fins al penis (Sneddon i Westfall, 1984). Un estudi més recent, descriu els components purinèrgics que intervenen en la contracció dels conductes deferents en humans, i proposa el receptor P2X₁ com a principal receptor implicat en aquest procés (Banks et al., 2006). A la rata, en canvi, la contracció i la relaxació del múscul llis dels conductes deferents es produeix per l'activació dels receptors P2Y₂ i P2Y₁ respectivament (Bültmann, Klebroff i Starke, 1999). El receptor P2X₂, expressat a les cèl·lules intersticials de Cajal dels conductes deferents, podria participar també en l'expulsió del semen (Burton et al., 2000). L'activitat de les ecto-nucleotidases, incloent les NTPDases i CD73, ha estat demostrada al múscul llis dels conductes deferents, on regulen els nivells d'ATP i d'adenosina extracel·lulars necessaris per a l'activació dels receptors purinèrgics (Kwan i Ramlal, 1985; Mihaylova-Todorova, Todorov i Westfall, 2002).

Altres funcions reproductives, com l'espermatogènesi o la capacitació dels espermatozoides, estan regulades per la senyalització purinèrgica. Els receptors de l'ATP de tipus P2X i els receptors d'adenosina s'expressen de manera diferencial tant a les cèl·lules de Sertoli com a les cèl·lules germinals durant l'espermatogènesi. Així doncs, P2X₇ s'expressa a les cèl·lules de Sertoli durant tot el procés de maduració dels espermatozoides, en canvi, P2X₂ i P2X₃ només s'expressen en alguns estadis de l'espermatogènesi (Glass et al., 2001). Un altre estudi demostra que, l'expressió dels receptors de tipus P2X a les cèl·lules germinals disminueix, progressivament, a mesura que aquestes avancen per l'epidídim i desapareix a les cèl·lules madures del final de l'epidídim (Banks, Calvert i Burnstock, 2010). També la concentració d'ATP a l'interior dels espermatozoides disminueix a mesura que aquests avancen per l'epidídim (Fourie et al., 1991). Els receptors d'adenosina A₁ i A₃,

però no els A_2A i A_2B , s'expressen a les cèl·lules germinals mentre que les cèl·lules de Sertoli només expressen el receptor A_1 d'adenosina (Rivkees, 1994; Loir, 2001). Queda demostrada la implicació de la senyalització purinèrgica en el procés de maduració de les cèl·lules germinals, així com, en la mort per apoptosi que de manera natural ocorre en aquestes cèl·lules (Shariatmadari et al., 2003; Gelain, Souza i Bernard, 2003).

L'ATP és necessari pel moviment dels espermatozoides i, a través de receptors de tipus P2, inicia la reacció acrosòmica, augmentant així la capacitat fertilitzant de l'esperma (Foresta, Rossato i Di Virgilio, 1992; Foresta et al., 1996; Luria et al., 2002). La producció defectuosa d'ATP comporta una reducció en la mobilitat d'aquestes cèl·lules (Liu, Jennings i Baker, 1987). Els ratolins *knockout* pel receptor $P2X_1$, tenen reduïda la fertilitat, d'una banda, presenten poca quantitat d'espermatozoides a l'ejaculat, i de l'altre, la contracció dels vasos deferents es veu disminuïda (Mulryan et al., 2000). L'increment del batec flagel·lar que es produeix durant la hiperactivació dels espermatozoides es relaciona amb una caiguda en els nivells intracel·lulars d'ATP (Jeulin i Soufir, 1992). L'ús d'ATP exogen en el tractament dels espermatozoides durant la fertilització *in vitro* està sent investigat (Rossato et al., 1999). Estudis recents, demostren que aquest tractament millora la motilitat, i per tant, la fertilitat *in vitro* dels espermatozoides humans (Edwards et al., 2007) i de ratolins (Vasudevan i Sztejn, 2011).

L'adenosina, a través dels receptors A_2 , estimula la motilitat de l'esperma (Fénichel et al., 1996). També afavoreix la capacitació dels espermatozoides, procés necessari per penetrar i fecundar l'òocit (Slater, Barden i Murphy, 2000a). El receptor A_1 ha estat implicat en la capacitació i la reacció acrosòmica dels espermatozoides humans (Allegrucci et al., 2000). Les NTPDases i CD73 també han estat identificades als espermatozoides humans, on participen en el control dels nivells extracel·lulars d'ATP i d'adenosina (Romac et al., 2008).

Altres estudis, demostren que l'ATP i l'adenosina extracel·lulars controlen la composició aniònica i la secreció del fluid seminal (Auzanneau et al., 2006) i epididimal (Wong, 1988). Recentment, s'ha suggerit que alteracions en les vies de senyalització activades per l'ATP a l'epidídim podrien causar infertilitat (Ruan et al., 2012)

La senyalització purinèrgica està relacionada, també, amb d'altres patologies de l'aparell reproductor, com el càncer de pròstata. Les cèl·lules epitelials de la pròstata expressen els subtipus de receptors $P2X_1$, $P2X_2$ i $P2X_7$ (Slater, Danieletto i Barden, 2005). L'expressió d'aquests varia, essent baixa en homes sans, i elevada en el càncer de pròstata. En el cas de la pròstata de rata, l'expressió varia en funció de l'edat (Slater, Barden i Murphy, 2000b). Estudis realitzats amb cèl·lules tumorals de la pròstata, demostren que l'expressió dels receptors de tipus P1 es troba també augmentada

(Chen et al., 2004; Shabbir et al., 2008). L'ús de fàrmacs purinèrgics ha estat avaluat en el tractament de la hiperplàsia prostàtica benigne (revisat per Andersson, Chapple i Höfner, 2002).

6.2 SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA ALS ÒRGANS REPRODUCTORS FEMENINS

La senyalització purinèrgica participa, també, en fenòmens fisiològics i fisiopatològics que tenen lloc a tots els òrgans reproductors femenins estudiats i també a la placenta i el cordó umbilical.

L'ATP es troba present en els fol·licles ovàrics i regula el seu procés de maduració (Park et al., 2003; Tai et al., 2005). Un estudi realitzat amb ovaris humans, suggereixen una possible relació entre l'alt contingut d'adenosina en el fluid fol·licular i la maduració fol·licular dels oòcits (Wen et al., 2010). Els oòcits de *Xenopus* alliberen ATP en condicions basals i en resposta a estímuls mecànics o a canvis osmòtics (Bodas et al., 2000; Aleu et al., 2003). Aquests, expressen ecto-nucleotidases de membrana, que converteixen l'ATP en adenosina que, al seu torn, activa els receptors A_{2B} (Matsuoka et al., 2002). Les cèl·lules fol·liculars de *Xenopus* expressen receptors de l'ATP de tipus P2 (Montiel-Herrera et al., 2011) i de tipus P1, que intervenen en les respostes activades per corrents de potassi (K^+) i participen en l'activació dels corrents de clor (Cl^-) (Saldaña et al., 2005). Aquests resultats suggereixen un possible paper de l'ATP intrafol·licular en la maduració dels oòcits.

La menopausa està associada a la disminució de les funcions ovàriques. En un model de ratolí femella menopàusica, els nivells del receptor $P2X_2$ de l'ovari augmenten amb l'edat, sembla doncs evident, la relació d'aquest receptor amb la menopausa (Zimon et al., 2006).

L'ATP intervé en la contracció dels oviductes i incrementa la freqüència de batec dels cilis, facilitant, així, el transport de les gàmetes i de l'embrió fins a l'úter (Barrera, Morales i Villalón, 2004). Participa, també, en la contracció de l'úter durant el part (Hutchings et al., 2009). Els subtipus de receptors $P2X_1$ i $P2X_2$ s'expressen al múscul llis de l'úter de rata (Bardini, Lee i Burnstoch, 2000) i humà (Ziganshin, Zaitsev i Shamsutdinov, 2002), suggerint una possible implicació d'aquests en la regulació de les contraccions uterines durant el part. En cèl·lules aïllades de miometri de rata embarassada, l'ATP indueix corrents iònics i contraccions a través del receptor $P2X_7$ (Miyoshi et al., 2012). A més, $P2X_7$ ha estat bloquejat amb Mg^{2+} , suggerint l'ús d'aquest receptor com a diana en el tractament o prevenció de les contraccions uterines en el part preterme (Urabe et al., 2009). Recentment, l'ecto-nucleotidasa CD39, ha estat localitzada al miometri de ratolins femella (Martín-Satué et al., 2009) i de rata (Milosevic et al., 2012), tant a la membrana de les cèl·lules del múscul llis com a l'endoteli dels vasos sanguinis. Un altre estudi mostra canvis en l'activitat de CD39 durant l'embaràs (Valenzuela et al., 1992). Al final de l'embaràs, es produeix un increment en els nivells de CD73

placentaris, fet que podria estar relacionat amb un augment en la síntesi d'estrògens, que facilitaria les contraccions uterines durant el part (Burns, 1987).

En humans, els receptors P2Y regulen el transport de sodi (Na^+) en les cèl·lules epitelials mamàries (Lee et al., 2007), mentre que l'ATP i l'UTP estimulen l'absorció de Na^+ i la secreció de K^+ en els conductes de les glàndules mamàries. Aquest fet causa un augment en la concentració intracel·lular del Ca^{2+} , que al seu torn, activa canals de K^+ dependents de Ca^{2+} (Palmer et al., 2011) regulant, així, les concentracions de Na^+ i K^+ de la llet.

L'ATP estimula la secreció d'ions i controla la composició del fluid dins dels oviductes (Keating i Quinlan, 2008) influenciant, així, la fertilitat i el desenvolupament embrionari en els primers estadis. Aquests efectes estan regulats per l'adenosina (Barrera, Morales i Villalón, 2007).

La senyalització purinèrgica controla, també, la secreció del moc cervical (Gorodeski, 2002a; Gorodeski, 2002b). Així doncs, en cultius primaris de cèl·lules epitelials humanes d'endocèrvix i d'ectocèrvix ha estat detectada l'expressió de receptors de tipus P2X, involucrats en el transport d'ions (Gorodeski, 2008).

L'adenosina, participa en la regulació del metabolisme del fetus (Sawa, Asakura i Power, 1991) i del flux sanguini fetal (Huidobro-Toro et al., 2002). Així doncs, la ingesta crònica de cafeïna i teofil·lina durant l'embaràs, inhibeix la funció dels receptors A_1 d'adenosina, tant en el cervell matern com en el del fetus (León et al., 2005). En dones embarassades, els nivells d'adenosina en plasma estan augmentats degut, en part, a l'adenosina derivada de l'agregació plaquetària, però sobretot a l'augment de l'activitat AMPàsica de CD73 (Yoneyama et al., 2000).

Tècniques immunohistoquímiques situen els subtipus de receptors P2X₅ i P2X₇ a l'epiteli estratificat esquamós de la vagina de rata, on tenen un paper essencial en la constant regeneració cel·lular, fisiològica, d'aquest epitel·li (Bardini, Lee i Burnstock, 2000).

En el càncer de mama, l'expressió dels receptors de tipus P2 es troba augmentada (revisat per Burnstock i Di Virgilio, 2013). En canvi, l'expressió del receptor P2X₇, involucrat en la diferenciació i l'apoptosi, es troba disminuïda en cèl·lules epitelials de l'endocèrvix i l'ectocèrvix, fet que es relaciona amb el desenvolupament de tumors en aquests teixits (Li et al., 2007; Li et al., 2009). L'activació del receptor proapoptòtic P2X₇, seria doncs una possible diana terapèutica per prevenir el creixement tumoral en les lesions epitelials pre-canceroses i canceroses inicials (Fu et al., 2009; revisat per Gorodeski, 2009).

6.2.1 SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA A L'ENDOMETRI

L'ATP, alliberat pels nervis uterins o per les cèl·lules epitelials mitjançant secreció autocrina o paracrina, juga un paper molt important en la regulació de diverses funcions endometrials com la capacitat dels espermatozoides, la implantació de l'òocit després de ser fecundat, la formació i la composició del fluid endometrial, la proliferació i diferenciació cel·lular necessària durant la reorganització dels teixits uterins després del part, la diferenciació de les cèl·lules epitelials de l'endometri i l'apoptosi (revisat per Burnstock, 2014).

P2X₅ i P2X₇ han estat identificats a l'epiteli uterí de rata (Bardini, Lee i Burnstock, 2000). P2X₇, a més, s'expressa a cèl·lules epitelials de l'endometri humà (Li et al., 2007; Gorodeski, 2012). Alguns estudis revelen canvis en el patró d'expressió dels receptors de tipus P2X a l'úter de la rata durant el cicle endometrial i el procés d'implantació de l'embrió (Slater, Barden i Murphy, 2000a) i durant l'embaràs (Khanam i Burnstock, 2007).

En rates, el receptor P2X₇ es localitza als eosinòfils, macròfags i fibroblast de l'endometri durant la fase de l'estre (Koshi et al., 2005). Aquests autors, especulen sobre el possible paper de l'ATP en la preparació i la remodelació uterina que té lloc abans de la implantació de l'embrió, i la presència del receptor P2X₇ a cèl·lules de l'estroma, podria indicar la seva relació amb les respostes immunitàries i inflamatòries. La mort cel·lular i la remodelació endometrial induïda per l'activació del receptor P2X₇ faciliten la fixació i la implantació del blastocist a l'endometri (Levine, Derks i Beaman, 2005). Per tant, el receptor P2X₇ estaria implicat en la remodelació uterina produïda abans i durant la implantació. En canvi, el receptor d'adenosina A_{2B} s'expressa a l'úter de ratolins femella després de la implantació del blastocist (Blackburn et al., 1999).

Nivells baixos del receptor proapoptòtic P2X₇ estan associats amb el desenvolupament de càncers epitelials, com el càncer d'endometri (Li et al., 2007), a més en les lesions pre-canceroses endometrials l'expressió de P2X₇ també es troba disminuïda (Li et al., 2009).

Estudis que formen part d'aquesta tesi doctoral, demostren expressió i activitat de CD73 a les cèl·lules epitelials de la llum de l'úter i a les glàndules endometrials de ratolins femella, essent ambdues màximes a l'estre, fase en que la femella és sexualment més receptiva (veure **capítol 1**). Recentment, hem descrit la distribució de les principals ecto-nucleotidases (CD39, NTPDase3, NPP1, NPP3, PLAP, TNAP, CD26 i CD73) a l'endometri cíclic i post-menopàusic humà (veure **capítol 2**). A més, l'ecto-nucleotidasa NPP3, ha estat identificada com a nou marcador biològic de metaplàsia tubària.

7. SENYALITZACIÓ PURINÈRICA AL CÀNCER

7.1 CONTEXT GENERAL

El càncer és una malaltia crònica i la seva patogènesi està relacionada amb la infecció i la inflamació. En condicions d'estrès metabòlic com la inflamació aguda o crònica i la hipòxia, les cèl·lules alliberen ATP, i altres nucleòtids, a l'espai extracel·lular que són metabolitzats per ecto-nucleotidases de membrana, generant adenosina extracel·lular. Així doncs, a l'interior del tumor s'acumula ATP i adenosina creant un microambient ric en factors immunomoduladors i promotors del creixement (Ohta et al., 2006; Wilhelm et al., 2010). Mentre que l'ATP, actua com a senyal de perill i com a molècula proinflamatòria, l'adenosina promou el creixement tumoral i actua com a molècula immunosupressora (revisat per Spychala, 2000; Ghiringhelli, 2012) inhibint, a través dels receptors A_{2A} , la resposta cel·lular efectora dels limfòcits, la fagocitosi i la presentació d'antígens per part de macròfags i cèl·lules dendrítiques, permetent, així, a les cèl·lules tumorals escapar del sistema immunitari (Blay, White i Hoskin, 1997; revisat per Hoskin, 2008; Eltzschig, 2009; revisat per Bastid et al., 2013). A més, els limfòcits T reguladors expressen CD39 i CD73 a la membrana contribuint, així, a l'augment d'adenosina extracel·lular (Deaglio et al., 2007). Aquesta, és doncs, una de les estratègies més importants que utilitzen les cèl·lules tumorals per escapar del control del sistema immunitari, i per tant, actualment hi ha molt d'interès en investigar aquest nou camp.

La següent figura representa l'acumulació d'adenosina a l'interior del tumor, produïda principalment per la hidròlisi de l'ATP i els seus derivats per part de les ecto-nucleotidases, i els efectes immunosupressors que exerceix (**Figura I6**).

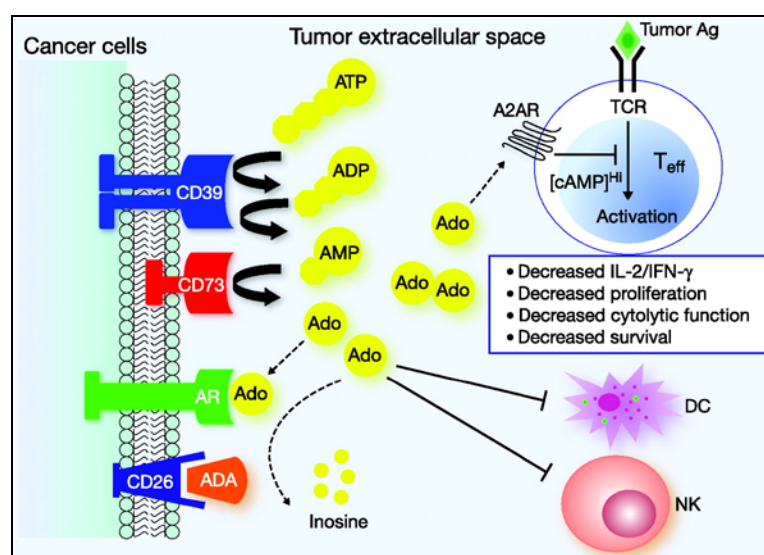


Figura I6. Esquema del metabolisme extracel·lular de l'adenosina en els tumors i els seus efectes immunosupressors (Zhang, 2010)

7.2 PAPER DE L'ATP AL CÀNCER

Al 1983, es va descriure per primera vegada l'activitat antineoplàstica de l'ATP (Rapaport, Fishman i Gercel, 1983), i des d'aleshores, nombrosos estudis han demostrant la seva acció antineoplàstica en diferents tipus de càncer: colorectal, leucèmia, pulmó, pròstata, retinoblastoma, neuroblastoma, glioma i melanoma. Els efectes de l'ATP inclouen la inhibició de la proliferació cel·lular, la promoció de la diferenciació cel·lular (que comporta la inhibició de la proliferació cel·lular) i l'activació de la mort cel·lular (revisat per Burnstock i Di Virgilio, 2013). Recentment, l'ATP ha estat catalogat com a "senyal de perill" per alertar al sistema immunitari, reclutant cèl·lules presentadores d'antigen i promovent la maduració de les cèl·lules dendrítiques en els tumors (Aymeric et al., 2010). A més, a través de l'activació del receptor P2Y₂, promou la migració de macròfags i neutròfils (revisat per Stagg i Smyth, 2010). Malauradament, l'ATP no sempre resulta ser beneficiós per l'hoste.

Si l'acumulació d'ATP extracel·lular és beneficiosa o perjudicial per l'hoste depèn de (a) la seva concentració, (b) la taxa de degradació de l'ATP i (c) dels receptors P2 expressats a les cèl·lules tumorals i a les cèl·lules del sistema immunitari infiltrades, de manera que, el nivells d'ATP resulten ser determinants en la progressió del càncer.

- (a) Les dosis altes d'ATP tenen un gran efecte citotòxic en els tumors i potencien l'activació del sistema immunitari. Així doncs, en alguns tractaments contra el càncer com la quimioteràpia, s'indueix l'alliberació d'ATP per part de les cèl·lules tumorals, activant així la mort cel·lular per apoptosi (Martins et al., 2009). En canvi, les dosis baixes resulten ser immunosupressores i promouen el creixement tumoral a través de l'activació dels receptors de tipus P2 presents a les cèl·lules tumorals (revisat per Burnstock i Di Virgilio, 2013). No obstant, els tumors acumulen quantitats elevades d'ATP extracel·lular al ser la principal font d'adenosina en el tumors (Pellegatti et al., 2008; Aymeric et al., 2010). D'aquí l'interès en la recerca d'estratègies terapèutiques dirigides a reduir-ne la hidròlisi. En aquesta direcció, s'ha proposat el bloqueig farmacològic de CD39, en ser el principal enzim responsable de la hidròlisi de l'ATP i la principal ecto-nucleotidasa expressada en els limfòcits T reguladors (revisat per Bastid et al., 2013).
- (b) La concentració d'ATP extracel·lular depèn del balanç entre la síntesi, l'alliberació i la degradació d'aquest nucleòtid. La degradació es produeix via l'activitat seqüencial de les ecto-nucleotidases. Dos membres d'aquesta família, CD39 i CD73, juguen un paper crucial en la interacció entre les cèl·lules del sistema immunitari i les del tumor. Ambdós enzims s'expressen a la superfície cel·lular i són els principals implicats en la generació d'adenosina extracel·lular, que té un potent efecte immunosupressor (revisat per Di Virgilio, 2012). CD39 i CD73 actuen de manera

coordinada, hidrolitzant ATP i generant adenosina, per reduir la inflamació (revisat per Regateiro, Cobbold i Waldmann, 2013; Xu et al., 2013).

- (c) Per últim, depenent del subtipus de receptor P2 expressat a la membrana de les cèl·lules tumorals, aquestes poden ser més sensibles a la mort o a l'efecte tròfic induït per l'ATP. Diferents subtipus de receptors P2 estan implicats en respostes que inhibeixen el creixement tumoral: P2X₅, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂, i P2Y₁₁ (White i Burnstock, 2006). El receptor P2X₇ és el més acceptat com a mediador de la mort cel·lular a través de mecanismes apoptòtics o necròtics i, a més, regula l'expressió i la secreció de diferents citocines (Orinska, 2011). Aquest receptor, però, sembla no ser funcional en les cèl·lules tumorals (Slater et al., 2004). Aquestes cèl·lules, inclús, són capaces de regular l'expressió del receptor P2X₇ per evitar la mort cel·lular. Així, diversos estudis demostren que els nivells del receptor P2X₇ són significativament més baixos en diferents tipus de càncer en comparació amb el teixit normal adjacent (Li et al., 2006). Inclús els nivells de micro-RNA-186 i de micro-RNA-150 que disminueixen la transcripció del gen P2X₇, són significativament més alts en les cèl·lules tumorals que en les no tumorals (Zhou et al., 2008). L'ús d'antagonistes específics del receptor P2X₇, podria ser útil en el tractament de malalties inflamatòries i autoimmunes (Arulkumaran, Unwin i Tam, 2011), mentre que, els agonistes, podrien ser utilitzats en teràpies contra el càncer (Roger i Pelegrin, 2011; revisat per Mehta et al., 2014).

7.3 PAPER DE L'ADENOSINA AL CÀNCER

L'adenosina, que en condicions no patològiques es troba a l'espai extracel·lular en concentracions baixes (<1 µM), augmenta considerablement els seus nivells en la inflamació i el càncer. Així s'han detectat nivells d'adenosina extracel·lular en tumors sòlids, entre 10 i 20 vegades majors que en el teixit no tumoral (Blay, White i Hoskin, 1997). Aquests elevats nivells d'adenosina extracel·lular no només s'expliquen per la seva alliberació a través de transportadors específics, sinó que també depenen de (a) l'activitat de l'enzim ADA, que converteix l'adenosina en inosina, (b) la captació cel·lular a través de transportadors de nucleòsids concentratius o equilibratius, i (c) de l'activitat de l'ADK, que converteix l'adenosina en AMP. Però, la principal font d'adenosina extracel·lular en els tumors seria la hidròlisi de l'ATP per part de les ecto-nucleotidases. Tal com es detallarà a l'apartat dedicat a les ecto-nucleotidases al càncer, nombrosos estudis demostren la correlació entre l'augment en l'expressió de CD73 i/o la disminució en l'expressió dels enzims ADA i ADK i la progressió del tumor (revisat per Spychala, 2000). Per tant, l'acció conjunta de diversos enzims CD39, CD73, ADA i ADK contribueix a mantenir elevats els nivells d'adenosina extracel·lulars en els tumors.

L'adenosina és secretada per les cèl·lules tumorals i per les cèl·lules del sistema immunitari durant processos tumorals. L'adenosina extracel·lular exerceix diversos efectes immunomoduladors a través dels receptors d'adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , i A_3) expressats a la membrana de macròfags, cèl·lules dendrítiques i diferents subtipus de limfòcits T, que en activar-se alliberen citocines i prostaglandines proinflamàtores al medi contribuint a la patogènesi del càncer (Sitkovsky et al., 2008, revisat per Kumar, 2013). Els principals efectes immunosupressors de l'adenosina queden resumits a la **Figura 17**. Destaquem, entre d'altres, la inhibició de la síntesi de citocines, l'estimulació de la síntesi de IL-10 i la inhibició de l'activació i expansió dels limfòcits T.

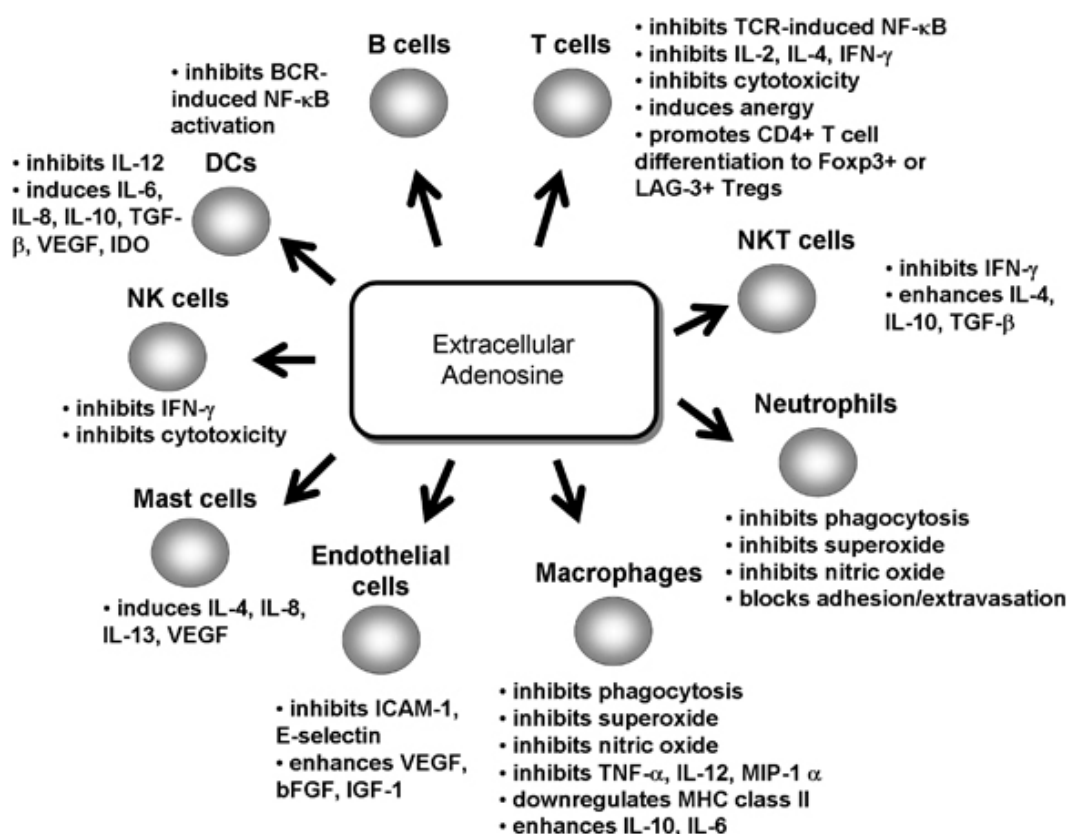


Figura 17. Principals efectes immunomoduladors de l'adenosina extracel·lular (Stagg i Smith, 2010)

Altres efectes de l'adenosina extracel·lular inclouen la protecció de les cèl·lules contra l'apoptosi i la promoció del creixement cel·lular, efectes que podrien relacionar-se directament amb el càncer. Així doncs, l'adenosina a través de receptors A_1 , afavoreix la proliferació cel·lular, inclús en els tumors com, per exemple, en tumors colorectals (Khoo et al., 1996) o de mama (Mirza et al., 2005). Per aquest motiu, s'ha proposat l'ús d'antagonistes del receptor A_1 per obstaculitzar la viabilitat cel·lular dels tumors i incrementar la sensibilitat de les cèl·lules canceroses als fàrmacs quimioterapèutics. En canvi, l'AMP, precursor de l'adenosina, inhibeix la proliferació d'aquestes, tal com ha estat demostrat en el càncer de mama (Mazurek, Michel i Eigenbrodt, 1997). Així doncs, un augment en l'activitat de CD73, enzim que converteix l'AMP en adenosina, promouria el creixement de les cèl·lules tumorals.

Efectivament, CD73 està sobreexpressada en molts tipus de càncer: càncer de mama, càncer de vesícula biliar, leucèmia, glioma, glioblastoma, melanoma, càncer d'ovari, càncer de tiroides, càncer d'esòfag, càncer de colon i de pròstata (revisat per Stagg i Smyth, 2010). Per contra, existeixen evidències que l'adenosina en concentracions mil·limolars podria activar la mort cel·lular per apoptosi, però seria a través de mecanismes intracel·lulars i no a través dels seus receptors de membrana (Merighi et al., 2002).

S'han descrit, en cèl·lules tumorals, efectes antiproliferatius dels receptors A_3 (Fishman et al., 2004), per tant, la seva utilitat farmacològica sembla evident. No obstant, l'ús clínic dels agonistes del receptor A_3 hauria de ser limitada, ja que, podrien disminuir l'efectivitat de la quimioteràpia en alguns tumors amb baixa taxa de proliferació, com és el cas del càncer de colon i de mama. En canvi, els antagonistes del receptor A_3 , anul·larien els efectes antiapoptòtics derivats de l'activació d'aquest receptor, i sensibilitzarien les cèl·lules tumorals als fàrmacs quimioterapèutics (revisat per Merighi et al., 2003).

Els receptors d'adenosina es consideren poderoses dianes terapèutiques, degut en primer lloc, a l'expressió ubiqua d'aquests receptors en una àmplia varietat de cèl·lules, i en segon lloc, a l'existència d'un gran nombre de lligands sintètics (generats modificant l'estructura de l'adenosina i la metilxantina). Els efectes immunosupressors de l'adenosina poden evitar-se mitjançant deleccions genètiques o l'ús d'antagonistes selectius dels receptors A_{2A} i A_{2B} d'adenosina (Ohta et al., 2006; Lukashev, Sitkovsky i Ohta, 2007).

En els tumors, l'adenosina a través dels seus receptors expressats al múscul llis, incrementa el flux sanguini intratumoral, (Natori et al., 1992) i augmenta la vasodilatació per millorar l'accessibilitat als nutrients (revisat per Haskó i Cronstein, 2004). A part, l'adenosina regula l'angiogènesi (Allard et al., 2014), la vasculogènesi (Montesinos et al., 2004) i la limfoangiogènesi (Lenoir et al., 2014). En els tumors, els nivells del receptor A_{2A} d'adenosina estan augmentats i la seva activació a les cèl·lules endotelials promou significativament l'angiogènesi, estimulant tant la proliferació de les cèl·lules endotelials com l'expressió del factor de creixement endotelial per part de les cèl·lules tumorals, i per tant, la supervivència cel·lular del tumor es veu afavorida. Els antagonistes dels receptors A_{2A} d'adenosina podrien exercir efectes antitumorals dificultant el creixement i la propagació tumoral.

7.4 PAPER DE LES ECTO-NUCLEOTIDASES AL CÀNCER

Tal com hem explicat anteriorment, tant les cèl·lules no tumorals com les cèl·lules tumorals i del sistema immunitari, alliberen nucleòtids i nucleòsids a l'espai extracel·lular que actuen com a lligands extracel·lulars de les ecto-nucleotidases expressades a les seves membranes. És temptador pensar

que, alteracions en l'activitat de les ecto-nucleotidases, ja siguin de les cèl·lules tumorals o de les cèl·lules del sistema immunitari infiltrades, podrien ser les responsables de la propagació i de la metàstasi tumoral. A continuació, destaquem alguns dels estudis que donen suport a aquesta teoria (revisat per Bergamin et al., 2012).

A biòpsies humanes de càncer d'ovari s'ha trobat augmentada l'expressió de CD39 i CD73 (Häusler et al., 2011). Recentment, en cèl·lules de càncer d'ovari s'ha demostrat l'eficàcia de la teràpia antitumoral basada en l'ús d'anticossos específics contra CD39 i CD73. Així, en aquestes cèl·lules l'adició dels anticossos anti-A1 i anti-7G2 bloqueja l'activitat dels enzims CD39 i CD73 respectivament, mantenint així, disminuïda la generació d'adenosina i activada la resposta immunitària dels limfòcits T (Häusler et al., 2014). En melanomes, s'ha relacionat la sobreexpressió de CD39 amb el grau de diferenciació de les cèl·lules tumorals, i amb l'evasió del sistema immunitari per part d'aquestes, mentre que la supressió de l'activitat d'aquest enzim comporta la reducció del creixement del melanoma (Dzhandzhugazyan et al., 1998; Jackson et al., 2007). A més, ha estat demostrat que l'ecto-nucleotidasa CD39 vascular promou directament el creixement cel·lular del tumor (Feng et al., 2011), i que l'expressió d'aquest enzim a la membrana de limfòcits T reguladors inhibeix l'activitat antitumoral d'aquests, promovent el creixement tumoral i la metàstasi (Sun et al., 2010).

Altres estudis mostren que CD73 s'expressa en una gran varietat de línies cel·lulars tumorals, i que la seva expressió està incrementada en diferents tumors (Jin et al., 2010). L'increment de CD73 s'associa amb fenotips cancerosos altament invasius, la resistència als fàrmacs i la promoció del creixement tumoral (revisat per Spychala, 2000). CD73 promou la viabilitat cel·lular i la progressió del cicle cel·lular (Zhi et al., 2007) i la seva expressió es relaciona amb l'augment de la migració i la invasió cel·lular en el càncer de mama. Així doncs, l'expressió de CD73 ha estat proposada com a factor pronòstic en aquest tipus de càncer (Wang et al., 2008). La supressió de CD73 amb RNA d'interferència disminueix significativament el creixement cel·lular en el càncer de mama. A més, s'ha demostrat que l'ús d'anticossos monoclonals anti-CD73 retarda el creixement tumoral i inhibeix la metàstasi en el càncer de pulmó (Stagg et al., 2010) i en el càncer de mama (Terp et al., 2013) a través de diferents mecanismes com la inhibició de l'activitat catalítica o l'agrupació i posterior internalització de CD73. Recentment, s'ha proposat inhibir simultàniament diferents vies immunosupressores ja que els tumors utilitzen diversos mecanismes per escapar del control del sistema immunitari. S'ha demostrat que la teràpia antitumoral basada en el bloqueig del receptor *programmed death* (PD)-1 mitjançant anticossos específics millora quan es realitza juntament amb el bloqueig de CD73, suggerint així la combinació d'ambdós anticossos, anti-PD-1 i anti-CD73, com a nova i potent estratègia terapèutica en el tractament del càncer (Allard et al., 2013). Les teràpies

dirigides a inhibir farmacològicament CD73 encara estan en desenvolupament. L'inhibidor selectiu de CD73, anomenat α,β -methylene ADP (α,β -meADP) ha estat provat amb èxit en models cel·lulars (Jin et al., 2010) i animals (revisat per Colgan et al., 2006). L' α,β -meADP actua com a inhibidor de CD73 ja que mimetitza l'estructura de l'ADP però no és hidrolitzable. És un fàrmac molt atractiu degut al seu baix cost, a l'àmplia disponibilitat i a la seva bona tolerància. No obstant, els nivells aconseguits *in vivo*, no inhibeixen completament l'activitat de CD73, ja que la vida mitja *in vivo* i la biodisponibilitat del fàrmac encara no han estat ben caracteritzades. En canvi, delecionant genèticament CD73 s'aconsegueix reduir pràcticament el 100% de l'activitat enzimàtica. Tot i que, les teràpies basades en l'ús de anticossos monoclonals contra CD73 solen ser menys eficients inhibint l'activitat enzimàtica que les basades en l'ús d' α,β -meADP, han donat més bons resultats (revisat per Zhang, 2010).

Altres estudis impliquen CD73 (i el receptor A_{2A} d'adenosina) en les adhesions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular, processos clau en la invasió i la metàstasi tumoral (Zhang, 2012). La progressió tumoral està inhibida en ratolins deficients per CD73 (Yegutkin et al., 2011) que a més, tenen incrementada la immunitat antitumoral i són més resistent a la metàstasi (Stagg et al., 2011) i a la carcinogènesi (Stagg et al., 2012).

Altres ecto-nucleotidases tenen també el seu paper en el càncer. Per exemple, l'NTPDasa2, participa en la migració de les plaquetes cap a l'àrea tumoral, i està implicada en la regulació de l'angiogènesi i la inflamació, per tant, sembla jugar un paper força important en la progressió del tumor (Braganhol et al., 2009). L'expressió d'NPP1 està incrementada en tumors amb elevat grau de malignitat, per això, s'ha proposat l'ús d'aquest enzim com a marcador pronòstic en alguns tumors com els gliomes (Aerts et al., 2011).

Les múltiples implicacions de les ecto-nucleotidases (en general), i especialment de CD39 i CD73 en el control del creixement tumoral i en la modulació de les respostes immunitàries, evidencien el potencial d'aquestes com a dianes terapèutiques en oncologia. Per aquest motiu, ens hem proposat estudiar el paper de les ecto-nucleotidases en el càncer d'endometri, i la seva rellevància com a possibles dianes terapèutiques en el tractament d'aquest tipus de càncer (veure **capítol 3**).

8. EL CÀNCER D'ENDOMETRI

El càncer d'endometri és la patologia ginecològica maligna més freqüent del món occidental. Segons característiques clínicopatològiques i alteracions moleculars, es distingeixen dos tipus: el de Tipus I i el de Tipus II (Bokhman, 1983; revisat per Horn et al., 2007).

El càncer d'endometri de Tipus I o adenocarcinoma endometriode depenent d'estrògens, representa la forma més freqüent, aproximadament un 80% dels casos. Apareix a dones relativament joves pre-

o post-menopàusiques i es relaciona amb l'exposició a estrògens (endògens o exògens) no compensada amb progestàgens. Histològicament, els tumors Tipus I, estan ben diferenciats i, la majoria, són de tipus endometriode i de baix grau. La lesió precursora d'aquest tipus de càncer, freqüentment, és la hiperplàsia endometrial. A més, l'adenocarcinoma endometriode es caracteritza per presentar mutacions en els gens *PTEN*, *K-RAS*, *PIK3CA*, *β-catenina* i *FGFR* i inestabilitat de microsatèl·lits. El seu pronòstic sol ser favorable.

El càncer d'endometri de Tipus II o adenocarcinoma endometrial no endometriode representa el 20% restant dels casos. Apareix a dones relativament grans i no sol venir precedit d'una història d'exposició a estrògens no compensada. Per contra, els tumors Tipus II, sovint estan poc diferenciats, i deriven de lesions pre-canceroses de l'endometri atrofic. Són de grau més elevat i, habitualment, s'associen amb alteracions en el gen p53, pèrdua de la heterozigocitat a diversos cromosomes i altres alteracions moleculars a *STK15*, *p16*, *E-Cadherina* i *C-erbB2*. L'evolució és agressiva i té pitjor pronòstic que el de Tipus I (revisat per Yeramian et al., 2013). La **Figura 18** resumeix les característiques clínico-patològiques d'ambdós tipus de càncer.

	Type I	Type II
Menopausal status	Premenopausal and perimenopausal	Postmenopausal
Estrogen-related	Yes	No
Estrogen or progesterone receptors	Present	Absent
Histology of adjacent endometrium	Hyperplastic	Atrophic/cystic polyp
Precursor lesion	Atypical hyperplasia	EIC
Obesity	Yes	No
Parity	Nulliparous	Multiparous
Grade	Low	High
Histologic subtype	Endometrioid	Serous carcinoma clear-cell carcinoma
Clinical behavior	Indolent	Aggressive

Figura 18. Principals tipus de càncer d'endometri i les seves característiques clínico-patològiques (Horn et al., 2007)

En els últims anys, s'ha proposat i acceptat un model dualístic per explicar el procés de carcinogènesi endometrial (revisat per Abal et al., 2006; revisat per Doll et al., 2008). Alguns dels mecanismes genètics que indueixen carcinogènesi a l'endometri han estat identificats (revisat per Llauro et al., 2012) (**Figura 19**), però encara resta per identificar els mecanismes patogènics moleculars d'aquest

tipus de càncer. Existeix un gran interès en trobar nous biomarcadors que permetin completar la caracterització del procés de carcinogènesi endometrial i que facilitin el seu diagnòstic en etapes inicials així com el seu pronòstic.

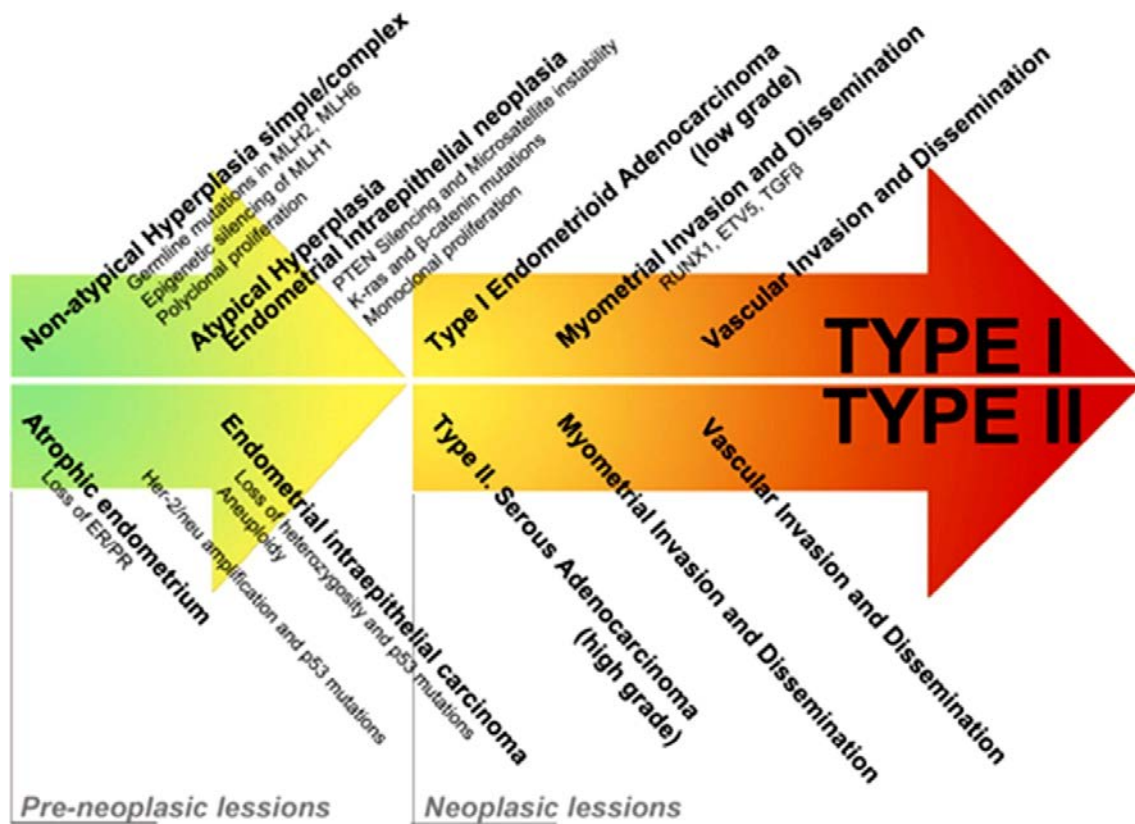


Figura 19. Model dualístic del càncer d'endometri (Llauradó et al., 2012)

El tamoxifen (TAM) és un modulador selectiu dels receptors d'estrògens que s'utilitza, gràcies als seus efectes antiestrogènics en el teixit mamari, com a teràpia adjuvant en el tractament del càncer de mama en aquelles pacients que presenten receptors d'estrògens. Aquest fàrmac, molt eficaç pel tractament del càncer de mama, té l'efecte advers d'incrementar la freqüència d'aparició del càncer d'endometri, a través de mecanismes que no es coneixen. S'han detectat alteracions en les activitats ecto-nucleotidàsiques de les plaquetes de pacients de càncer de mama tractades amb TAM (do Carmo Araújo et al., 2005) però encara no es coneixen els efectes d'aquest fàrmac sobre les ecto-nucleotidases endometrials, aspecte que ha estat estudiat en aquesta tesi (veure **capítol 4**).

8.1 SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA AL CÀNCER D'ENDOMETRI

Tot i que encara no hi ha gaires estudis al respecte, existeixen antecedents que la senyalització purinèrgica juga un paper en la patogènesi del càncer d'endometri. Estudis previs demostren que l'ATP, a través dels receptors P2Y₂, té efectes antiproliferatius i proapoptòtics en cèl·lules de carcinoma endometrial (Katzur et al., 1999). Així mateix, s'ha observat una pèrdua d'expressió del

receptor d'ATP P2X₇ en les lesions canceroses, en comparar-les amb els teixits normals (Li et al., 2006, 2007, 2009). La manca del receptor comporta la pèrdua dels efectes antiproliferatius i proapoptòtics derivats de la seva via de senyalització, afavorint, doncs, la progressió tumoral. Per aquest motiu, P2X₇ ha estat proposat com a biomarcador d'aquest tipus de càncer. No es coneixen, però, els mecanismes que regulen les concentracions d'ATP i adenosina, ni el possible paper de les ecto-nucleotidases en la patogènesi d'aquest tipus de càncer, aspecte que ha estat estudiat en aquesta tesi doctoral.

OBJECTIUS

*“The experimenter who does not know what he is looking for
will not understand what he finds”*

Claude Bernard

OBJECTIUS

L'ATP i l'adenosina extracel·lulars són potents molècules senyalitzadores que a través de receptors purinèrgics intervenen en la fisiologia i fisiopatologia de l'aparell reproductor, i per tant, influeixen en la reproducció i en malalties relacionades amb aquest aparell com és el càncer d'endometri. La concentració extracel·lular d'ATP i adenosina resulta del balanç entre l'alliberació d'aquestes molècules per part dels teixits i la seva hidròlisi a través d'enzims de membrana anomenats ecto-nucleotidases. L'**objectiu principal** d'aquesta tesi és **estudiar el paper de les ecto-nucleotidases**, com a reguladores de les concentracions d'ATP i adenosina extracel·lulars, en el sistema reproductor femení i en el càncer d'endometri. Pretenem contribuir, així, al coneixement de la senyalització purinèrgica en el sistema reproductor i investigar si les alteracions d'aquesta via de senyalització formen part dels mecanismes moleculars implicats en la patogènia del càncer d'endometri.

Com a **objectius específics** de la present tesi doctoral ens plantejem:

1. **Estudiar la localització i l'activitat d'ecto-5'-nucleotidasa (CD73)**, enzim responsable de generar adenosina a partir d'AMP, en el sistema reproductor femení murí al llarg del cicle estral. Aquest objectiu es desenvolupa en el **capítol 1**.
2. **Localitzar i caracteritzar** de forma precisa **l'expressió i l'activitat de les ecto-nucleotidases endometrials** a l'endometri funcional (proliferatiu i secretor) i postmenopàusic (atròfic), per avaluar la seva utilitat com a marcadors de fertilitat. Aquest objectiu s'assoleix en el **capítol 2**.
3. **Avaluar** els nivells de **CD39 i CD73** en mostres d'endometris humans amb adenocarcinoma endometrial (Tipus I i Tipus II), per valorar la seva utilitat com a biomarcadors de diagnòstic i pronòstic que aportin eines per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. Objectiu dut a terme en el **capítol 3**.
4. **Estudiar l'efecte d'hormones** (estradiol) i **fàrmacs** (tamoxifen i anastrozol) **en l'expressió de les ecto-nucleotidases en cultius cel·lulars** (línies cel·lulars i cultius primaris). Objectiu realitzat en el **capítol 4**.

RESULTATS

“Somewhere, something incredible is waiting to be known”

Carl Sagan

RESULTATS

Els resultats d'aquesta tesi s'organitzen en quatre capítols. Els capítols 1, 2 i 3 corresponen als articles publicats que formen part d'aquesta tesi. Els resultats del capítol 4 no es troben encara publicats, i per tant, aquest capítol està escrit amb el format d'una tesi tradicional.

CAPÍTOL 1: Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidasa/CD73 along the mouse female estrous cycle. Aliagas E, Torrejón-Escribano B, Lavoie E.G, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Solsona C, Martín-Satué M. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;199(2):191-97. doi: [10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x). Erratum in: *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;200(2):201.

CAPÍTOL 2: Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. Aliagas E, Vidal A, Torrejón-Escribano B, Taco M.R, Ponce J, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Condom E, Martín-Satué M. *Purinergic Signal*. 2013;9(2):227-37. doi: [10.1007/s11302-012-9345-0](https://doi.org/10.1007/s11302-012-9345-0).

CAPÍTOL 3: High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:509027. doi: [10.1155/2014/509027](https://doi.org/10.1155/2014/509027).

CAPÍTOL 4: Validació de models cel·lulars per a l'estudi de les ecto-nucleotidases. Efecte del tamoxifen, l'anastrozol i l'estradiol. Aliagas E, Texidó L, Torrejón-Escribano B, Martín-Satué M.

Articles que no formen part de la tesi:

ANNEX 1: High expression and activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the male murine reproductive tract. Martín-Satué M, Lavoie E.G, Fausther M, Lecka J, Aliagas E, Kukulski F, Sévigny J. Histochem Cell Biol. 2010;133(6):659-68. doi: [10.1007/s00418-010-0704-z](https://doi.org/10.1007/s00418-010-0704-z).

ANNEX 2: Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. Lavoie E.G, Gulbransen B.D, Martín-Satué M, Aliagas E, Sharkey K.A, Sévigny J. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;300(4):G608-20. doi: [10.1152/ajpgi.00207.2010](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00207.2010).

ANNEX 3: Reduced striatal ecto-nucleotidase activity in schizophrenia patients supports the “adenosine hypothesis”. Aliagas E, Villar-Menéndez I, Sévigny J, Roca M, Romeu M, Ferrer I, Martín-Satué M, Barrachina M. Purinergic Signal. 2013;9(4):599-608. doi: [10.1007/s11302-013-9370-7](https://doi.org/10.1007/s11302-013-9370-7).

CAPÍTOL 1

Changes in expression and activity levels of ecto-5'- nucleotidasa/CD73 along the mouse female estrous cycle

Aliagas E, Torrejón-Escribano B, Lavoie E.G, Gómez de Aranda I,
Sévigny J, Solsona C, Martín-Satué M.

Acta Physiologica (Oxford)

2010;199(2):191-97.

Erratum in: Acta Physiologica. 2010;200(2):201.

CAPÍTOL 1. Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidasa/CD73 along the mouse female estrous cycle. Acta Physiol (Oxf). 2010;199(2):191-97. Erratum in: Acta Physiol (Oxf). 2010;200(2):201.

L'ATP extracel·lular i el producte derivat de la seva hidròlisi, l'adenosina, modulen deferents funcions reproductives com per exemple la contracció del múscul llis uterí durant el part, la síntesi d'hormones i la composició del fluid fol·licular. A més, l'adenosina és un component determinant en el procés de capacitació dels espermatozoides que té lloc a les vies genitals femenines. La concentració extracel·lular de nucleòtids i nucleòsids ve determinada per les ecto-nucleotidases de membrana, entre les quals, la família de les ecto-nucleòsid trifosfat difosfohidrolases (E-NTPDases) és la més abundant i eficaç hidrolitzant ATP i ADP fins a AMP. Tres membres d'aquesta família han estat identificats a l'aparell reproductor femení murí: NTPDasa1, NTPDasa2 i NTPDasa3 (Martín-Satué et al., 2009). A més, una altre ecto-nucleotidasa, CD73, ha estat ben estudiada a l'aparell reproductor masculí (Martín-Satué et al., 2010) on juga un paper molt important en la fertilitat masculina. L'objectiu d'aquest estudi ha estat caracteritzar el patró d'expressió de CD73 a l'aparell reproductor femení murí al llarg del cicle estral, en ser la major font d'adenosina formada a partir de la hidròlisi de l'AMP, en aquest sistema.

Per localitzar i caracteritzar l'expressió i l'activitat de CD73 a l'aparell reproductor femení murí al llarg del cicle estral, es van utilitzar tècniques immunològiques i assaigs d'activitat enzimàtica *in situ* incloent experiments d'inhibició realitzats amb l' α,β -meADP, inhibidor específic de CD73. Per dur a terme aquest estudi es va haver d'assolir un important repte metodològic, la determinació de les fases del cicle estral murí. Per aconseguir-ho es van realitzar anàlisis citològics de rentats vaginals i l'avaluació histològica de les seccions d'úter.

Les principals troballes d'aquest estudi són:

- 1) **Determinació de les fases del cicle estral.** El diestre es caracteritza per presentar grans quantitats de leucòcits. Al proestre hi predominen cèl·lules epitelials nucleades i a l'estre cèl·lules escamoses. Al metestre, es troben barrejades cèl·lules escamoses i alguns leucòcits (veure **capítol 1, Figura 1**).
- 2) **Anàlisi morfològic de l'úter al llarg del cicle estral.** Al diestre, l'úter i la llum són petits. Al proestre, l'úter augmenta de mida, sent màxima a l'estre coincidint amb el màxim desenvolupament de la llum i les glàndules endometrials. Al metestre, l'úter disminueix de mida i l'estroma quasi no presenta glàndules (veure **capítol 1, Figura 1**).

- 3) **Localització i activitat de CD73 a l'aparell reproductor femení murí al llarg del cicle estral.** CD73 s'expressa i és activa als cossos lútis dels ovaris, i a les cèl·lules epitelials de l'oviducte, l'úter i les glàndules endometrials (veure **capítol 1, Figures 2, 3 i 4**). L'epiteli endometrial presenta marcades variacions en l'expressió i l'activitat de CD73 al llarg del cicle estral. La màxima expressió coincideix amb la fase d'estre en què hi ha la màxima receptivitat sexual de la femella i on l'adenosina seria clau en el procés de capacitació dels espermatozoides. Al metestre, s'observa una alta expressió i activitat de l'enzim, fet que no succeeix en altres fases (veure **capítol 1, Figures 3 i 4**).

Proposem que, l'adenosina generada per aquesta via, a part de participar en altres funcions com la regulació de la composició de l'esperma, podria contribuir significativament en la capacitació dels espermatozous, i per tant, influiria en la fertilitat.

Aquest estudi es troba publicat a la revista **Acta Physiologica (Oxford) 2010;199(2):191-97**. doi: [10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x). Factor d'impacte: **4.251** (JCR2013). Aquest treball no ha estat utilitzat per a la realització d'altres tesis doctorals. Pel què fa als autors del treball B.T.E ha participat en els estudis de microscòpia confocal i en l'edició de les fotografies de l'article. E.G.L i J.S han generat l'anticòs anti-CD73. I.G ha realitzat el suport tècnic en les citologies i en les tècniques histològiques. C.S, M.M.S i E.A han participat en la discussió dels resultats i en el disseny del manuscrit. M.M.S i E.A han posat a punt els estudis citològics per a la determinació del cicle estral. E.A ha realitzat els experiments. M.M.S ha dirigit el treball.

Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidase/CD73 along the mouse female estrous cycle

E. Aliagas,¹ B. Torrejón-Escribano,² E. G. Lavoie,³ I. Gómez de Aranda,¹ J. Sévigny,³ C. Solsona¹ and M. Martín-Satué¹

¹ Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona-IDIBELL, Barcelona, Spain

² Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona, Campus Bellvitge, Barcelona, Spain

³ Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada

Received 28 October 2009,

accepted 8 December 2009

Correspondence: M. Martín-Satué,
Facultat de Medicina, Universitat
de Barcelona-IDIBELL, C/Feixa
Llarga s/n, Pavelló de Govern 4^a
planta, lab. 4145, 08907
L'Hospitalet de Llobregat, Spain.
E-mail: martinsatue@ub.edu

Abstract

Aim: Extracellular ATP and its hydrolysis product adenosine modulate various reproductive functions such as those requiring contraction, hormone synthesis and maintenance of fluid composition. Moreover, adenosine is a key molecule for sperm capacitation. Extracellular nucleotide and nucleoside levels are affected by cell surface ectonucleotidases, amongst which the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family is the most abundant and effective to hydrolyse ATP and ADP to AMP. In the female reproductive tract three members of this family have been recently identified: NTPDase1, NTPDase2 and NTPDase3 (*Histochem. Cell Biol.* 131, 2009, 615). The purpose of the present study was to characterize in this system the expression profile of ecto-5'-nucleotidase (CD73), the enzyme generating adenosine from AMP.

Methods: Immunological techniques and *in situ* enzymatic assays were used to characterize the ecto-5'-nucleotidase expression in the mouse female reproductive tract along the four stages of the estrous cycle, that were determined by vaginal smear examination.

Results: Ecto-5'-nucleotidase was abundantly detected in the corpora lutea of the ovaries, as well as in several epithelia, such as that of oviducts, uterus and endometrial glands. Marked changes in endometrial ecto-5'-nucleotidase expression and activity along the estrous cycle are described, these being maximum at estrus phase, coinciding with optimal female sexual receptivity.

Conclusion: The adenosine generated thereby, besides other functions, might contribute to sperm capacitation, thus significantly influencing fertility.

Keywords adenosine, ATP, CD73, ecto-5'-nucleotidase, endometrium, NTPDase.

Extracellular nucleotides (ATP, ADP, UTP and UDP) as well as the nucleoside derivative adenosine are important autocrine and paracrine signalling molecules eliciting a large number of biological effects via receptors collectively named purinoceptors. Nucleotides act on two major widely expressed receptor

subfamilies: P2X receptors, which are ligand-gated ion channels, and G-protein-coupled P2Y receptors (reviewed in Boeynaems *et al.* 2005, Burnstock 2006). Subsequent to signal transduction, extracellular nucleotides are generally rapidly converted to adenosine, which acts via four G protein-coupled receptors

denoted A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ (Fredholm *et al.* 2001, Benarroch 2008).

Extracellular adenosine plays a variety of roles in reproduction. In females it exerts control of myometrium contractions (Gillman & Pennefather 1998), and during pregnancy it also serves as a regulatory signal for early post-implantation events (Blackburn *et al.* 1992). Changes in adenosine receptor expression found in placenta have been related to preeclampsia (von Versen-Höyneck *et al.* 2009), a leading cause of maternal and infant illness and death. Moreover, adenosine is a key molecule for sperm capacitation, the series of changes that sperm undergo into the female reproductive tract to acquire fertilizing ability (Minelli *et al.* 2004, Schuh *et al.* 2007, Fraser 2008) and expression of adenosine receptors has been demonstrated in mammalian spermatozoa (Minelli *et al.* 2000, 2008, Adeoya-Osiguwa & Fraser 2002). Although many cell types express adenosine transporters, the main source of extracellular adenosine is via the hydrolysis of extracellular ATP by ectonucleotidases. Importantly, ATP also influences female fertility through activation of differentially expressed P2 receptors (Bardini *et al.* 2000), making the regulation of the levels of these molecules essential.

Amongst cell surface ectonucleotidases, the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family is dominant, especially the four plasma membrane-bound members NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 and NTPDase8 (Zimmermann 2001, Robson *et al.* 2006, Yegutkin 2008). These enzymes are differentially expressed and hydrolyse nucleoside triphosphates and diphosphates to their monophosphate derivatives. To fine-tune the breakdown of nucleotides, NTPDases differ in the hydrolysis rates of these molecules, especially of the nucleoside diphosphates. Their location and activity in female murine reproductive tract have been recently described (Martín-Satué *et al.* 2009). Other than the expected expression on vascular endothelial and smooth muscle cells, NTPDase1 was also detected in ovarian corpora lutea. NTPDase2 was largely expressed by cells in the connective tissue, and NTPDase3 in some epithelia, such as that of oviducts. NTPDase8 was not detected in any of these tissues. AMP, the final product of NTPDase activity, might then be hydrolysed to adenosine by ecto-5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl phosphatidylinositol-linked membrane-bound glycoprotein (Colgan *et al.* 2006). Changes in the expression and distribution of this enzyme in the uterus have been previously identified during early pregnancy (Blackburn *et al.* 1992, Bucci & Murphy 1999) but its expression in non-pregnant females has remained unstudied.

The aim of the present work was to characterize the cellular expression and enzymatic activity of ecto-5'-nucleotidase in the murine female reproductive tract,

paying special attention to possible changes in the endometria throughout the estrous cycle.

Materials and methods

Animals

This study was carried out in accordance with the guidelines of the Institutional Ethical Committee for Experimental Animals. Twenty-five Swiss 10- to 12-week-old female mice were used for this study. Females at different estrous phases were killed and the tissues (uterus, ovaries, oviducts) extracted.

Estrous cycle determination

The estrous cycle was staged by examining vaginal smears obtained following standardized protocols. Briefly, 20 µL of normal saline solution were used for lavage and smeared onto glass slides. Samples were fixed with 95% ethanol, stained with May-Grünwald-Giemsa stain and examined under a light microscope. Mice were assigned to one of the four estrous stages (diestrus, proestrus, estrus or metestrus) after evaluation of relative proportion of epithelial nucleated cells, squamous cells and leucocytes in vaginal smears. Only those mice showing two or more consecutive normal cycles were included in the study. To collect the samples, once the estrous phase was staged, a second smear was performed immediately before the killing to confirm the phase.

Preparation of samples

For morphological studies, a section of a uterus horn was fixed over night in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, cut and stained with haematoxylin-eosin.

For histochemical studies, freshly dissected tissues were embedded in O.C.T. freezing medium (Tissue-Tek®; Sakura Finetek, Zoeterwoude, the Netherlands) and snap-frozen in isopentane in a Bright Clini-RF rapid freezer and stored at -20 °C until used. Sections of 10 µm were obtained and fixed in 10% phosphate-buffered formalin mixed with cold acetone (Merck, Darmstadt, Germany).

Antibodies

Primary antibody rNu-9_L to rat CD73 used in this study has been previously characterized and validated (Koszalka *et al.* 2004). Secondary antibodies used were: horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (EnVision™+system; DAKO, Carpinteria, CA, USA) and Alexa Fluor 488-goat anti-rabbit (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands).

Immunohistochemistry, immunofluorescence and enzyme histochemistry

Immunohistochemistry and immunofluorescence experiments were performed as described previously (Fausther *et al.* 2007, Martín-Satué *et al.* 2009). Briefly, tissue sections were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody and then with the appropriate secondary antibodies. Pre-immune serum and secondary antibodies alone were routinely included as controls for the immunolabelling experiments.

Localization of AMPase activity was determined using the Wachstein/Meisel lead phosphate method (Braun *et al.* 2003). Fixed slices were pre-incubated for 1 h at room temperature in 50 mM Tris-maleate buffer, pH 7.4, containing 2 mM CaCl₂, 250 mM sucrose and 2.5 mM levamisole, as an inhibitor of alkaline phosphatase. Enzymatic reaction was performed for 1 h at 37 °C in the same buffer supplemented with 5 mM MnCl₂, 2 mM Pb(NO₃)₂, 3% Dextran T-250 and in the presence of 1 mM AMP as substrate. For control experiments the substrate was omitted. The reaction was revealed by incubation with 1% (NH₄)₂S v/v for exactly 1 min at room temperature. For ecto-5'-nucleotidase inhibition experiments, 1 mM α,β -methylene-ADP (α,β -meADP) was added to both pre-incubation and enzymatic reaction buffers.

Histochemistry samples were counterstained with haematoxylin, dehydrated, mounted with DPX mounting medium and observed and photographed under a Nikon Eclipse E-800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan). In fluorescence experiments nuclei were stained with To-Pro[®]-3 (Invitrogen, Paisley, UK) mounted with Fluoromount mounting medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and photographed under a Leica

TCS-SL spectral confocal microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

Results

Estrous cycle determination

Twenty-five female mice undergoing regular estrous cycles were included in this study. Only one was later excluded due to discordances between the vaginal smear evaluations at the day of killing. The general features of the vaginal smears used to determine the estrous cycle phase are shown in Figure 1. In summary, high amounts of leucocytes identified the diestrus and round nucleated epithelial cells the proestrus; large cornified cells were predominant at estrus and the presence of many leucocytes and a few cornified cells characterized the metestrus. The morphological analysis of paraffin-embedded uterus sections revealed that the uterus was small at diestrus, with a slit-like lumen; the lumen was considerably dilated at proestrus and was maximum at estrus, also coinciding with the maximum thickness of endometrium and development of glands (Fig. 1).

Immunolabelling and in situ histochemistry

In ovaries, ecto-5'-nucleotidase was expressed in corpora lutea, where the protein was enzymatically active, as confirmed by the *in situ* AMPase activity experiments. The specific ecto-5'-nucleotidase inhibitor α,β -meADP abolished this activity (Fig. 2). No expression or activity of the enzyme was detected in other ovarian follicles.

In oviducts, ecto-5'-nucleotidase was expressed at the luminal surface of epithelial cells, coinciding with the

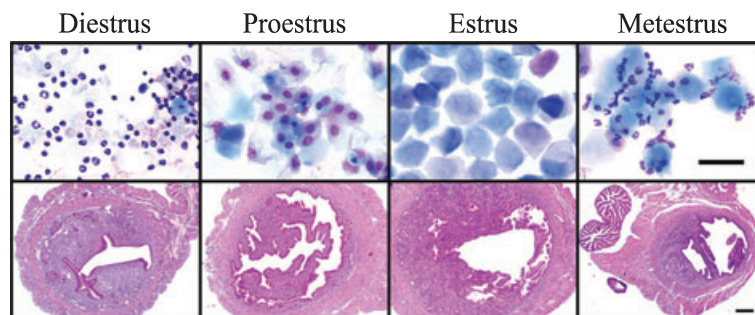


Figure 1 Analysis of vaginal cytology and uterus morphology along mouse estrous cycle. Top images: May-Grünwald-Giemsa staining of vaginal smears at the four different phases of estrous cycle: diestrus, proestrus, estrus and metestrus. Evaluation of relative proportion of epithelial nucleated cells, squamous cells and leucocytes in vaginal smears were used as criteria for cycle phase determination. Scale bar 50 μ m. Bottom images: Histological evaluation of the corresponding mouse uterine transversal sections at the four stages of the estrous cycle stained with haematoxylin and eosin. Estrus phase coincides with the maximum development of the uterus lumen and endometrial glands. Scale bar 200 μ m.

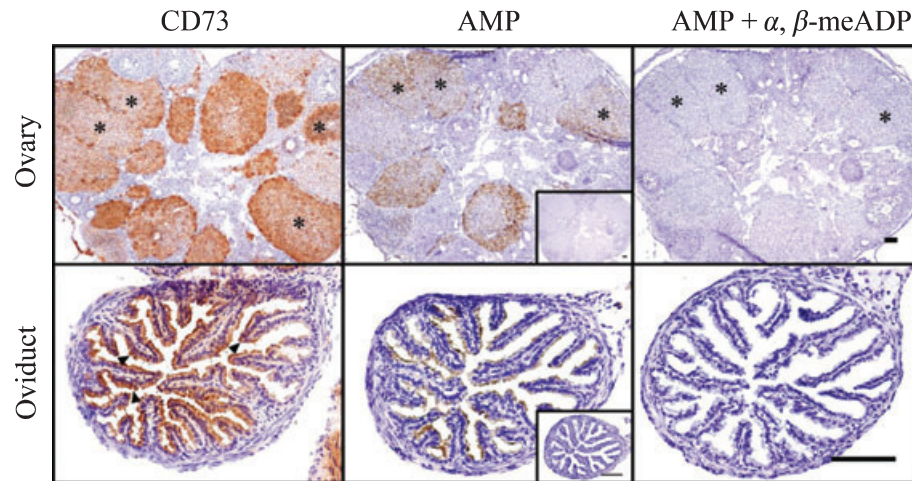


Figure 2 Immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase and enzyme histochemistry in ovaries (top images) and oviducts (bottom images). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) is expressed in corpora lutea (asterisks) of ovaries and at the apical surface of luminal epithelial cells (arrowheads) in oviducts (left images). The localization of AMPase activity mirrors the immunolocalization (AMP, middle images); the inhibitor α,β -meADP completely abolished this activity (right images). Insets correspond to control experiments in which the substrate was omitted. Scale bars 100 μm .

localization of AMPase activity, that was also completely inhibited by α,β -meADP (Fig. 2). No precipitates were formed in control experiments where AMP was omitted from the reaction buffer (insets in Fig. 2).

In the uterus, besides its expression in blood vessels and in the smooth muscle of myometrium (data not shown), ecto-5'-nucleotidase was expressed in the endometrial epithelial cells of both lumen and glands (Fig. 3). Fluorescence was localized mainly at the apical cell membrane, although the basolateral membranes were also faintly stained. Ecto-5'-nucleotidase expression was maximum in both lumen and glandular epithelia at the estrus phase. In lumen, the enzyme expression was the lowest, but still detectable, at metestrus, and increased progressively until estrus. In proestrus some glands expressed ecto-5'-nucleotidase, although in lower amounts than in estrus; the expression was maximum and generalized in the glands at the estrus phase. No expression was detected in glands at metestrus and diestrus.

The clean background obtained with the pre-immune sera further demonstrated the antibody specificity (shown for uterus in an inset in Fig. 3). In all cases, incubations with secondary antibodies alone produced negative staining (data not shown).

In situ AMPase activity in the uterus confirmed that the immunodetected protein was enzymatically active (Fig. 4), the highest enzyme activity also coinciding with the maximum protein expression. The inhibitor α,β -meADP abrogated this activity (insets in Fig. 4). Endometrial stroma, especially at the area surrounding the lumen, showed moderate ecto-5'-nucleotidase expression and activity at estrus phase, which became

maximum at metestrus phase and was undetectable at diestrus and proestrus (Figs 3 and 4).

Discussion

Recent studies have shown that extracellular adenosine modulates sperm function, stimulating capacitation and inhibiting spontaneous acrosome reaction (reviewed by Fraser 2008). As these phenomena occur in the female reproductive tract, our aim was to localize and characterize in this system, along the estrous cycle, the ecto-5'-nucleotidase activity as a source of adenosine from AMP. For this purpose 25 female mice undergoing regular estrous cycles were used in this study. As estrous phase classification criteria, vaginal smears were used for analysing the relative proportion of epithelial nucleated cells, squamous cells and leucocytes. The morphological analysis of paraffin-embedded uterus sections coincided with the expected well-defined characteristics of the corresponding estrous phase (reviewed in Westwood 2008).

In ovaries, ecto-5'-nucleotidase was localized in corpora lutea, where the protein was enzymatically active, as confirmed by the *in situ* AMPase activity experiments. No expression or activity was detected in other ovarian follicles, suggesting a relationship between ecto-5'-nucleotidase expression and the developmental stage of the follicle, as has been described for P2X expression (Bardini *et al.* 2000). We have previously demonstrated the expression of NTPDase1 in corpora lutea (Martín-Satué *et al.* 2009), coinciding with the fact that fluid from larger follicles contains one-tenth less ATP concentration than that from smaller

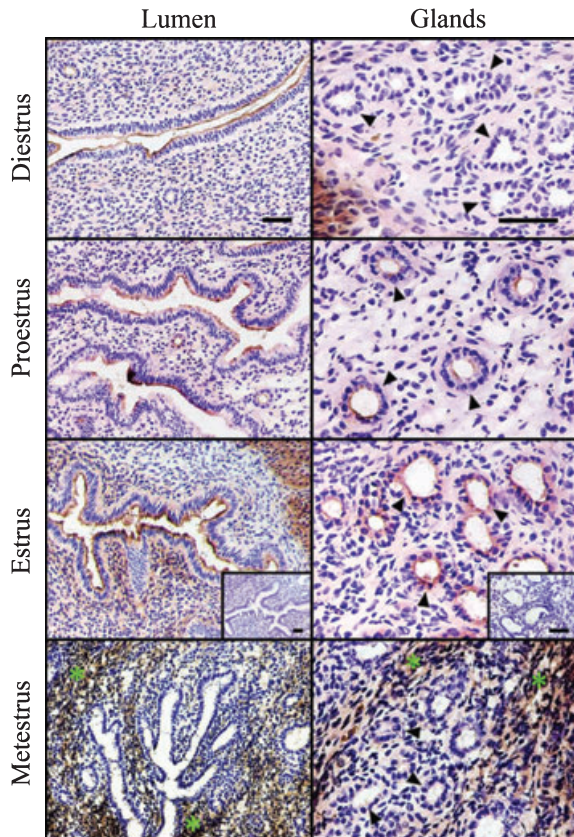


Figure 3 Immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase in uterus lumen (left column) and endometrial glands (right column) along the mouse estrous cycle. Immunofluorescence experiments using rNU9_L antibody in mouse endometria show ecto-5'-nucleotidase expression (green) at the apical side of luminal and glandular epithelia (arrowheads). Maximum expression in these structures is detected at the estrus phase. The stroma in estrus displays faint immunoreactivity and becomes maximum in metestrus (asterisks). Inset shows control experiment using pre-immune serum as primary antibody. In order to compare the fluorescence among the phases, photographs were taken with the same settings. Scale bars 30 μ m.

ones (Park *et al.* 2003). Whether corpora lutea of pregnant females express amounts of ectonucleotidases equivalent to those from non-pregnant females would be an interesting issue to address.

In oviducts, ecto-5'-nucleotidase was localized at the luminal surface of epithelial cells, where the protein was enzymatically active. It is known that ATP induces ion secretion by oviduct epithelial cells, thus contributing to fluid composition (Keating & Quinlan 2008), which, in turn, might influence oocyte and embryo transport, fertilization and early stages of embryo development. Expression of NTPDase3 by epithelial oviductal cells has been described previously (Martín-Satué *et al.* 2009), suggesting a possible coordination of both NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase in the control of ATP and adenosine levels in the luminal environment.

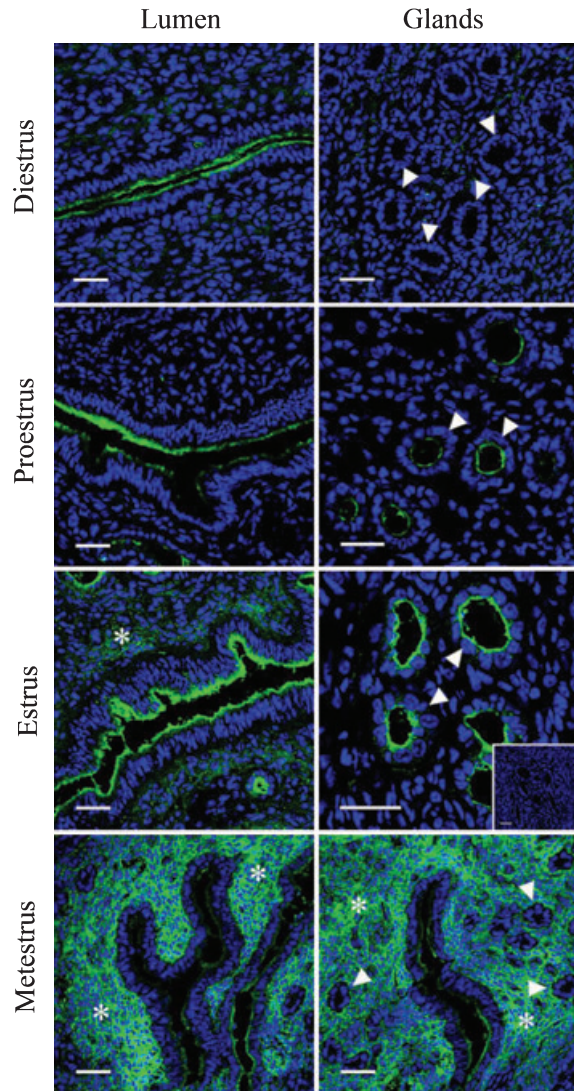


Figure 4 AMPase *in situ* activity by enzyme histochemistry in uterus lumen (left column) and endometrial glands (right column) along the mouse estrous cycle. AMPase activity is localized in epithelia of uterus lumen and endometrial glands (arrowheads). The maximum AMPase activity in these structures is detected at the estrus phase, coinciding with the maximum development of the endometrial glands. It is noteworthy that at metestrus the stroma shows very high activity (asterisks) while it is barely detectable in epithelia. Insets correspond to inhibition experiments performed in the presence of α,β -meADP and show complete inhibition of this activity. Scale bars 50 μ m.

In the uterus, ecto-5'-nucleotidase was localized at the endometrial epithelial cells of both lumen and glands. Fluorescence intensity comparison using confocal microscopy allowed the determination of the variation in ecto-5'-nucleotidase expression among phases. Ecto-5'-nucleotidase expression was maximum in both lumen and glandular epithelia at the estrus phase, when the

female reaches optimal sexual receptivity. *In situ* AMPase activity confirmed that the immunodetected protein was enzymatically active, the highest enzyme activity coinciding with the maximum protein expression. In view of our results, it is likely that ecto-5'-nucleotidase expression is influenced by hormones. Supporting this conclusion, previous studies have also identified changes in the expression and distribution of this enzyme in the uterus during early pregnancy (Bucci & Murphy 1999), coinciding with changes in adenosine levels (Blackburn *et al.* 1992).

We propose that adenosine generated by endometrial epithelium, besides other possible functions as the regulation of fluid composition, might significantly contribute to sperm capacitation and thus influence fertility. Due to the relevance of these results, we are currently conducting experiments with human endometria to assess whether adenosine generation is related to human fertility.

Conflict of interest

None.

This work was supported by grants to M. Martín-Satué from the University of Barcelona (ACESB09/06), to C. Solsona from the Spanish Ministry of Science (MICINN-SAF2008/732) and Fundació LaMarató TV3, and to J. Sévigny from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). E.G. Lavoie was recipient of a scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and J. Sévigny of a New Investigator award from the CIHR and of a Junior 2 scholarship from the FRSQ. The authors thank Gloria Gannaway for English editing, the Microscopy Unit of Serveis Científicotècnics, and Dr. Alvaro Gimeno from the Animal Facility of the University of Barcelona (Bellvitge Campus) for excellent help.

References

- Adeoya-Osiguwa, S.A. & Fraser, L.R. 2002. Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP. *Mol Reprod Dev* **63**, 245–255.
- Bardini, M., Lee, H.Y. & Burnstock, G. 2000. Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus. *Cell Tissue Res* **299**, 105–113.
- Benarroch, E.E. 2008. Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* **70**, 231–236.
- Blackburn, M.R., Gao, X., Airhart, M.J., Skalko, R.G., Thompson, L.F. & Knudsen, T.B. 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**, 155–168.
- Boeynaems, J.M., Communi, D., Gonzalez, N.S. & Robaye, B. 2005. Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost* **31**, 139–149.
- Braun, N., Sévigny, J., Mishra, S.K., Robson, S.C., Barth, S.W., 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**, 1355–1364.
- Bucci, M. & Murphy, C.R. 1999. Differential alterations in the distribution of three phosphatase enzymes during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells in the rat. *Cell Biol Int* **23**, 21–30.
- Burnstock, G. 2006. Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* **147**(Suppl. 1), S172–S181.
- Colgan, S.P., Eltzschig, H.K., Eckle, T. & Thompson, L.F. 2006. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* **2**, 351–360.
- Fausther, M., Lecka, J., Kukulski, F., Lévesque, S.A., Pelletier, J., Zimmermann, H., Dranoff, J.A. & Sévigny, J. 2007. Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G785–G795.
- Fraser, L.R. 2008. The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology* **70**, 1356–1359.
- Fredholm, B.B., Jzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N. & Linden, J. 2001. International Union of Pharmacology XXV Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev* **53**, 527–552.
- Gillman, T.A. & Pennefather, J.N. 1998. Evidence for the presence of both P1 and P2 purinoceptors in the rat myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **25**, 592–599.
- Keating, N. & Quinlan, L.R. 2008. Effect of basolateral adenosine triphosphate on chloride secretion by bovine oviductal epithelium. *Biol Reprod* **78**, 1119–1126.
- Koszalka, P., Ozüyan, B., Huo, Y., Zernecke, A., Flögel, U., Braun, N., Buchheiser, A., Decking, U.K., Smith, M.L., Sévigny, J. *et al.* 2004. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* **95**, 814–821.
- Martín-Satué, M., Lavoie, E.G., Pelletier, J., Fausther, M., Csizmadia, E., Guckelberger, O., Robson, S.C. & Sévigny, J. 2009. Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* **131**, 615–628.
- Minelli, A., Allegrucci, C., Piomboni, P., Mannucci, R., Lluís, C. & Franco, R. 2000. Immunolocalization of A1 adenosine receptors in mammalian spermatozoa. *J Histochem Cytochem* **48**, 1163–1171.
- Minelli, A., Liguori, L., Bellazza, I., Mannucci, R., Johansson, B. & Fredholm, B.B. 2004. Involvement of A1 adenosine receptors in the acquisition of fertilizing capacity. *J Androl* **25**, 286–292.
- Minelli, A., Bellezza, I., Collodel, G. & Fredholm, B.B. 2008. Promiscuous coupling and involvement of protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the adenosine A1 receptor signalling in mammalian spermatozoa. *Biochem Pharmacol* **75**, 931–941.
- Park, D.W., Cho, T., Kim, M.R., Kim, Y.A., Min, C.K. & Hwang, K.J. 2003. ATP-induced apoptosis of human

- granulosa luteal cells cultured in vitro. *Fertil Steril* 80, 993–1002.
- Robson, S.C., Sévigny, J. & Zimmermann, H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2, 409–430.
- Schuh, S.M., Hille, B. & Babcock, D.F. 2007. Adenosine and catecholamine agonists speed the flagellar beat of mammalian sperm by a non-receptor-mediated mechanism. *Biol Reprod* 77, 960–969.
- von Versen-Höynck, F., Rajakumar, A., Bainbridge, S.A., Gallaher, M.J., Roberts, J.M. & Powers, R.W. 2009. Human placental adenosine receptor expression is elevated in preeclampsia and hypoxia increases expression of the A2A receptor. *Placenta* 30, 434–442.
- Westwood, F.R. 2008. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol* 36, 375–384.
- Yegutkin, G.G. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783, 673–694.
- Zimmermann, H. 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52, 44–56.

Erratum

In the article by Aliagas *et al.* (2010), the figure legends for Figures 3 and 4 were incorrectly transposed. The figures and the correct legends are presented below:

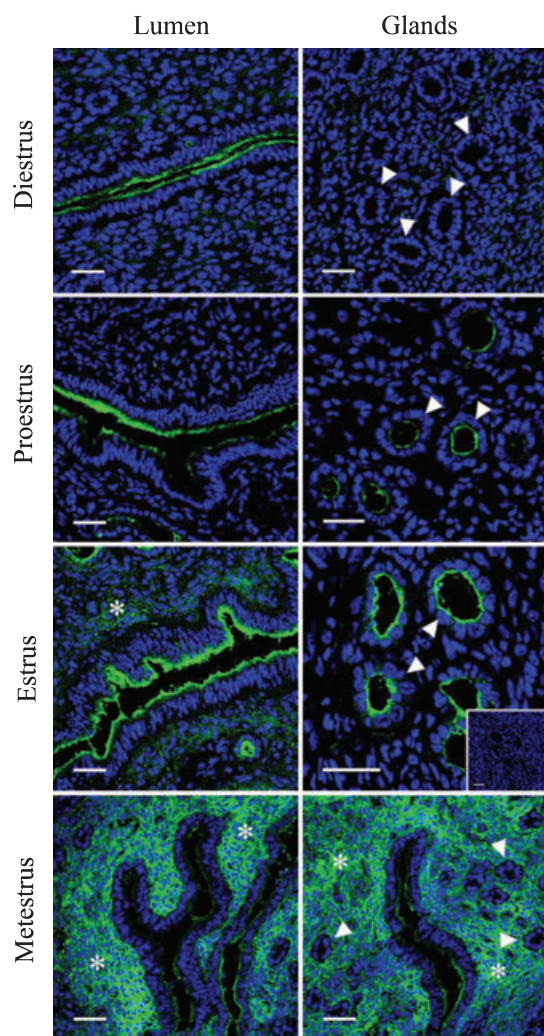


Figure 3 Immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase in uterus lumen (left column) and endometrial glands (right column) along the mouse estrous cycle. Immunofluorescence experiments using rNU9₁ antibody in mouse endometria show ecto-5'-nucleotidase expression (green) at the apical side of luminal and glandular epithelia (arrowheads). Maximum expression in these structures is detected at the estrus phase. The stroma in estrus displays faint immunoreactivity and becomes maximum in metestrus (asterisks). Inset shows control experiment using pre-immune serum as primary antibody. In order to compare the fluorescence among the phases, photographs were taken with the same settings. Scale bars 30 μ m.

We apologise for this error.

Reference

Aliagas, E., Torrejón-Escribano, B., Lavoie, E. G., Gómez de Aranda, I., 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* 199, 191–197.

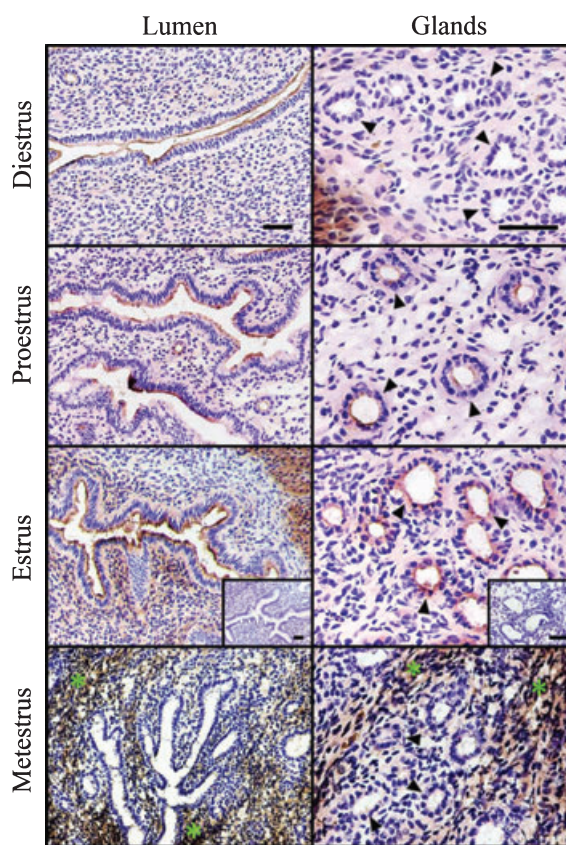


Figure 4 AMPase *in situ* activity by enzyme histochemistry in uterus lumen (left column) and endometrial glands (right column) along the mouse estrous cycle. AMPase activity is localized in epithelia of uterus lumen and endometrial glands (arrowheads). The maximum AMPase activity in these structures is detected at the estrus phase, coinciding with the maximum development of the endometrial glands. It is noteworthy that at metestrus the stroma shows very high activity (asterisks) while it is barely detectable in epithelia. Insets correspond to inhibition experiments performed in the presence of α , β -meADP and show complete inhibition of this activity. Scale bars 50 μ m.

CAPÍTOL 2

Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium

Aliagas E, Vidal A, Torrejón-Escribano B, Taco M.R, Ponce J, Gómez de Aranda I, Sévigny J, Condom E, Martín-Satué M.

Purinergic Signalling
2013;9(2):227-37.

CAPÍTOL 2. Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. Purinergic Signal. 2013;9(2):227-37.

L'ATP i l'adenosina extracel·lulars, actuant a través de receptors específics anomenats en conjunt receptors purinèrgics, regulen aspectes de la fertilitat femenina com per exemple la composició del fluid endometrial. Existeixen quatre grans grups d'ecto-nucleotidases que determinen els nivells extracel·lulars d'ATP i d'adenosina, i per tant, controlen l'accessibilitat d'aquests als receptors purinèrgics: les ecto-nucleòsid trifosfat difosfohidrolases (E-NTPDases), les ecto-nucleòtid pirofosfatasa/fosfodiesterases (E-NPPs), l'ecto-5'-nucleotidasa (CD73) i les fosfatases alcalines (AP). L'objectiu del present estudi ha estat caracteritzar l'expressió i la distribució de les ecto-nucleotidases a l'endometri humà al llarg del cicle menstrual i després de la menopausa, amb la finalitat d'avaluar la seva utilitat com a marcadors de fertilitat.

Per a la realització d'aquest treball, es van estudiar endometris funcionals (proliferatius i secretors) i postmenopàusics (atròfics) procedents de dones sense patologies endometrials. En aquests teixits, es va caracteritzar (de manera acurada i àmplia) l'expressió i la distribució de les ecto-nucleotidases en els epitelis (luminal i glandular), l'estroma i les arterioles espirals mitjançant tècniques d'immunomarcatge i d'activitat enzimàtica *in situ*.

Les principals troballes relacionades amb aquest treball són:

- 1) **Expressió de les ecto-nucleotidases endometrials a l'endometri funcional (proliferatiu i secretor) i postmenopàusic.** Les ecto-nucleotidases es localitzen principalment als epitelis, luminal i glandular, i a l'estroma de l'endometri. La seva expressió fluctua al llarg del cicle menstrual i varia, també, després de la menopausa (veure **capítol 2, Taula 3 i Figura 7**).
- a) **Expressió i activitat de les fosfatases alcalines.** PLAP i TNAP s'expressen a l'epiteli glandular de tots els tipus d'endometri, i a l'epiteli luminal de l'endometri proliferatiu i atròfic. TNAP, a més, s'expressa a l'estroma adjacent a l'epiteli luminal de l'endometri secretor. Els experiments d'activitat enzimàtica *in situ* demostren activitat fosfatasa alcalina en les mateixes estructures on s'expressen les proteïnes (veure **capítol 2, Figura 1**).
- b) **Expressió i activitat de CD73.** CD73 s'expressa i és activa a l'epiteli glandular i a l'estroma de l'endometri funcional i postmenopàusic. Els experiments d'activitat enzimàtica *in situ* demostren activitat AMPàsica en les mateixes estructures on la proteïna és

immunodetectada, i aquesta activitat és completament inhibida amb l'inhibidor α,β -meADP específic de CD73 (veure **capítol 2, Figura 2**).

- c) **Expressió i activitat de les NTPDases.** CD39 s'expressa a les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis de l'estroma. NTPDasa3 s'expressa a l'epiteli luminal i glandular de l'endometri funcional i postmenopàusic (veure **capítol 2, Figura 3a i 3b**). Els experiments d'activitat enzimàtica *in situ* demostren activitat ATPàsica en les mateixes estructures on s'expressen les proteïnes (veure **capítol 2, Figura 3c**). L'NTPDasa3 s'expressa de manera selectiva a les arteries espirals de l'endometri associada a la capa muscular (veure **capítol 2, Figura 4**). No s'ha detectat expressió de l'NTPDasa3 en d'altres vasos sanguinis d'aquest teixit.
- d) **Expressió de les NPPs.** NPP1 s'expressa a l'epiteli luminal de tots els tipus d'endometri, i a l'epiteli glandular dels endometris proliferatiu i atrofíic. NPP3 s'expressa, de manera diferencial, a l'epiteli glandular dels endometris proliferatiu i secretor, sent aquest últim l'endometri amb l'expressió més alta (veure **capítol 2, Figura 5**). A més, l'enzim **NPP3** ha estat identificat com a **nou marcador biològic** de metaplàsia tubària, canvi cel·lular benigne sovint confós amb patologies i diagnosticat erròniament.
- e) **Expressió de CD26.** CD26 s'expressa a l'epiteli glandular de tots els tipus d'endometri sent l'expressió màxima a l'endometri secretor (veure **capítol 2, Figura 6**).

Els nostres resultats posen de manifest la rellevància de la senyalització purinèrgica en les funcions reproductives i apunten a un possible paper de les ecto-nucleotidases en la fertilitat femenina.

Aquest estudi es troba publicat a la revista **Purinergic Signalling**. **2013 Jun; 9(2):227-37**. doi: [10.1007/s11302-012-9345-0](https://doi.org/10.1007/s11302-012-9345-0) Factor d'impacte: **3.510** (JCR2013). Aquest treball no ha estat utilitzat per a la realització d'altres tesis doctorals. Pel que fa als autors B.T.E ha participat en els estudis de microscòpia confocal i en l'edició de les fotografies de l'article. J.S ha generat l'anticòs anti-NTPDase3. I.G ha realitzat el suport tècnic en les tècniques histològiques. A.V, M.R.T i E.C han realitzat el processament postquirúrgic i la posterior classificació histològica de les mostres. J.P ha realitzat les intervencions quirúrgiques. A.V, E.A i M.M.S han participat en la discussió dels resultats i en el disseny del manuscrit. E.A ha realitzat els experiments. M.M.S ha dirigit el treball.

Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium

Elisabet Aliagas · August Vidal · Benjamín Torrejón-Escribano · Maria del Rosario Taco · Jordi Ponce · Inmaculada Gómez de Aranda · Jean Sévigny · Enric Condom · Mireia Martín-Satué

Received: 26 September 2012 / Accepted: 20 November 2012 / Published online: 6 December 2012
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

Abstract Extracellular ATP and its hydrolysis product, adenosine, acting through specific receptors collectively named purinergic receptors, regulate female fertility by influencing the endometrial fluid microenvironment. There are four major groups of ecto-nucleotidases that control the levels of extracellular ATP and adenosine and thus their availability at purinergic receptors: ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases), ecto-nucleotide pyrophosphatase/phospho-diesterases (E-NPPs), ecto-5'-nucleotidase (5'-NT), and alkaline phosphatases (APs). The aim of the present work is to characterize the expression and distribution of ecto-nucleotidases in human endometrium along the menstrual cycle and after menopause, to evaluate their potential utility as fertility markers. We examined proliferative, secretory and atrophic endometria from women without endometrial pathology undergoing hysterectomy. We show that the ecto-nucleotidases are mainly present at

endometrial epithelia, both luminal and glandular, and that their expression fluctuates along the cycle and also changes after menopause. An important result was identifying NPP3 as a new biological marker of tubal metaplasia. Our results emphasize the relevance of the study of purinergic signaling in human fertility.

Keywords Ecto-nucleotidases · Endometrium · Purinergic signaling · Fertility · CD39 · CD73 · NPP

Abbreviations

AP	Alkaline phosphatase
α,β -meADP	alpha, beta-Methylene adenosine 5'-diphosphate
NPP	Nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase
5'-NT	Ecto-5'-nucleotidase

E. Aliagas · A. Vidal · B. Torrejón-Escribano ·
I. Gómez de Aranda · E. Condom · M. Martín-Satué
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental,
Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge,
Universitat de Barcelona,
Barcelona, Spain

E. Aliagas · A. Vidal · J. Ponce · E. Condom · M. Martín-Satué
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL),
Barcelona, Spain

A. Vidal · M. Taco · E. Condom
Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari de Bellvitge,
Barcelona, Spain

B. Torrejón-Escribano
Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona,
Campus de Bellvitge,
Barcelona, Spain

J. Ponce
Servei de Ginecologia, Hospital de Bellvitge,
Barcelona, Spain

J. Sévigny
Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie,
Centre Hospitalier Universitaire de Québec and Département de
microbiologie–infectiologie et d'immunologie,
Faculté de Médecine, Université Laval,
Québec, QC, Canada

M. Martín-Satué (✉)
Facultat de Medicina-UB Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat,
Pavelló de Govern, 4^a planta, lab. 4145, C/ Feixa Llarga s/n,
08907, Barcelona, Spain
e-mail: martinsatue@ub.edu

NTPDase	Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase
PLAP	Placental AP
PPi	Pyrophosphate
SMA	Smooth muscle actin
TNAP	Tissue nonspecific AP

Introduction

During the menstrual cycle, in response to autocrine, paracrine and endocrine factors, the human endometrium undergoes morphological and functional changes essential for uterine receptivity, affecting glands, stroma and luminal epithelium. The first phase is characterized by a proliferative endometrium and is governed by estrogens, while after ovulation, the secretory phase, influenced by progesterone, prepares the endometrium for embryo implantation [1].

Extracellular nucleotides, such as ATP, and nucleosides, such as adenosine, are autocrine and paracrine molecules that play important roles in reproduction [2]. In the uterus, extracellular ATP is needed for the initiation and maintenance of myometrial contractions [3]; it contributes to the regulation of the uterine fluid microenvironment by regulating endometrial Cl^- secretion [4], Na^+ absorption [5] and cervical mucus production [6]. P2X and P2Y nucleotide receptors have been identified in the female reproductive tract [7–9], with changes in the expression along the cycle [10] and during implantation [11] and pregnancy [8]. Furthermore, extracellular ATP treatment of sperm improves its fertilizing capability [12–14], thus potentially improving the outcome of assisted reproduction techniques.

Extracellular adenosine, the dephosphorylated product generated from the hydrolysis of ATP, coordinates early post-implantation events [15], and also exerts control of myometrium contractions [16]. Importantly, adenosine is a key molecule for sperm capacitation, the series of changes that sperm undergo in the female reproductive tract to acquire fertilizing ability [17–19].

For the reasons stated above, the study of the mechanisms controlling the levels of extracellular ATP and adenosine in the female reproductive system, the endometrium in particular, is necessary. The concentrations of extracellular ATP and adenosine are controlled by specific nucleotide-hydrolyzing enzymes expressed at the cell surface called ecto-nucleotidases [20]. Different families of enzymes are responsible for these activities and, alone or acting sequentially, they generate adenosine from adenine nucleotides (i.e., ATP, ADP or AMP): (1) the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family includes four plasma membrane-bound members: NTPDase1 (CD39), NTPDase2, NTPDase3 and NTPDase8 [21–23]; these enzymes are differentially expressed and hydrolyze nucleoside triphosphates and

diphosphates to their monophosphate derivatives; (2) the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) family has three members (NPP1–3) capable of hydrolyzing nucleoside triphosphates to monophosphates and PPi, such as ATP to AMP and PPi [24]; (3) the 5'-nucleotidase family has only one member attached to the outer plasma membrane, the ecto-5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl phosphatidylinositol-linked membrane-bound glycoprotein that efficiently hydrolyzes AMP to adenosine [25]; (4) the alkaline phosphatase (AP) family includes ubiquitous enzymes, such as the placental AP (PLAP) and the tissue nonspecific AP (TNAP), with broad substrate specificity, including adenine nucleotides and pyrophosphate, releasing inorganic phosphate [26]. The generated adenosine can be further inactivated by other enzymes such as adenosine deaminase (ADA), which can be expressed as a soluble ectoenzyme, or as membrane-associated enzyme often forming larger complexes with CD26/dipeptidyl peptidase IV, converting adenosine to inosine. Moreover, ATP can be re-synthesized via backward ecto-phosphotransfer reactions catalyzed by enzymes such as adenylate kinase and nucleoside diphosphate kinase [23].

In spite of their obvious importance, very little is known of the ecto-nucleotidases expression in endometrium. A few studies have been conducted in mice; NTPDase1 and 2 were identified in myometrium [27], and ecto-5'-nucleotidase in endometrium, where the expression and activity fluctuate along the estrous cycle and with pregnancy, pointing to hormonal regulation of extracellular adenosine levels in this organ [28, 29]. However, to our knowledge, there are no available data concerning the expression of ecto-nucleotidases in human endometrium and their possible changes along the cycle.

The study of protein expression in remodeling cyclic human endometrium, and its comparison to postmenopausal endometrium, is crucial for understanding the physiology of reproduction. In the present work, we characterize for the first time the expression of human endometrial nucleotide-converting ectoenzymes, in both cyclic and postmenopausal endometria.

Methods

Samples

The ethical principles of this study adhere to the Declaration of Helsinki, and all the procedures were approved by the ethics committee for clinical investigation of Bellvitge Hospital. Endometrial samples were obtained from hysterectomy specimens without endometrial malignancy at the Service of Gynecology of Bellvitge Hospital. Fresh samples were cut, embedded in O.C.T freezing media (Tissue-Tek®; Sakura Finetek, Zoeterwoude, the Netherlands), snap-frozen in a

Table 1 Patient demographics

Type of endometrium	Number of cases	Age (years) Average (range)	Indication of hysterectomy (number of cases)
Proliferative	8	44.3 (39–49)	Leiomyomas (3) Prolapse (2) Cervical neoplasia (2) Ovarian neoplasia (1)
Secretory	12	43.9 (32–54)	Leiomyomas (8) Cervical neoplasia (3) Ovarian neoplasia (1)
Atrophic	32	62.7 (47–80)	Leiomyomas (2) Prolapse (24) Cervical neoplasia (2) Ovarian neoplasia (4)

Shandon Histobath™ 2 (Neslab Instruments Inc., USA) at the Service of Pathology and stored at -80°C until used. Alternatively endometrial samples were obtained from the Tumor Bank of Bellvitge Biomedical Research Institut (IDIBELL).

Eight proliferative, 12 secretory and 32 atrophic endometria were used in this study. Endometrial dating was done at the Service of Pathology.

Demographic description of the samples and the factors that indicated the need for hysterectomy are summarized in Table 1.

Reagents

Primary antibodies used in this study are listed in Table 2. Secondary antibodies used were: horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (EnVision™ + system; DAKO, Carpinteria, CA, USA), Alexa Fluor 488- or 555-goat anti-mouse or anti-rabbit, and Alexa Fluor 488-donkey anti-goat (Life Technologies, Paisley, UK). To-Pro®-3 (Life Technologies) was used as a nuclear marker.

Table 2 List of primary antibodies used for immunolabeling experiments

Antibody specificity	Name/clone	Source	Supplier	Dilution
Ecto-5'-nucleotidase (CD73)	4G4	Mouse	Abcam (ab81720)	1/50
NTPDase1 (CD39)	BU-61	Mouse	Ancell (188–020)	1/500
NTPDase3	B ₃ S ₁₀	Mouse	http://ectonucleotidases-ab.com/	1/500
CD26	202–36	Mouse	Abcam (ab3154)	1/100
NPP1	Anti-NPP1	Goat	Abcam (ab40003)	1/250
NPP3	NP4D6	Mouse	Abcam (ab90754)	1/100
Human placental alkaline phosphatase (PLAP)	8B6	Mouse	Sigma (A2951)	1/1000
Alkaline phosphatase, tissue non-specific (TNAP)	[3H414(TRA-2-49)]	Mouse	Abcam (ab17973)	1/50
CD31	Anti-CD31	Rabbit	Abcam (ab28364)	1/50
Alpha smooth muscle actin (α -SMA)	Anti- α SMA	Rabbit	Abcam (ab5694)	1/200

Immunolabeling experiments

Sections (10 μm) were obtained with the Cryostat Leica CM1950 (Leica, Wetzlar, Germany), put onto poly-L-lysine covered glass slides, and fixed in 10 % phosphate-buffered formalin mixed with cold acetone (Merck, Darmstadt, Germany) for 2.5 min.

For immunolabeling experiments samples were rinsed with PBS and pre-incubated for 1 h at room temperature (RT) with PBS containing either 20 % normal goat serum or 20 % horse serum (Gibco, Paisley, UK) and 0.2 % gelatin (Merck). Slices were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies at the dilutions indicated in Table 2. All dilutions were made in PBS. After three washes in PBS, tissue sections were incubated with the suitable secondary antibodies for 1 h at RT. Secondary antibodies alone were routinely included as controls for the experiments. Nuclei were counterstained with haematoxylin or, alternatively, in fluorescence assays, To-Pro®-3 was used to visualize the nuclei.

Samples were observed and photographed under light Leica DMD 108 microscope or under Leica TCS-SL spectral confocal microscope (Leica).

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

In situ AMPase and ATPase activity experiments

For the histochemical localization of AMPase and ATPase activity, the Wachstein/Meisel lead phosphate method [29, 30] was performed. Briefly, fixed tissue sections were pre-incubated for 1 h at RT in 50 mM Tris-maleate buffer, pH 7.4 containing 2 mM CaCl_2 and 0.25 M sucrose. Enzymatic reaction was performed for 1 h at 37°C in the same buffer supplemented with 5 mM MnCl_2 , 2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 3 %

Table 3 Summary of the main findings on ecto-enzyme expression in cyclic (proliferative and secretory) and atrophic endometria

	NTPDase1 (CD39)	NTPDase3	NPP1	NPP3	PLAP	TNAP	CD26	5'-NT (CD73)
<i>Proliferative</i>								
Surface epithelium	-	-	+++	-	+++	+++	-	-
Glandular epithelium								
Functional layer	-	+	+	+	++	+++	-	++
Basal layer	-	++	+	++	+	++	-	+++
Endometrial stromal cells	++	-	-	-	-	-	-	++
Spiral arteries	++	+++	-	-	-	++	+	-
<i>Secretory</i>								
Surface epithelium	-	+++	+++	+++	-	-	-	-
Glandular epithelium								
Functional layer	-	++	-	++	+	+++	+++	++
Basal layer	-	+++	-	+++	-	++	++	+++
Endometrial stromal cells	+++	-	-	-	-	+ (*)	-	+++
Spiral arteries	++	+++	-	-	-	++	+	-
<i>Atrophic</i>								
Surface epithelium	-	-	+++	-	+++	+++	-	-
Glandular epithelium	-	++	++	-	+	+++	+	+++
Endometrial stromal cells	++	-	+	-	-	-	-	++

- no immunostaining, + weak positive staining, ++ strong staining, +++ strongest staining

Asterisk in the TNAP column of secretory endometrium indicates that the label is only present in a narrow area of the stroma subjacent to luminal epithelium

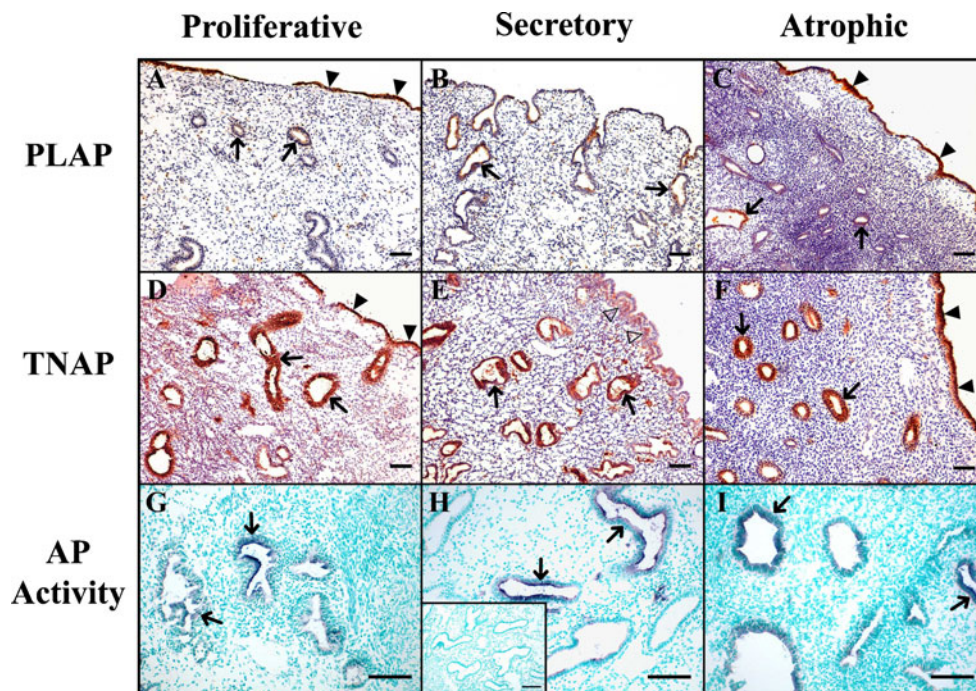


Fig. 1 Immunolocalization of PLAP (a, b, c), TNAP (d, e, f) and AP in situ histochemistry (g, h, i), in proliferative (a, d, g), secretory (b, e, h) and atrophic (c, f, i) endometria. PLAP and TNAP were immunodetected in the glands (arrows) of all types of endometrium, and in the luminal epithelium of proliferative and atrophic endometria (filled arrowheads). TNAP was also immunodetected at the stroma subjacent to the luminal

epithelium in secretory endometrium (e, empty arrowheads). Microphotographs g, h, and i show blue deposits corresponding to AP in situ activity and nuclei are stained in green. *Inset* in h corresponds to the activity experiment in the presence of the inhibitor levamisole, and shows complete AP inhibition. Scale bars=100 μ m

dextran T250 and 2.5 mM levamisole, as an inhibitor of the AP activity, and in the presence of either 1 mM AMP or 200 μ M ATP as a substrate. For CD73 inhibition experiments, 1 mM α,β -methylene-ADP (α,β -meADP) was added to both pre-incubation and enzymatic reaction buffers. The substrate was omitted in the control experiments. The reaction was revealed by incubation with 1 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ v/v for exactly 1 min, and nuclei were counterstained with haematoxylin. Samples were then dehydrated, mounted with DPX mounting medium, and observed and photographed under light Leica DMD 108 microscope.

In situ alkaline phosphatase activity experiments

The histochemical localization of AP was addressed by using the Gossrau method [31] with some modifications. Briefly, fixed slices were washed twice in Tris 0.1 M HCl buffer, pH7.4 containing 5 mM MgCl_2 , and then pre-incubated with the same buffer at pH9.4 for 15 min at RT. Enzymatic reaction was started by adding 200 μ l of the revealing reagent BCIP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 7 min at RT, and stopped with Tris 0.1 M HCl buffer, pH7.4. 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. Nuclei were counterstained with methyl green dye for 10 min, dipped briefly in alcohol, mounted in aqueous mounting medium (Fluoromount; Sigma-Aldrich) and observed under light Leica DMD 108 microscope.

Results

Table 3 compiles the results of all the immunolabelings performed.

Our results show that PLAP and TNAP were expressed in both luminal and glandular epithelia of endometrium (Fig. 1), but were absent in the luminal epithelium of secretory endometria. Moreover, in this type of endometrium, TNAP was present in the stroma subjacent to the luminal epithelium. Besides this change in the enzyme distribution, there were no other significant variations along the cycle or when compared with the atrophic endometrium. Immunolabeling was stronger for TNAP than for PLAP in all the mentioned structures, especially in glands, where the PLAP staining was very weak. In situ activity experiments demonstrated AP activity in the locations of the immunodetected proteins, and this activity was completely inhibited with the

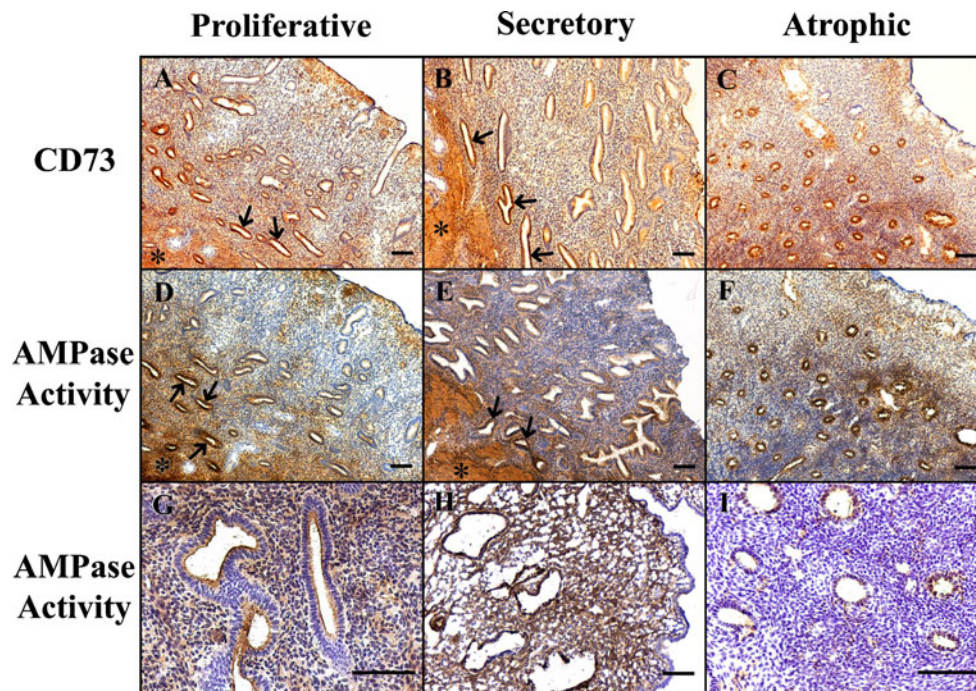


Fig. 2 Immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase (5'-NT)/CD73 (a, b, c), and AMPase in situ histochemistry (d–i), in proliferative (a, d, g), secretory (b, e, h) and atrophic (c, f, i) endometria. 5'-NT was immunodetected in the glands and the stroma of all types of endometrium. Dark brown deposits in microphotographs d–i correspond to the AMPase in situ activity. g Detail of glands of a proliferative endometrium showing AMPase activity at the luminal side of the glandular

epithelium and at the stroma. h Magnification of a secretory endometrium showing intense stromal AMPase activity. i An activity experiment performed on atrophic endometrium in the presence of the inhibitor α,β -meADP, and shows complete inhibition of AMPase activity. Note that 5'-NT expression and AMPase activity are stronger in the glands of basal layer (arrows) and that myometrium is also intensely labeled (asterisks). Scale bars=100 μ m

AP inhibitor levamisole, confirming the specificity of the activity. As expected, AP was also detected in endothelial cells.

Ecto-5'-nucleotidase (CD73) was expressed and active in glandular epithelium and in stroma in both cyclic and atrophic endometria (Fig. 2). Labeling in the basal layer glands was much more intense than in the functional layer. Luminal epithelium was not stained. In situ activity experiments demonstrated AMPase activity in the structures where the enzyme was immunodetected, and this activity was completely inhibited by the specific ecto-5'-nucleotidase inhibitor α,β -meADP. Although the enzyme is present throughout the cycle, an increase in the expression and activity in the stroma was consistently observed in the secretory phase.

As expected, NTPDase1 (CD39) was expressed in the endothelial cells of the stromal blood vessels (Fig. 3a). Sparse cells at the stroma were also positive for NTPDase1 staining, probably being macrophages and other immune system cells. Labeling was never seen in association with either glands or luminal surface. On the contrary, NTPDase3 was expressed by

glandular and luminal epithelia, in both cyclic and atrophic endometria. An increase in the expression in both epithelia was observed in the secretory phase. These changes in the expression in glands are represented in Fig. 3b. Interestingly, NTPDase3 was also detected in the endometrial spiral arteries. This expression is associated with the muscle layer but not with the endothelium as confirmed by double immunostainings performed with anti-SMA and anti-CD31 antibodies, respectively (Fig. 4). NTPDase3 was not detected in the myometrial arteries or in other blood vessels. The in situ ATPase activity was detected in the above reported structures, coinciding with NTPDase1 and NTPDase3 expression (Fig. 3c). NTPDase2 was not detected in endometrial epithelia, neither luminal nor glandular (data not shown).

NPP1 was expressed in luminal epithelia of all types of endometrium and in glands of proliferative and especially atrophic endometrium, and was absent in secretory endometrium (Fig. 5a). NPP3 was expressed in glands only in cyclic endometria but with marked changes in the amount of expression along the cycle, being maximal in the secretory

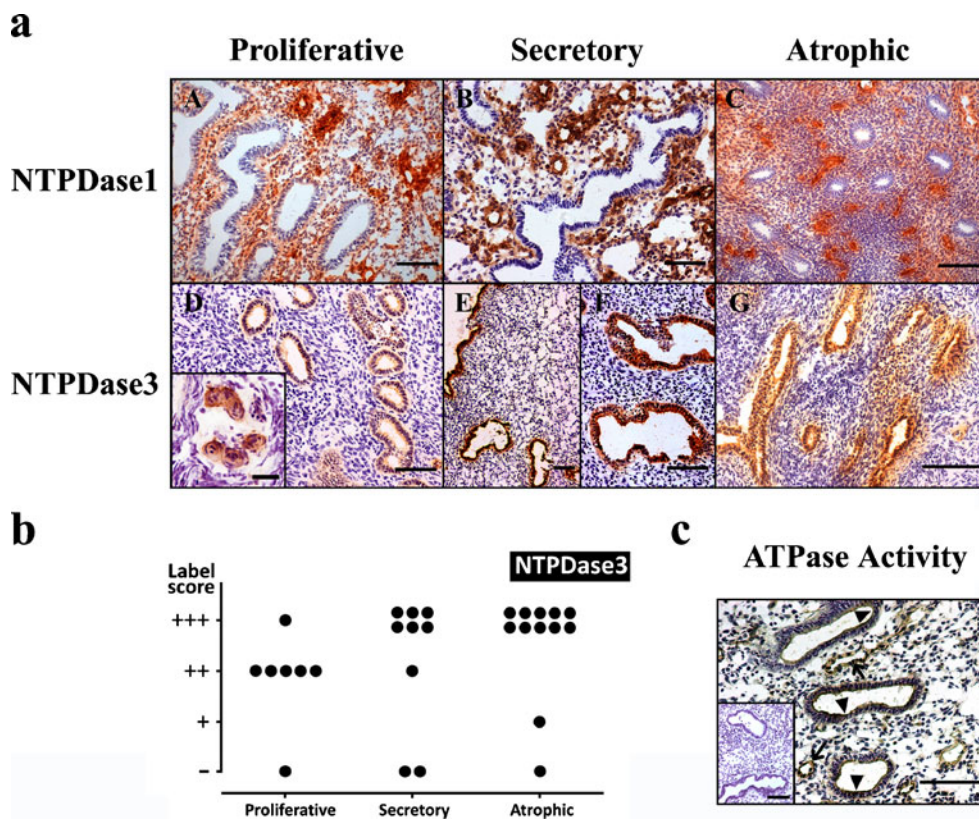
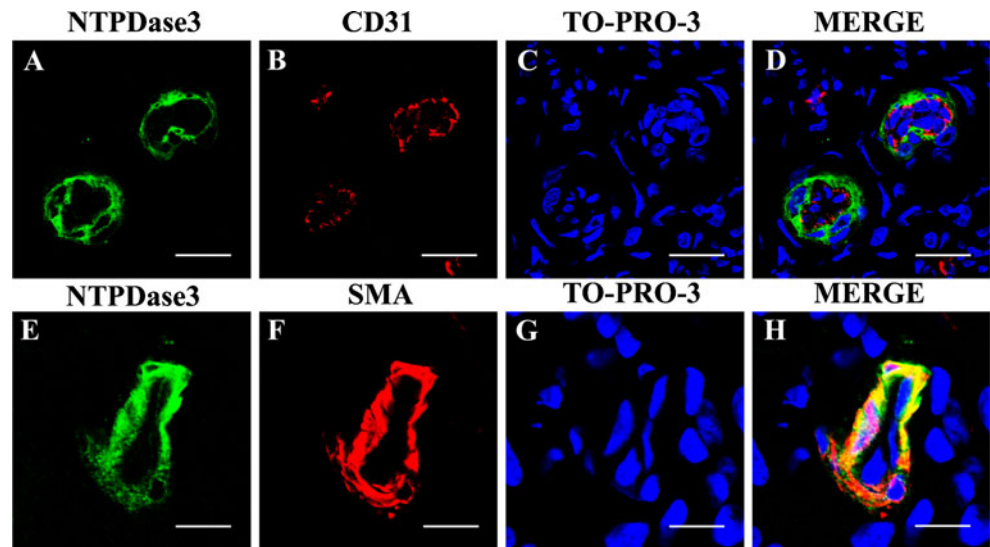


Fig. 3 **a** Immunolocalization of NTPDase1 (*a, b, c*) and NTPDase3 (*d, e, f, g*) in proliferative (*a, d*), secretory (*b, e, f*) and atrophic (*c, g*) endometria. NTPDase1 was immunodetected in the stromal blood vessels of all types of endometrium. NTPDase3 was immunodetected in the luminal and glandular epithelia of all types of endometria. Note that label is stronger in the secretory (*e, f*) than in the proliferative endometrium (*d*) and that in atrophic endometrium label is also very high. NTPDase3 was also immunodetected in spiral arteries (*inset* in

d). Scale bars=100 μ m except for the inset, where it is 25 μ m. **b** Label intensity score of NTPDase3 in the glandular epithelium of proliferative, secretory and atrophic endometria. Maximal score is found in secretory and atrophic endometria. **c** ATPase in situ histochemistry in glands (*arrowheads*) and in stroma, especially in blood vessels (*arrows*). The *inset* corresponds to an activity experiment performed in the absence of substrate. Scale bar=100 μ m

Fig. 4 Confocal fluorescence images of endometrial spiral arteries labeled with antibodies against NTPDase3 (a, e) and CD31 (b) or SMA (f). Nuclei were labeled with To-Pro®-3 (c, g). Merge images showed colocalization between NTPDase3 and SMA (h) but not between NTPDase3 and CD31 (d). Scale bars 20 μm (a–d) and 10 μm (e–h)

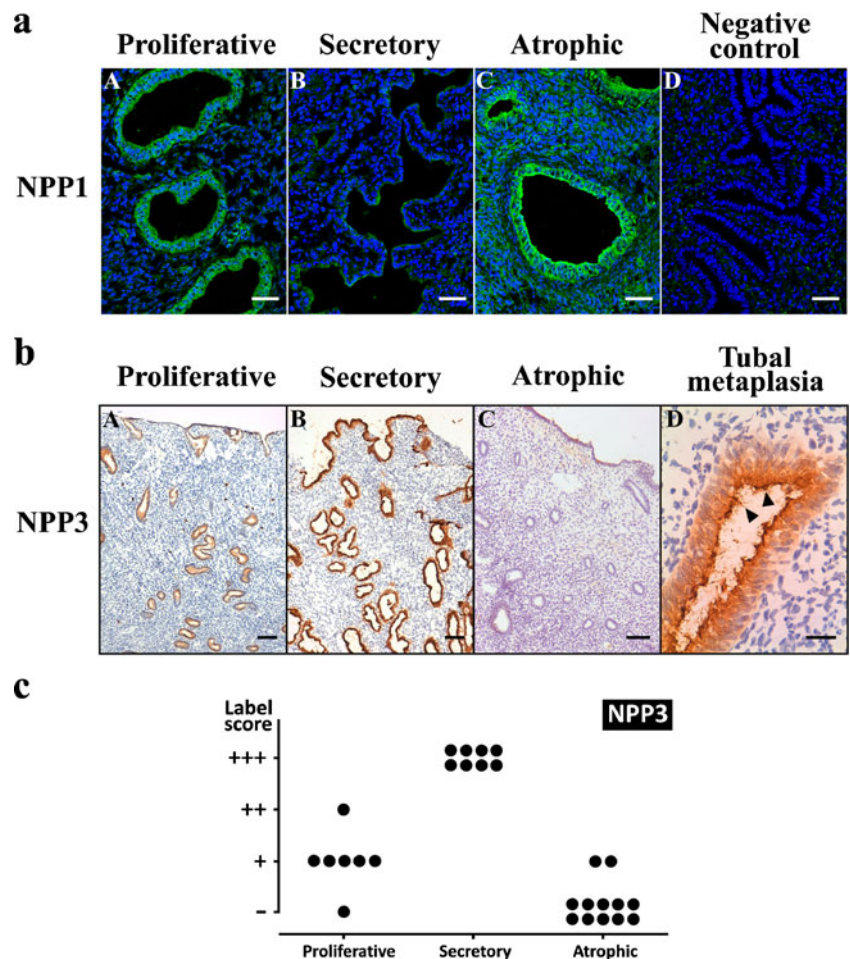


phase (Fig. 5b). These changes in glandular NPP3 expression are represented in Fig. 5c. NPP3 was also expressed in luminal epithelium exclusively in secretory endometria. Importantly, no labeling was seen in atrophic endometria except in cases of tubal metaplasia where strong labeling

was seen in association with metaplastic glands (Fig. 5b). NPP2 was not detected in endometrial epithelia, neither luminal nor glandular (data not shown).

CD26 was detected in endometrial glands, with maximal expression in the secretory phase, coinciding with previous

Fig. 5 a Confocal fluorescence images of proliferative (a), secretory (b) and atrophic (c) endometria labeled with anti-NPP1. d A negative control of the experiment in which the primary antibody was omitted. NPP1 was immunodetected in the glandular epithelia of proliferative (a) and atrophic (c) endometria. Scale bars=40 μm. b Immunolocalization of NPP3 in proliferative (a), secretory (b) and atrophic (c) endometria, and in a case of tubal metaplasia (d) in an atrophic endometrium. NPP3 was immunodetected in the luminal and glandular epithelia of cyclic endometria (a, b) but is maximal at the secretory phase (b). Note that the label is absent in the atrophic endometrium (c), and that it is present in the tubal metaplastic gland (d). Arrowheads point to the cilia in the tubal metaplastic epithelium. Scale bars=100 μm (a–c) and 25 μm (d). c Label intensity score of NPP3 in the glandular epithelium of proliferative, secretory and atrophic endometria. Maximal score is found in secretory endometria



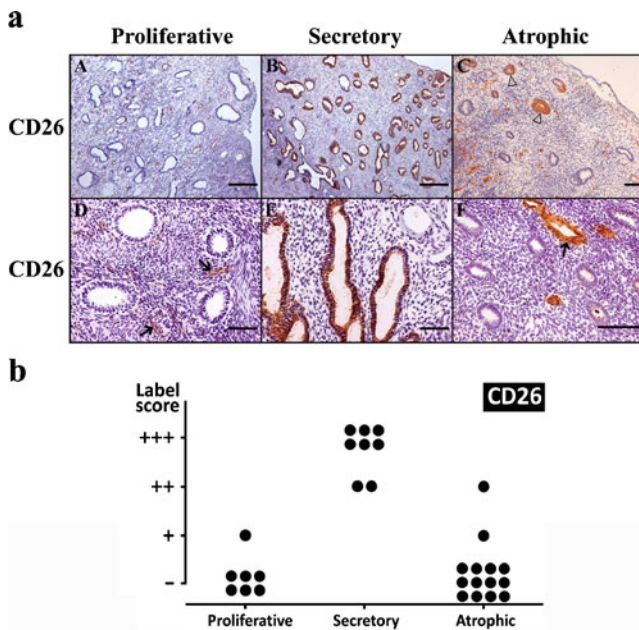


Fig. 6 **a** Immunolocalization of CD26 in proliferative (*a, d*), secretory (*b, e*) and atrophic (*c, f*) endometria. CD26 was immunodetected in the blood vessels (*arrows*) and in glandular epithelia of secretory endometrium (*b, e*). Note that only a few isolated glands are labeled in atrophic endometrium (*c, empty arrowheads*). Scale bars=500 μ m (*a, b*) and 100 μ m (*c–f*). **b** Label intensity score of CD26 in the glandular epithelium of proliferative, secretory and atrophic endometria. Maximal score is found in secretory endometria

findings [32]. We add here new information by studying also the postmenopausal endometria, showing that CD26 is only weakly expressed in these endometria (Fig. 6). It is noticeable that in atrophic endometria, CD26 expression is not homogeneous amongst all the glands and that only a few glands were positive for this labeling. Immunostaining was also detected in the endothelial cells.

Figure 7 illustrates an endometrium showing the location of all the ecto-enzymes studied here.

Discussion

Extracellular ATP and adenosine, acting through purinergic receptors, are signaling molecules playing a role in reproduction. Purinergic receptors have already been identified in endometrium with a variety of roles, such as ion transport, mucus secretion, cell proliferation and innate mucosal immunity. However, to date little has been known about the ecto-enzymes that regulate their ligand concentrations in human endometrium. In the present work, we have extensively characterized the expression of different families of ectonucleotidases in cyclic and postmenopausal endometria. Our results show that different enzymes, operating in concert or consecutively, are able to metabolize extracellular ATP to adenosine. These enzymes thus have the potential to modulate

ligand availability for both nucleotide and nucleoside receptors, making them key molecules in the purinergic signaling of endometrium. In this section, we discuss in detail our findings for each family of enzymes.

Mammalian APs are ubiquitous enzymes that display broad substrate specificity towards phosphate compounds. In the rat, AP activity has been already described in uterine luminal and glandular epithelium, establishing a correlation between the luminal activity and endometrial sensitivity [33]. Moreover, a local increase in AP activity has been shown to occur at the site of blastocyst implantation, as part of the early decidual response [34]. These enzymes are thought to be involved in the attachment of blastocyst to the endometrium and in the maintenance of the composition and volume of luminal secretion essential for embryo development [35]. Studies of APs in relation to fertility have also been conducted in women showing up-regulation of the *PLAP-2* gene as a marker of ongoing pregnancy after in vitro fertilization treatment [36]. In the present work, we localize the expression and activity of two AP enzymes, PLAP and TNAP, at the luminal and glandular epithelium of human endometrium. Our results coincide with previous studies [37, 38], and we add new data by comparing the expression along the cycle and in postmenopausal endometrium. We did not detect any significant quantitative variations in protein expression in glands, but changes in the distribution of PLAP and TNAP expression were consistently found in the luminal part of secretory endometria, where both enzymes were absent. Moreover, in these endometria, a new location for TNAP was seen at the stroma subjacent to the lumen. These variations might be related with changes needed for appropriate embryo attachment and implantation occurring mainly at the luminal part of the endometrium.

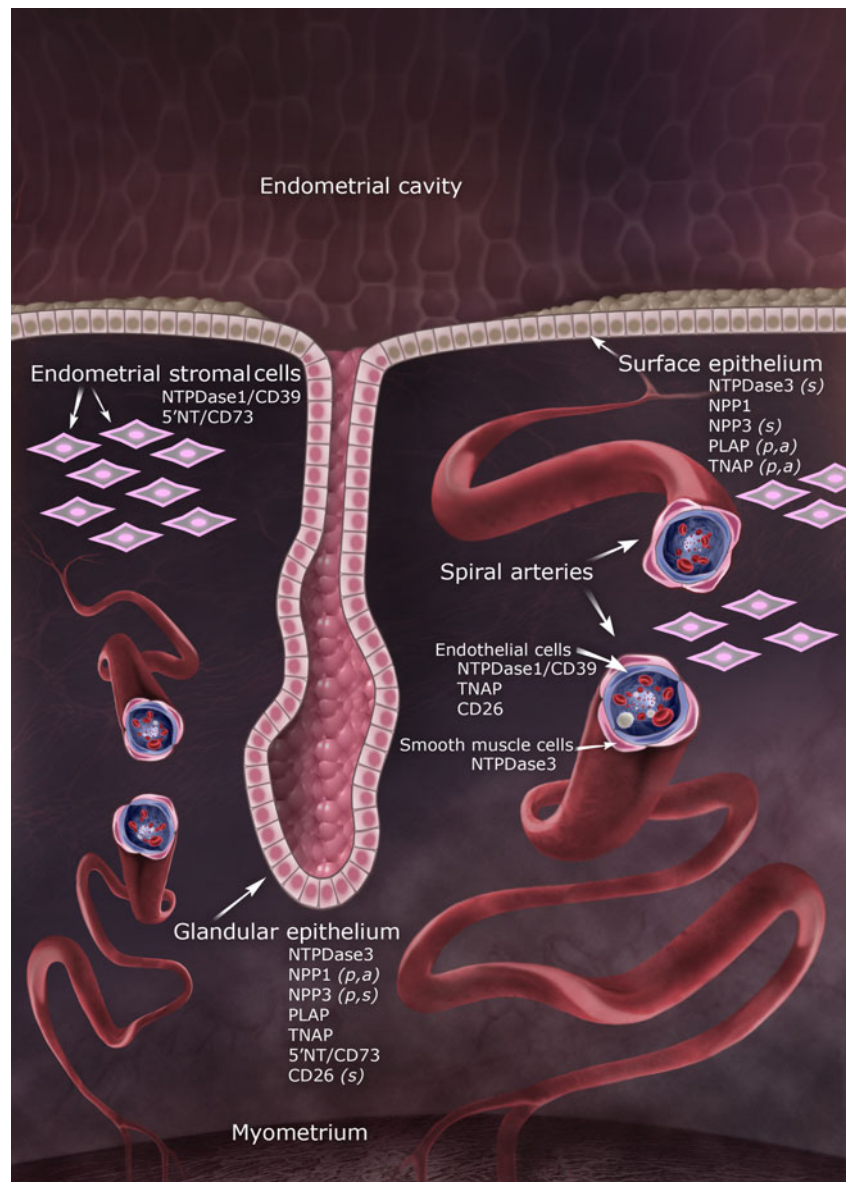
Ecto-5'-nucleotidase, an enzyme efficiently hydrolyzing AMP to adenosine, has already been identified in the mouse female reproductive tract, with marked changes in endometrial expression along the estrous cycle [29], and in pregnancy [28]. Besides a function in the regulation of uterine fluid composition, a role for this enzyme in the generation of extracellular adenosine needed for sperm capacitation has been postulated [39–41]. We show here that in human endometrium ecto-5'-nucleotidase is expressed in glands, with more intensity in the basal layer, and in the stroma, but not in luminal epithelium. The stroma displayed changes in the expression along the cycle, being maximal at the secretory phase. In situ AMPase activity, in the presence or absence of the specific inhibitor α, β -meADP, confirmed that the immunodetected protein was active in the above mentioned structures. Moreover, it is highly probable that the adenosine generated by this AMPase activity and accumulated in the stroma is involved in the regulation of cyclical inflammation physiologically occurring in endometrium [42]. Ecto-5'-nucleotidase might well act sequentially, after NTPDase1, an ecto-nucleotidase also present in the stroma.

NTPDase3 is expressed in luminal and glandular epithelia. NTPDase3 was already identified in other secretory epithelial cells from mouse reproductive organs such as epididymis, prostate and oviducts [27, 43]. We report here for the first time the expression of NTPDase3 in relation to blood vessels. This expression, however, is limited to the muscle layer of spiral arteries, without expression in the myometrial arteries, a fact that enhances the importance of this finding since NTPDase3 can be considered as a new marker of human spiral arteries. Spiral artery remodeling plays a central role in establishing and maintaining a normal pregnancy, and impaired remodeling is involved in common pregnancy disorders such as recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia, a major complication of pregnancy and one of the leading causes of maternal and perinatal morbidity and mortality. In spite of

the obvious importance, very little is known of the mechanisms responsible for this remodeling, and characterizing these arteries phenotypically has important implications for this understanding [44, 45].

The NPP family of enzymes has already been identified in epithelial cells, in relation with ion transport, amongst other functions [24]. Here we see that NPP1 and NPP3 are expressed in glandular epithelia with changes among endometrium types. Interestingly, the expression of both enzymes seems to be coordinated along the cycle; when there is less expression of one enzyme, there is greater expression of the other. Furthermore, NPP3 is exclusively expressed in glandular and luminal epithelia of cyclic endometria showing maximal expression in secretory endometria; NPP3 therefore becomes a biological marker of this type of endometrium. These marked

Fig. 7 Model of the human endometrium showing differential distribution of ecto-enzymes in surface and glandular epithelia, stromal cells and spiral arteries. Letters in parentheses indicate that the enzyme was only detected in proliferative (*p*), secretory (*s*) or atrophic (*a*) endometria



differences between NPP3 expression in cyclic and postmenopausal endometria point to a relation with fertility and further studies would be of interest for human fertility. Moreover, our results demonstrate that NPP3 is a new marker of endometrial tubal metaplasia. This finding is clinically relevant for the diagnostic of this adaptive phenomenon, usually overlapped with pathological changes, and frequently overlooked and misdiagnosed [46].

CD26 has already been identified in female reproductive organs such as the placenta, ovary and endometrium, and a possible role as adhesion molecule in human blastocyst implantation has been proposed [47]. The fact that ecto-ADA is often associated in larger complexes with CD26 leads us to include the study of CD26 expression in the present work. Here we show that CD26 is highly expressed in secretory endometria and that is almost absent in atrophic endometria, also pointing to its possible implication in women fertility.

A simplified overview of our findings, including the different endometrial structures studied, is presented in Fig. 7. This study provides important new information about the regulation of purinergic signaling by ecto-nucleotidases in human endometria, and opens up the field for further investigation of their role in human fertility and in endometrial pathology.

Acknowledgments We thank the Tumour Bank of Hospital Universitari de Bellvitge (IDIBELL's Biobank) and the Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, Barcelona, Spain, for their technical assistance. We thank the Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya (XBTC) sponsored by Pla Director d'Oncologia de Catalunya for their contribution. We also thank Gloria Ganaway for her help with English editing. We are indebted to Oscar Frigola Morencia for the illustration of the endometrium. This study was supported by Instituto de Salud Carlos III grant FIS-PI10/00305 to M. Martín-Satué.

References

- Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S (2011) The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* 124(3–4):229–2362
- Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87(2):659–797
- 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(2):79–83
- Chan HC, Liu CQ, Fong SK, Law SH, Wu LJ, So E, Chung YW, Ko WH, Wong PY (1997) Regulation of Cl⁻ secretion by extracellular ATP in cultured mouse endometrial epithelium. *J Membr Biol* 156(1):45–52
- Wang XF, Chan HC (2000) Adenosine triphosphate induces inhibition of Na⁺ absorption in mouse endometrial epithelium: a Ca²⁺-dependent mechanism. *Biol Reprod* 63(6):1918–1924
- Gorodeski GI, Hopfer U (1995) Regulation of the paracellular permeability of cultured human cervical epithelium by a nucleotide receptor. *J Soc Gynecol Investig* 2(5):716–720
- Arase T, Uchida H, Kajitani T, Ono M, Tamaki K, Oda H, Nishikawa S, Kagami M, Nagashima T, Masuda H, Asada H, Yoshimura Y, Maruyama T (2009) The UDP-glucose receptor P2RY14 triggers innate mucosal immunity in the female reproductive tract by inducing IL-8. *J Immunol* 182(11):7074–7084
- Miyoshi H, Yamaoka K, Urabe S, Kodama M, Kudo Y (2010) Functional expression of purinergic P2X7 receptors in pregnant rat myometrium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(4):R1117–R1124
- Chang SJ, Tzeng CR, Lee YH, Tai CJ (2008) Extracellular ATP activates the PLC/PKC/ERK signaling pathway through the P2Y2 purinergic receptor leading to the induction of early growth response 1 expression and the inhibition of viability in human endometrial stromal cells. *Cell Signal* 20(7):1248–1255
- Bardini M, Lee HY, Burnstock G (2000) Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus. *Cell Tissue Res* 299(1):105–113
- Slater M, Murphy CR, Barden JA (2002) Purinergic receptor expression in the apical plasma membrane of rat uterine epithelial cells during implantation. *Cell Calcium* 31(5):201–207
- Vasudevan K, Sztejn JM (2011) Treatment of sperm with extracellular adenosine 5'-triphosphate improves the in vitro fertility rate of inbred and genetically modified mice with low fertility. *Theriogenology* 76(4):729–736
- Rodríguez-Miranda E, Buffone MG, Edwards SE, Ord TS, Lin K, Sammel MD, Gerton GL, Moss SB, Williams CJ (2008) Extracellular adenosine 5'-triphosphate alters motility and improves the fertilizing capability of mouse sperm. *Biol Reprod* 79(1):164–171
- Edwards SE, Buffone MG, Kneee GR, Rossato M, Bonanni G, Masiero S, Ferasin S, Gerton GL, Moss SB, Williams CJ (2007) Effects of extracellular adenosine 5'-triphosphate on human sperm motility. *Reprod Sci* 14(7):655–666
- 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(2):155–168
- Gillman TA, Pennefather JN (1998) Evidence for the presence of both P1 and P2 purinoceptors in the rat myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25(7–8):592–599
- 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(2):286–292
- Fraser LR (2008) The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology* 70(8):1356–1359
- Schuh SM, Hille B, Babcock DF (2007) Adenosine and catecholamine agonists speed the flagellar beat of mammalian sperm by a non-receptor-mediated mechanism. *Biol Reprod* 77(6):960–969
- Zimmermann H, Zebisch M, Strater N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8(3):437–502
- Kukulski F, Lévesque SA, Sévigny J (2011) Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol* 61:263–299
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2(2):409–430
- Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783(5):673–694
- Stefan C, Jansen S, Bollen M (2006) Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal* 2(2):361–370
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2(2):351–360
- Millán JL (2006) Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal* 2(2):335–341
- Martín-Satué M, Lavoie EG, Pelletier J, Fausther M, Cszimadia E, Guckelberger O, Robson SC, Sévigny J (2009) Localization of

- plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* 131(5):615–628
28. Bucci M, Murphy CR (1999) Differential alterations in the distribution of three phosphatase enzymes during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells in the rat. *Cell Biol Int* 23(1):21–30
 29. 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
 30. 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
 31. Schelstraete K, Deman J, Vermeulen FL, Strijckmans K, Vandecasteele C, Slegers G, De Schryver A (1985) Kinetics of 13 N-ammonia incorporation in human tumours. *Nucl Med Commun* 6(8):461–470
 32. Kajiyama H, Kikkawa F, Ino K, Shibata K, Mizutani S (2003) Expression of CD26/dipeptidyl peptidase IV in endometrial adenocarcinoma and its negative correlation with tumor grade. *Adv Exp Med Biol* 524:245–248
 33. Bansode FW, Chauhan SC, Makker A, Singh MM (1998) Uterine luminal epithelial alkaline phosphatase activity and pinopod development in relation to endometrial sensitivity in the rat. *Contraception* 58(1):61–68
 34. Weitlauf H (1994) Biology of implantation. In: Knobil E, Neil JD (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 391–440
 35. Emadi SM, Salehnia M (2004) Localization and activity of mouse endometrial alkaline phosphatase after hyperstimulation and progesterone injection at the implantation time. *Iran Biomed J* 8(3):6
 36. Bersinger NA, Wunder DM, Birkhauser MH, Mueller MD (2008) Gene expression in cultured endometrium from women with different outcomes following IVF. *Mol Hum Reprod* 14(8):475–484
 37. Davies JO, Howe K, Stirrat GM, Sunderland CA (1985) Placental alkaline phosphatase in benign and malignant endometrium. *Histochem J* 17(5):605–612
 38. Sobiesiak M, Sivasubramaniyan K, Hermann C, Tan C, Orgel M, Trembl S, Cerabona F, de Zwart P, Ochs U, Muller CA, Gargett CE, Kalbacher H, Buhring HJ (2010) The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. *Stem Cell Dev* 19(5):669–677
 39. Monks NJ, Fraser LR (1988) Inhibition of adenosine-metabolizing enzymes modulates mouse sperm fertilizing ability: a changing role for endogenously generated adenosine during capacitation. *Gamete Res* 21(3):267–276
 40. Monks NJ, Fraser LR (1988) Enzymes of adenosine metabolism in mouse sperm suspensions. *J Reprod Fertil* 83(1):389–399
 41. Takayama T, Matsubara S, Shibahara H, Minakami H, Takizawa T, Sato I (2000) Ultracytochemical localization of 5'-nucleotidase activity in human ejaculated spermatozoa. *Int J Androl* 23(2):106–108
 42. Maybin JA, Critchley HO, Jabbour HN (2011) Inflammatory pathways in endometrial disorders. *Mol Cell Endocrinol* 335(1):42–51
 43. Martín-Satué M, Lavoie EG, Fausther M, Lecka J, Aliagas E, Kukulski F, Sévigny J (2010) High expression and activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the male murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* 133(6):659–668
 44. Elia A, Charalambous F, Georgiades P (2011) New phenotypic aspects of the decidual spiral artery wall during early post-implantation mouse pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 416(1–2):211–216
 45. Whitley GS, Cartwright JE (2010) Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* 31(6):465–474
 46. Nicolae A, Preda O, Nogales FF (2010) Endometrial metaplasias and reactive changes: a spectrum of altered differentiation. *J Clin Pathol* 64(2):97–106
 47. Shimomura Y, Ando H, Furugori K, Kajiyama H, Suzuki M, Iwase A, Mizutani S, Kikkawa F (2006) Possible involvement of cross-talk cell-adhesion mechanism by endometrial CD26/dipeptidyl peptidase IV and embryonal fibronectin in human blastocyst implantation. *Mol Hum Reprod* 12(8):491–495

CAPÍTOL 3

High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors

Aliagas E, Vidal A, Texidó L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M.

Mediators of Inflammation

2014;2014:509027.

Supplementary material at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/509027>

CAPÍTOL 3. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. Mediat Inflamm. 2014;2014:509027.

Una de les estratègies utilitzades pels tumors que els permet evadir-se del sistema immunitari és l'acumulació d'adenosina extracel·lular, degut als seus efectes immunosupressors i promotors del creixement tumoral. L'estudi dels mecanismes que dirigeixen la formació d'adenosina a l'interstici tumoral són, per tant, de gran interès en oncologia. En els tumors, la principal via metabòlica implicada en la generació d'adenosina extracel·lular és la desfosforilació de l'ATP per part de les ecto-nucleotidases. Dos d'aquests enzims, CD39 i CD73, actuen de manera seqüencial hidrolitzant eficaçment l'ATP fins a adenosina. S'ha posat de manifest la seva importància com a dianes terapèutiques en diferents tipus de càncer, però no hi havia dades referents al càncer d'endometri, sent aquest el càncer més freqüent de l'aparell genital femení. L'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar l'expressió de CD39 i CD73 al càncer d'endometri.

Per dur a terme aquest estudi, es va analitzar l'expressió gènica i proteica, així com l'activitat enzimàtica de CD39 i CD73 en talls histològics, homogenats de teixit i improntes de mostres humanes d'adenocarcinoma endometriode (Tipus I) i serós (Tipus II) i les respectives mostres d'endometri no patològic, a través de tècniques moleculars, immunològiques i d'activitat enzimàtica *in situ*.

Les principals troballes relacionades amb aquesta investigació són:

- 1) **Expressió i activitat de CD39 a l'endometri tumoral humà amb adenocarcinoma endometrial Tipus I i Tipus II.** L'expressió de CD39 es troba augmentada a les cèl·lules de l'estroma dels tumors Tipus I i Tipus II, en comparació amb els endometris no tumorals corresponents (veure **capítol 3, Figura 1**). A més, l'activitat ADPàsica *in situ* detectada en els tumors, es més elevada en el de Tipus II (serós), sent aquest el tumor de major grau de malignitat (veure **capítol 3, Figures 2a i 2b**).
- 2) **Expressió i activitat de CD73 a l'endometri tumoral humà amb adenocarcinoma endometrial Tipus I i Tipus II.** CD73 s'expressa fortament a les cèl·lules de l'estroma i de l'epiteli glandular en ambdós tipus de tumors, on l'activitat AMPàsica *in situ* detectada és també elevada (veure **capítol 3, Figura 3a**)
- 3) **Validació de les improntes en els estudis d'activitat enzimàtica.** Els resultats dels experiments d'immunofluorescència i d'activitat enzimàtica *in situ* obtinguts amb les improntes coincideixen

amb els obtinguts amb les seccions histològiques, validant així, la utilitat de les emprentes en aquest tipus d'estudis (veure **capítol 3, Figures 2c i 3b, i Figures suplementàries 1 i 2**).

Aquests resultats confirmen la implicació del sistema adenosinèrgic en el càncer d'endometri, i emfatitzen la rellevància de les ecto-nucleotidases com a dianes terapèutiques en oncologia.

Aquest estudi es troba publicat a la revista **Mediators of Inflammation**. **2014;2014:509027**.doi: [10.1155/2014/509027](https://doi.org/10.1155/2014/509027). Factor d'impacte: **2.417** (JCR2013). Aquest treball no ha estat utilitzat per a la realització d'altres tesis doctorals. Pel què fa als autors que han participat en aquest treball, L.T ha realitzat els estudis genètics. A.V i E.C han dut a terme el processament postquirúrgic i la classificació histològica de les mostres. J.P ha realitzat les intervencions quirúrgiques. A.V, L.T, E.A i M.M.S han participat en la discussió dels resultats i en el disseny del manuscrit. E.A ha realitzat els experiments. M.M.S ha dirigit el treball.

Research Article

High Expression of Ecto-Nucleotidases CD39 and CD73 in Human Endometrial Tumors

Elisabet Aliagas,¹ August Vidal,^{1,2,3} Laura Teixidó,¹ Jordi Ponce,^{2,4}
Enric Condom,^{1,2,3} and Mireia Martín-Satué^{1,2}

¹ *Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Pavelló de Govern, 4a Planta, Lab. 4145, C/Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain*

² *Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Barcelona, Spain*

³ *Servei d'Anatomia Patològica, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain*

⁴ *Servei de Ginecologia, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain*

Correspondence should be addressed to Mireia Martín-Satué; martinsatue@ub.edu

Received 19 November 2013; Revised 25 December 2013; Accepted 8 January 2014; Published 24 February 2014

Academic Editor: Graça Ferreira-Dias

Copyright © 2014 Elisabet Aliagas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

One of the strategies used by tumors to evade immunosurveillance is the accumulation of extracellular adenosine, which has immunosuppressive and tumor promoting effects. The study of the mechanisms leading to adenosine formation at the tumor interstitium are therefore of great interest in oncology. The dominant pathway generating extracellular adenosine in tumors is the dephosphorylation of ATP by ecto-nucleotidases. Two of these enzymes acting sequentially, CD39 and CD73, efficiently hydrolyze extracellular ATP to adenosine. They have been found to play a crucial role in a variety of tumors, but there were no data concerning endometrial cancer, the most frequent of the invasive tumors of the female genital tract. The aim of the present work is to study the expression of CD39 and CD73 in human endometrial cancer. We have analyzed protein and gene expression, as well as enzyme activity, in type I endometrioid adenocarcinomas and type II serous adenocarcinomas and their nonpathological endometrial counterparts. High levels of both enzymes were found in tumor samples, with significantly increased expression of CD39 in type II serous tumors, which also coincided with the higher tumor grade. Our results reinforce the involvement of the adenosinergic system in cancer, emphasizing the relevance of ecto-nucleotidases as emerging therapeutic targets in oncology.

1. Introduction

Extracellular adenosine concentration increases under metabolically stressful conditions, notably in the tumor microenvironment [1], where hypoxia is frequently given [2, 3]. Such accumulation of adenosine mediates, through four distinct receptors (A1, A2A, A2B, and A3), complex and diverse effects that lead to tumor immunoescape [4]. This includes cytoprotection and growth promotion of tumor cells [5, 6], angiogenesis increase [7, 8], and suppression of effector (antitumor) T cells [9].

Although cells are provided with adenosine transporters, the main source of this nucleoside in the tumor interstitium is the hydrolysis of extracellular ATP, which also accumulates in

tumors, by membrane enzymes known as ecto-nucleotidases [6, 10]. Different families of these enzymes, acting extracellularly, are responsible for the generation of adenosine from adenine nucleotides (i.e., ATP, ADP, or AMP): (1) the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family, that includes four plasma membrane-bound members: NTPDase1 (CD39), NTPDase2, NTPDase3, and NTPDase8; these enzymes are differentially expressed and hydrolyze with different affinities nucleoside triphosphates and diphosphates to their monophosphate derivatives (e.g., ATP and ADP to AMP); (2) the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) family, capable of hydrolyzing nucleoside triphosphates to monophosphates and pyrophosphate (PPi), such as ATP to AMP and PPi;

(3) the alkaline phosphatase (AP) family, that includes ubiquitous enzymes degrading broad range of substrates, such as adenine nucleotides and PPI, releasing inorganic phosphate (Pi); (4) the 5'-nucleotidase family, with only one member attached to the outer plasma membrane, the ecto-5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl phosphatidylinositol-linked membrane-bound glycoprotein that efficiently hydrolyses AMP to adenosine [11–13].

Two members of ecto-nucleotidases families, the E-NTPDase CD39 and the 5'-nucleotidase CD73, acting sequentially, seem to have a crucial role in tumor-immune cell interaction [6]. They both are expressed not only by infiltrating immune cells but also by tumor cells, and their expression is regulated by hypoxia [10, 14]. Increased CD39 and CD73 expression has been described in various cancer types, mostly in correlation with a poor prognosis [15–17]. Both molecules are considered promising therapeutic targets in oncology, and CD73 has already been proven to inhibit tumor growth and metastasis in a breast cancer model in mice [18–20]. However, until now there were not available data concerning ecto-nucleotidases expression in endometrial cancer (EC). EC is the most frequent of the invasive tumors of the female genital tract. There are two clinicopathological variants: the estrogen-related, type I, endometrioid carcinoma, and the nonestrogen-related, type II, nonendometrioid carcinoma [21]. Although there are different molecular alterations that have been already identified in EC, with different prevalence between tumors [22, 23], there is need to decipher the complete molecular profile of EC pathogenesis to improve diagnosis and favor the design of new therapeutic strategies.

The aim of the present work was to study the expression of CD39 and CD73 in endometrioid (type I) and serous (type II) EC when compared with nontumoral endometrium. To achieve this objective, protein and gene expression experiments, as well as *in situ* enzyme activity assays, were performed on human endometrial adenocarcinoma samples and their nontumoral endometrial counterparts.

2. Materials and Methods

2.1. Samples. The ethical principles of this study adhere to the Declaration of Helsinki, and all the procedures were approved by the ethics committee for clinical investigation of Bellvitge Hospital. Endometrial samples from adenocarcinoma (endometrioid and serous types) and their corresponding nontumoral tissue (if present) were obtained from hysterectomy specimens at the Service of Gynecology of Bellvitge Hospital. Fresh samples were cut, embedded in O.C.T. freezing media (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands), snap-frozen in a Shandon Histobath 2 (Neslab Instruments Inc., USA) at the Service of Pathology, and stored at -80°C until used. Alternatively, endometrial samples were obtained from the Tumor Bank of Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL).

Fifteen endometrioid adenocarcinomas (13 grade 1, 2 grade 2; all FIGO stage I) (56–82 years old, median 61) and fourteen serous adenocarcinomas (grade 3; 9 FIGO stage I, 2 FIGO stage II, and 3 FIGO stage IV) (63–86 years old, median

77), and their adjacent nontumoral endometrium were used in this study.

2.2. Endometrial Touch Prep Technique. Touch preparations of endometrial cancer tissue samples were obtained by lightly pressing the freshly cut tumor surface on clean glass microscope slides, thus generating a tumor cell imprint. Imprints were immediately air-dried and stored at -20°C until further processing. Six endometrioid adenocarcinoma tissue samples were used to generate the touch preparations.

2.3. Immunolabeling Experiments. Immunohistochemistry and immunofluorescence experiments were performed as previously described for human endometrial samples [24]. Briefly, tissue sections of $10\ \mu\text{m}$ thick and touch preparations were fixed in 10% phosphate-buffered formalin mixed with cold acetone (Merck, Darmstadt, Germany) for 2.5 minutes. Fixed samples were rinsed with PBS and preincubated for 1 hour at room temperature (RT) with PBS containing 20% normal goat serum (Gibco, Paisley, UK) and 0.2% gelatin (Merck). Samples were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-human CD39 clone BU61 (Ansell Corporation, Minnesota, MN, USA) at 1/500, mouse monoclonal anti-human ecto-5'-nucleotidase (CD73) clone 4G4 (Abcam, Cambridge, UK) at 1/50, and rabbit monoclonal anti-human cytokeratin 19 (CK19) clone EPRI579Y (Abcam) at 1/200. After three washes in PBS, samples were incubated for 1 hour at RT with the appropriate secondary antibodies: horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (EnVision + system; DAKO, Carpinteria, USA), Alexa Fluor 488- or 555-goat anti-mouse or anti-rabbit (Life Technologies, Paisley, UK). Secondary antibody alone was routinely included as control for the experiments. Nuclei were counterstained with haematoxylin or, alternatively, in fluorescence assays, To-Pro-3 or DAPI (Life Technologies) were used to visualize the nuclei. Samples were mounted with Fluoromount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, MO, USA). The results were observed and photographed under a light Leica DMD 108 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) or, in fluorescence assays, under a Nikon Eclipse E-800 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) or under a Leica TCS-SL spectral confocal microscope (Leica).

Results from both tissue samples and touch preparations were independently evaluated by at least two observers. Staining distribution was recorded. Label intensity was scored as negative (–), intermediate (+), or strongly positive (++)

2.4. In Situ Enzyme Activity Experiments. For enzyme histochemistry, ADPase and ecto-5'-nucleotidase (AMPase) activities were localized by using the Wachstein/Meisel lead phosphate method [24, 25] in tissue samples and in touch preparations. Briefly, fixed samples were preincubated for 1 hour at RT in 50 mM Tris-maleate buffer, pH 7.4 containing 2 mM CaCl_2 and 0.25 M sucrose. Enzyme reaction was carried out for 1 hour at 37°C in the same buffer supplemented with 5 mM MnCl_2 , 2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 3% Dextran T250, and 2.5 mM levamisole, as inhibitor of alkaline phosphatases, and

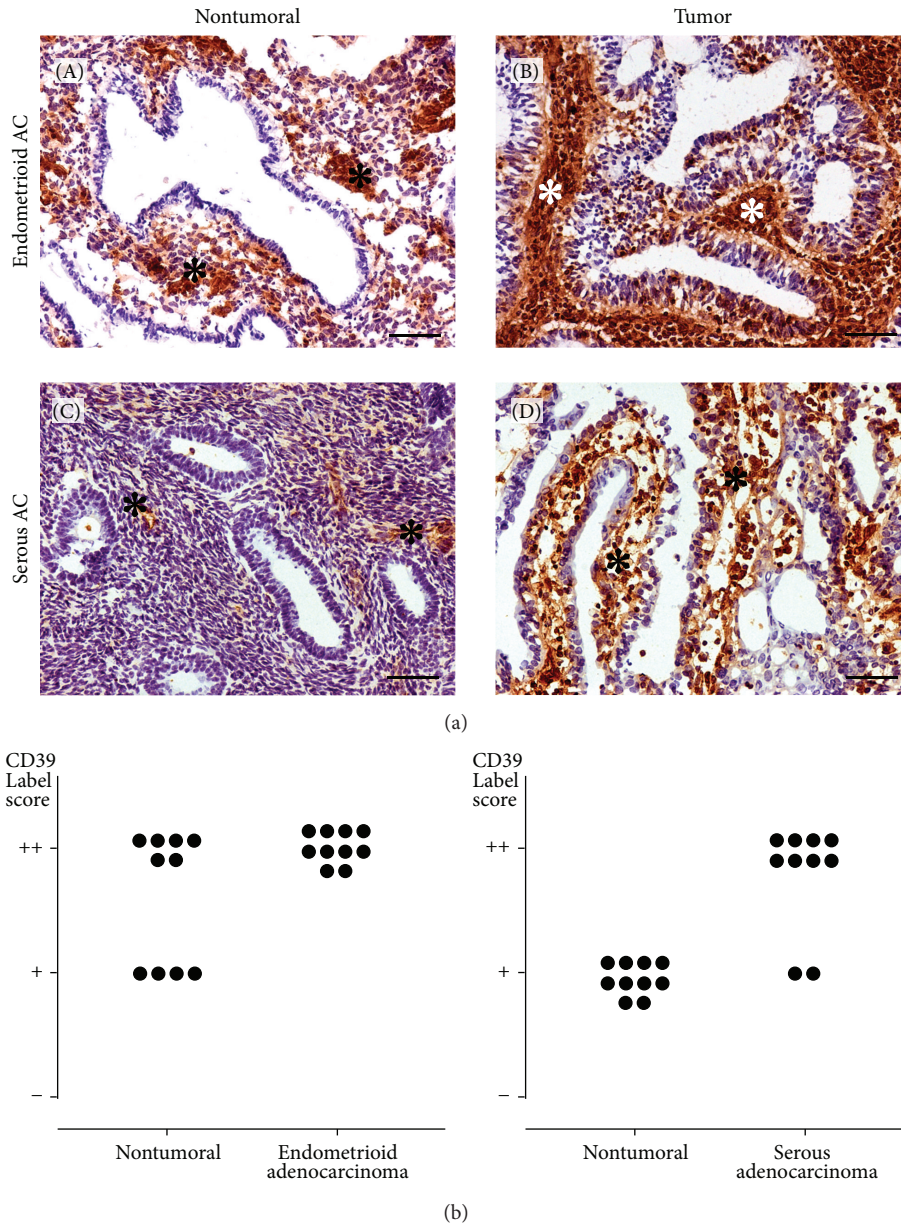


FIGURE 1: (a) Immunolocalization of NTPDase1/CD39 in nontumoral human endometria ((A), (C)) and in endometrioid (B) and serous (D) adenocarcinomas. CD39 was immunodetected in the stroma of all samples (asterisks). The expression of CD39 is remarkably higher in tumors when compared with nontumoral endometria. Scale bars = 100 μm. (b) Label intensity score of CD39 in the stroma of nontumoral human endometrium compared to endometrioid (left plot) and serous (right plot) adenocarcinoma samples. Note that both types of tumors have a higher label score than their corresponding nontumoral endometria.

in the presence of 200 μM ADP or 1 mM AMP, as substrate. For CD39 and CD73 inhibition experiments, 1 mM NF279 (Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom) and 1 mM α, β-meADP (Sigma-Aldrich) were added, respectively, to both preincubation and enzyme reaction buffers. Control assays were performed in the absence of nucleotide. The reaction was revealed by incubating with 1% (NH₄)₂S v/v for exactly 1 minute. Samples were counterstained with haematoxylin, mounted with Fluoromount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich), and observed and photographed as described above.

2.5. Isolation of Membrane Enriched Fraction from Tissue Homogenates. 50–100 μg of human tumor (endometrioid and serous endometrial adenocarcinoma) and nontumoral tissue samples were homogenized in a buffer containing 20 mM Hepes, 250 mM sucrose, 0.3 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl₂ (pH 7.4) using a glass homogenizer (VidraFoc, Barcelona, Spain). After homogenization, samples were centrifuged at 600 ×g for 10 minutes at 4°C in a Beckman JA-20 centrifuge. The pellet was discarded and supernatants were centrifuged at 48,000 ×g for 20 minutes at 4°C in a Beckman TI-70 centrifuge. The resulting pellets were

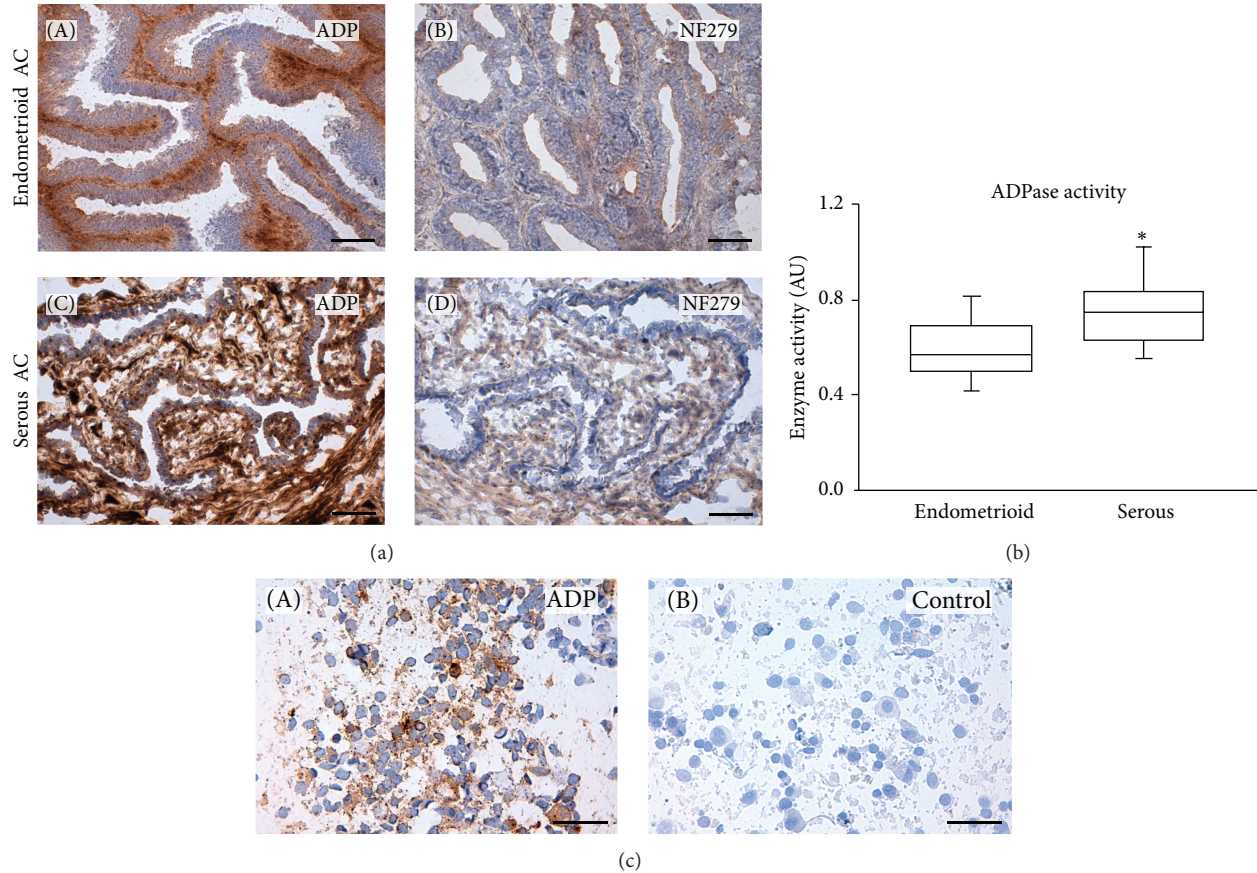


FIGURE 2: (a) Enzyme *in situ* histochemistry in endometrioid ((A), (B)) and in serous ((C), (D)) endometrial adenocarcinomas in the presence of ADP as substrate, alone ((A), (C)) or together with the inhibitor NF279 ((B), (D)). Strong ADPase activity was detected in the stroma of both types of tumors (A), (C) dark brown deposits), while the activity was drastically reduced in the presence of the inhibitor ((B), (D)). Scale bars = 100 μ m. (b) ADPase enzyme activity in tissue homogenates of endometrioid ($n = 12$) and serous ($n = 14$) adenocarcinomas. Experiments were performed in triplicate for each sample. Data are represented in arbitrary units (AU). *Significant differences at $P < 0.05$. (c) ADPase *in situ* activity in endometrial touch preparations from human endometrioid adenocarcinomas using ADP as substrate (A) and in the absence of substrate (B). Scale bars = 50 μ m.

resuspended in a buffer containing 20 mM Hepes, 0.3 mM PMSF, and 1 mM DTT (pH 7.4). Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. [26] using bovine serum albumin as a standard. Samples were kept at -80°C until use.

2.6. Enzyme Activity Assays in Plasma Membrane Enriched Tissue Homogenates. ADPase and AMPase activities were determined by measuring the amount of Pi using the malachite green colorimetric assay, as previously described [27].

2.7. Quantitative Real-Time PCR. Total RNA from endometrial tumor tissue samples was isolated using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's protocol. Total isolated RNA (2 μ g) was reversely transcribed into complementary DNA (cDNA) using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Thermo Scientific, Chicago, IL, USA).

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to examine the expression of *CD39*, *NTPDase2*, and *CD73*

genes. Designed large-scale TaqMan low-density array (TLDA) microfluidic cards (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used. The 384 wells of each card were preloaded with predesigned fluorogenic TaqMan probes and primers for *CD39*, *NTPDase2*, and *CD73*. cDNA (1 μ g) combined with TaqMan 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) were loaded into each sample-loading port. qRT-PCR reactions were carried out using the ABI PRISM 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Data were collected using the SDS v2.1 software (Applied Biosystems) and analyzed by the comparative Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) quantification method using the Expression Suite v1.0 software (Applied Biosystems). The relative expression levels of *CD39*, *NTPDase2*, and *CD73* genes were determined using 18S mRNA as an endogenous control for normalization. Results are expressed as the mean of the relative quantification (RQ) of the tested transcripts ($n = 7$ serous adenocarcinoma samples; $n = 7$ endometrioid adenocarcinoma samples) \pm the standard error of the mean (SEM). Results were obtained from five independent experiments performed using 1 μ g of cDNA,

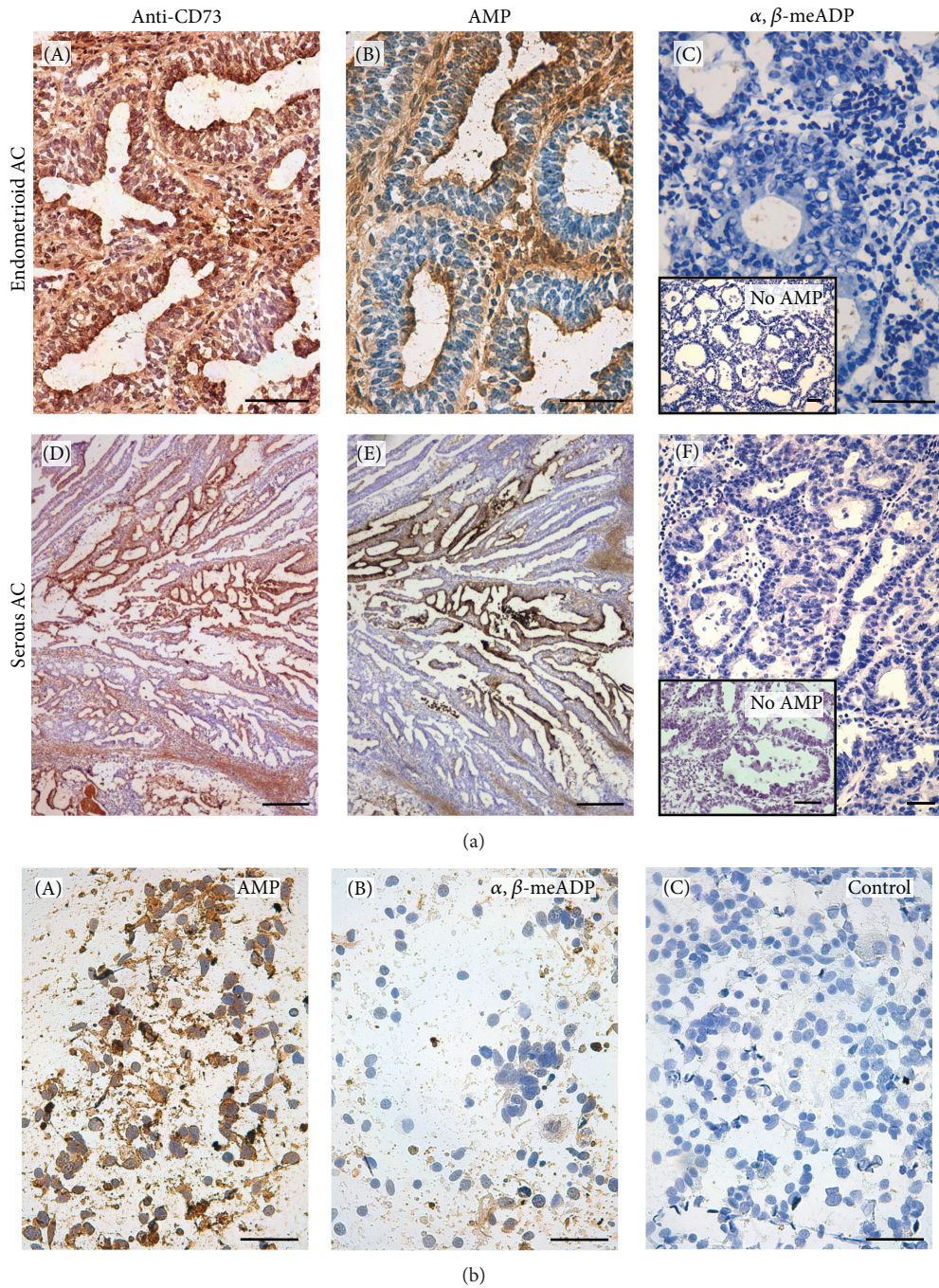


FIGURE 3: (a) Immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase/CD73 ((A), (D)) and AMPase *in situ* histochemistry ((B), (C), (E), and (F)) in endometrioid ((A)–(C)) and serous ((D)–(F)) endometrial adenocarcinomas. CD73 was immunodetected in glandular epithelial cells and in the stroma of both types of adenocarcinomas ((A), (D)). The AMPase activity mirrors the immunolocalization ((B), (E)). The activity was abolished in the presence of α, β -meADP ((C), (F)). Insets correspond to control experiments performed in the absence of nucleotide (no AMP). Scale bars = 50 μ m ((A)–(C), (F), insets) and 250 μ m ((D), (E)). (b) AMPase *in situ* activity by enzyme histochemistry in endometrial touch preparations. Dark precipitates in (A) correspond to the AMPase activity in the presence of AMP as substrate. The inhibitor α, β -meADP completely abolished this activity (B). Control experiments were performed in the absence of substrate (C). Scale bars = 50 μ m.

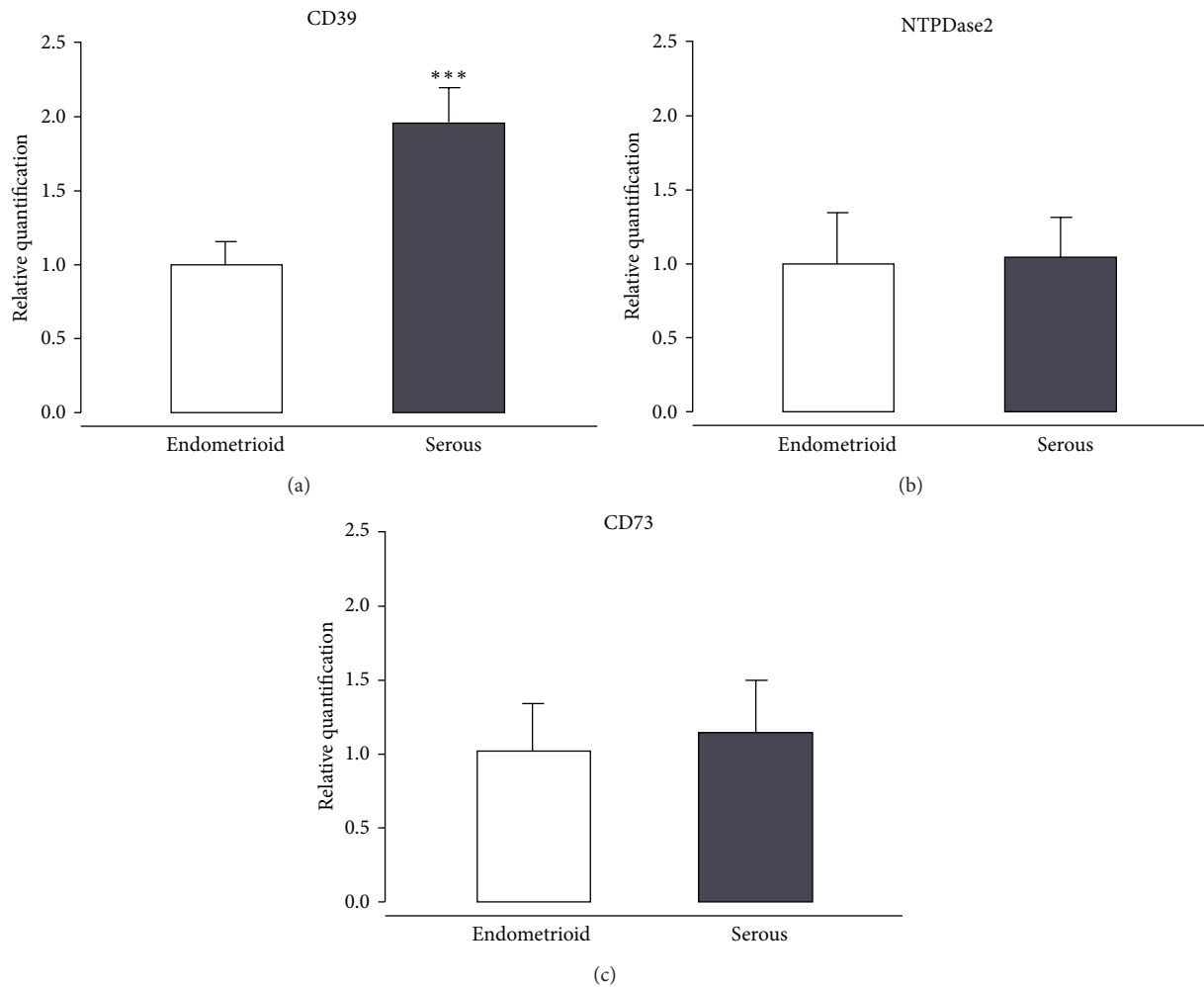


FIGURE 4: *CD39*, *NTPDase2*, and *CD73* gene expression in human endometrial cancer tissues. Relative mRNA levels of *CD39* (a), *NTPDase2* (b), and *CD73* (c) analyzed in serous adenocarcinomas ($n = 7$), normalized to *18S* mRNA levels, and expressed as fold change over endometrioid adenocarcinomas ($n = 7$). Data are expressed as mean \pm SEM. ***Significantly different from endometrioid ($P < 0.001$).

all with duplicate measurements. No signal was detected in nontemplate controls.

2.8. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using SigmaStat 3.2 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values are reported as the mean \pm S.E.M. Student's *t*-test was used to compare the means of two independent groups of normally distributed data.

3. Results and Discussion

Extracellular adenosine in tumors, mainly generated by the sequential action of ecto-nucleotidases, has immunosuppressive effects through a broad range of actions, including inhibition of antitumor T-cell function, modification of local interleukin levels, and inhibition of phagocytosis (reviewed in [28]). In this section we show and discuss our results on

the expression of the ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in type I and type II endometrial carcinomas.

CD39 was immunolocalized in the stroma of both nontumoral and tumoral endometria (Figure 1(a)). For the nonpathological endometrium the expression of CD39 has already been previously described in association with stromal cells and blood vessels [24]. Here we show that label score was significantly higher for both endometrioid and serous types of tumors when compared with the corresponding nontumoral coexisting endometrium (Figure 1(b)). No CD39 labeling was found in endometrial adenocarcinoma epithelia, as demonstrated with the double staining performed with the anti-CD39 and anti-CK19 antibodies (see Supplementary Figure 1 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/509027>).

Strong *in situ* ADPase activity was detected in the tumor stroma, coinciding with the CD39 immunolocalization (Figure 2(a)). This activity was drastically reduced with the NTPDase inhibitor NF279, demonstrating its specificity. Equivalent results were obtained using ATP as substrate

for the *in situ* activity assay (not shown). ADPase activity measured in tumor tissue homogenates demonstrated that serous (grade 3) adenocarcinomas had significantly higher activity than endometrioid (grade 1) adenocarcinomas (Figure 2(b)).

CD73 expression was strongly immunodetected in both types of tumors, in epithelial structures and in the stroma (Figure 3(a)), thus partially colocalizing with CK19 (Supplementary Figure 2). Specific CD73 activity, demonstrated with the inhibitor α , β -meADP, matched the immunolabeled structures (Figure 3(a)). We have already previously demonstrated that the expression and activity of CD73 are abundant in nonpathological endometrium [24, 25]. Consequently, due to the high expression of CD73 in tumoral and nontumoral endometria, label score comparisons were not possible. Moreover, no differences among tumors were observed with the enzyme assays either in tissue slices or in tissue homogenates (not shown).

Immunolabeling and *in situ* enzyme activity results obtained with the touch prep technique were equivalent to those obtained with tissue slices (Figures 2(c) and 3(b)). The usefulness of the touch prep technique for diagnosis has already been demonstrated in breast cancer with 100% sensitivity and specificity in the evaluation of tumor margins at the time of the surgery [29]. This technique has also been previously used to demonstrate by immunolabeling a decreased expression of P2X7 ATP receptor in endometrial cancer cells [30] and also, recently, the relationship between p53 expression and the tumor grade [31]. However, to our knowledge, this is the first report validating the use of touch preps for enzyme activity studies, therefore opening the possibility of performing such studies in cytological samples.

In order to determine if the differences in CD39 protein and ADPase activity between tumor types also involved gene expression changes, quantitative real-time PCR analyses were performed (Figure 4). *CD39* gene expression was 2-fold higher in serous endometrial adenocarcinoma than in endometrioid, coinciding with the data obtained with the protein (Figure 4(a)). These gene expression changes did not apply to *NTPDase2* (Figure 4(b)), indicating that *CD39* upregulation is not a general feature of other members of NTPDase family. No changes were detected in *CD73* gene expression between the two tumor types (Figure 4(c)).

These results on endometrial tumors add to the list of human cancers in which CD39 is overexpressed and support the growing body of evidence that CD39 is a potential therapeutic target for cancer immunotherapy [18]. Our results also reinforce the relevance of CD73 in tumors. Antibody-based therapy and pharmacological approaches against CD73 have been reported to significantly inhibit tumor growth and improve antitumor immunity in mouse models [28, 32].

4. Conclusions

Endometrial adenocarcinoma tumors have significantly higher CD39 expression and activity than their nontumoral counterparts. Moreover, stronger activities are associated

with type II serous tumors. This also coincides with the higher grade of these tumors, but further studies are needed to establish statistical correlations with the tumor grade in the case of type I endometrioid tumors. The consequences of this high CD39 activity in endometrial tumors are increased levels of AMP, the substrate for CD73, and also highly expressed in these tumors, which will, in turn, generate increased immunosuppressive levels of extracellular adenosine.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank the Tumour Bank of Hospital Universitari de Bellvitge (IDIBELL's Biobank) and the Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge, Barcelona, Spain, for their technical assistance. The authors also thank Gloria Gannaway for her help with English editing and Professor Lluís Jover Armengol for his help with statistics. This study was supported by Instituto de Salud Carlos III (Grant FIS-PII0/00305) to Mireia Martín-Satué and by Generalitat de Catalunya (Grant SGR2009/152).

References

- [1] J. Blay, T. D. White, and D. W. Hoskin, "The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine," *Cancer Research*, vol. 57, no. 13, pp. 2602–2605, 1997.
- [2] M. V. Sitkovsky, J. Kjaergaard, D. Lukashev, and A. Ohta, "Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 19, pp. 5947–5952, 2008.
- [3] J. C. Becker, M. H. Andersen, D. Schrama, and P. T. Straten, "Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 62, no. 7, pp. 1137–1148, 2013.
- [4] S. Merighi, P. Mirandola, K. Varani et al., "A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 100, no. 1, pp. 31–48, 2003.
- [5] P. Zhou, X. Zhi, T. Zhou et al., "Overexpression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix," *Cancer Biology & Therapy*, vol. 6, no. 3, pp. 426–431, 2007.
- [6] F. Ghiringhelli, M. Bruchard, F. Chalmin, and C. Rebe, "Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, Article ID 473712, 9 pages, 2012.
- [7] I. Feoktistov, S. Ryzhov, H. Zhong et al., "Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype," *Hypertension*, vol. 44, no. 5, pp. 649–654, 2004.
- [8] B. Allard, M. Turcotte, K. Spring, S. Pommey, I. Royal, and J. Stagg, "Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis," *International Journal of Cancer*, vol. 134, no. 6, pp. 1466–1473, 2014.

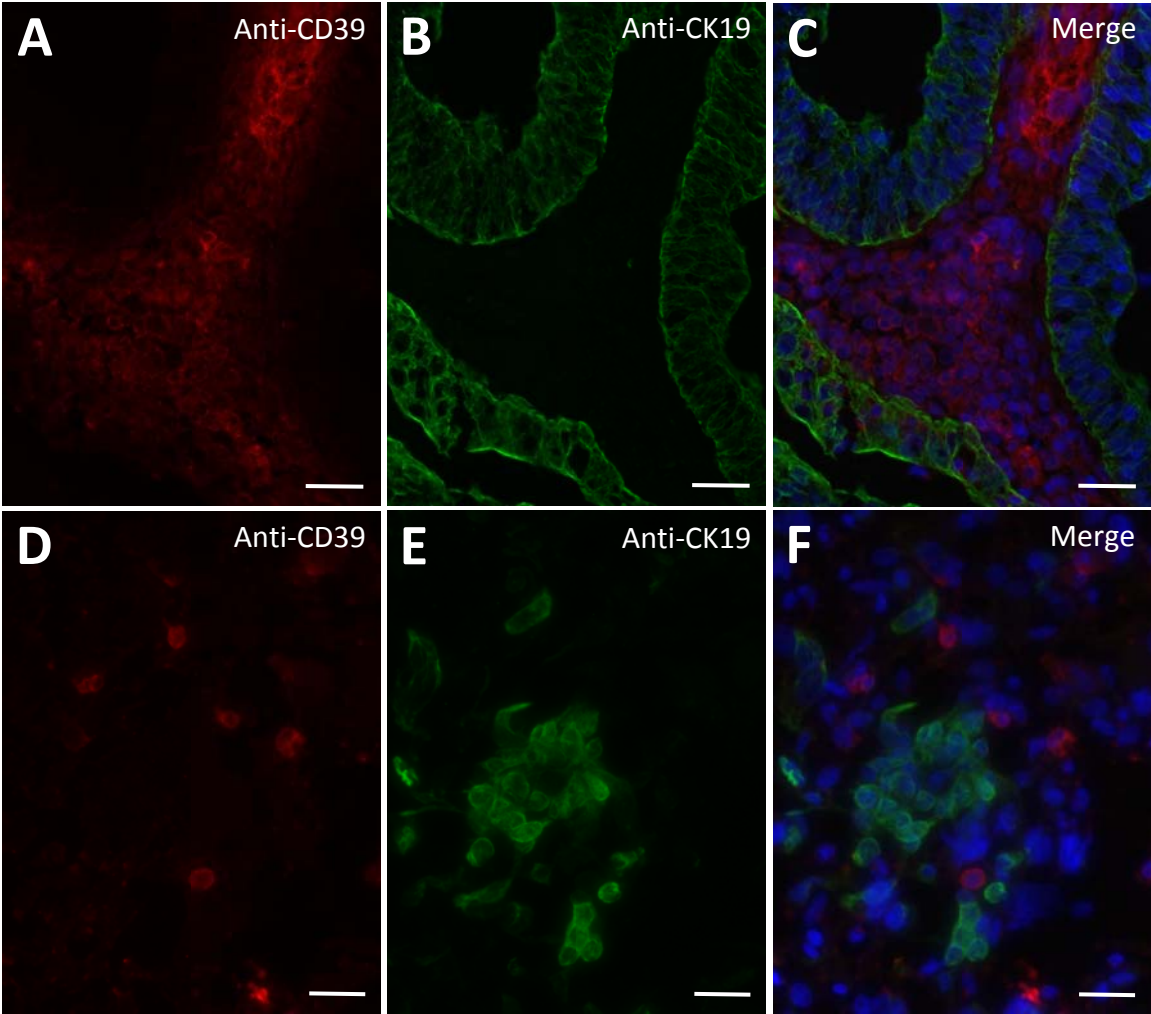
- [9] A. Ohta, E. Gorelik, S. J. Prasad et al., "A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 35, pp. 13132–13137, 2006.
- [10] M. S. Longhi, S. C. Robson, S. H. Bernstein, S. Serra, and S. Deaglio, "Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 91, no. 2, pp. 165–172, 2013.
- [11] S. C. Robson, J. Sévigny, and H. Zimmermann, "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance," *Purinergic Signalling*, vol. 2, no. 2, pp. 409–430, 2006.
- [12] G. G. Yegutkin, "Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1783, no. 5, pp. 673–694, 2008.
- [13] H. Zimmermann, M. Zebisch, and N. Sträter, "Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases," *Purinergic Signalling*, vol. 8, no. 3, pp. 437–502, 2012.
- [14] H. K. Eltzschig, D. Köhler, T. Eckle, T. Kong, S. C. Robson, and S. P. Colgan, "Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection," *Blood*, vol. 113, no. 1, pp. 224–232, 2009.
- [15] J. Stella, L. Bavaresco, E. Braganhol et al., "Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines," *Urologic Oncology*, vol. 28, no. 3, pp. 260–267, 2010.
- [16] B. M. Künzli, M.-I. Bernlochner, S. Rath et al., "Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer," *Purinergic Signalling*, vol. 7, no. 2, pp. 231–241, 2011.
- [17] F. di Virgilio, "Purines, purinergic receptors, and cancer," *Cancer Research*, vol. 72, no. 21, pp. 5441–5447, 2012.
- [18] J. Bastid, A. Cottalorda-Regairaz, G. Alberici, N. Bonnefoy, J. F. Eliaou, and A. Bensussan, "ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology," *Oncogene*, vol. 32, no. 14, pp. 1743–1751, 2012.
- [19] J. Stagg, U. Divisekera, N. McLaughlin et al., "Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 4, pp. 1547–1552, 2010.
- [20] B. Zhang, "Opportunities and challenges for anti-CD73 cancer therapy," *Immunotherapy*, vol. 4, no. 9, pp. 861–865, 2012.
- [21] X. Matias-Guiu and J. Prat, "Molecular pathology of endometrial carcinoma," *Histopathology*, vol. 62, no. 1, pp. 111–123, 2013.
- [22] E. Colas, C. Perez, S. Cabrera et al., "Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates," *International Journal of Cancer*, vol. 129, no. 10, pp. 2435–2444, 2011.
- [23] R. A. Soslow, "High-grade endometrial carcinomas—strategies for typing," *Histopathology*, vol. 62, no. 1, pp. 89–110, 2013.
- [24] E. Aliagas, A. Vidal, B. Torrejon-Escribano et al., "Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium," *Purinergic Signalling*, vol. 9, no. 2, pp. 227–237, 2013.
- [25] E. Aliagas, B. Torrejón-Escribano, E. G. Lavoie et al., "Changes in expression and activity levels of ecto-5'-nucleotidase/ CD73 along the mouse female estrous cycle," *Acta Physiologica*, vol. 199, no. 2, pp. 191–197, 2010.
- [26] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [27] E. Aliagas, I. Villar-Menendez, J. Sevigny et al., "Reduced striatal ecto-nucleotidase activity in schizophrenia patients supports the 'adenosine hypothesis,'" *Purinergic Signalling*, vol. 9, no. 4, pp. 599–608, 2013.
- [28] J. Stagg and M. J. Smyth, "Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer," *Oncogene*, vol. 29, no. 39, pp. 5346–5358, 2010.
- [29] V. S. Klimberg, K. C. Westbrook, and S. Korourian, "Use of touch preps for diagnosis and evaluation of surgical margins in breast cancer," *Annals of Surgical Oncology*, vol. 5, no. 3, pp. 220–226, 1998.
- [30] X. Li, X. Qi, L. Zhou et al., "Decreased expression of P2X7 in endometrial epithelial pre-cancerous and cancer cells," *Gynecologic Oncology*, vol. 106, no. 1, pp. 233–243, 2007.
- [31] K. Konstantinos, S. Marios, M. Anna, K. Nikolaos, P. Efstratios, and A. Paulina, "Expression of p53 in imprint smears of endometrial carcinoma," *Diagnostic Cytopathology*, 2013.
- [32] G. Forte, R. Sorrentino, A. Montinaro et al., "Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma," *The Journal of Immunology*, vol. 189, no. 5, pp. 2226–2233, 2013.

Supplementary figure legends

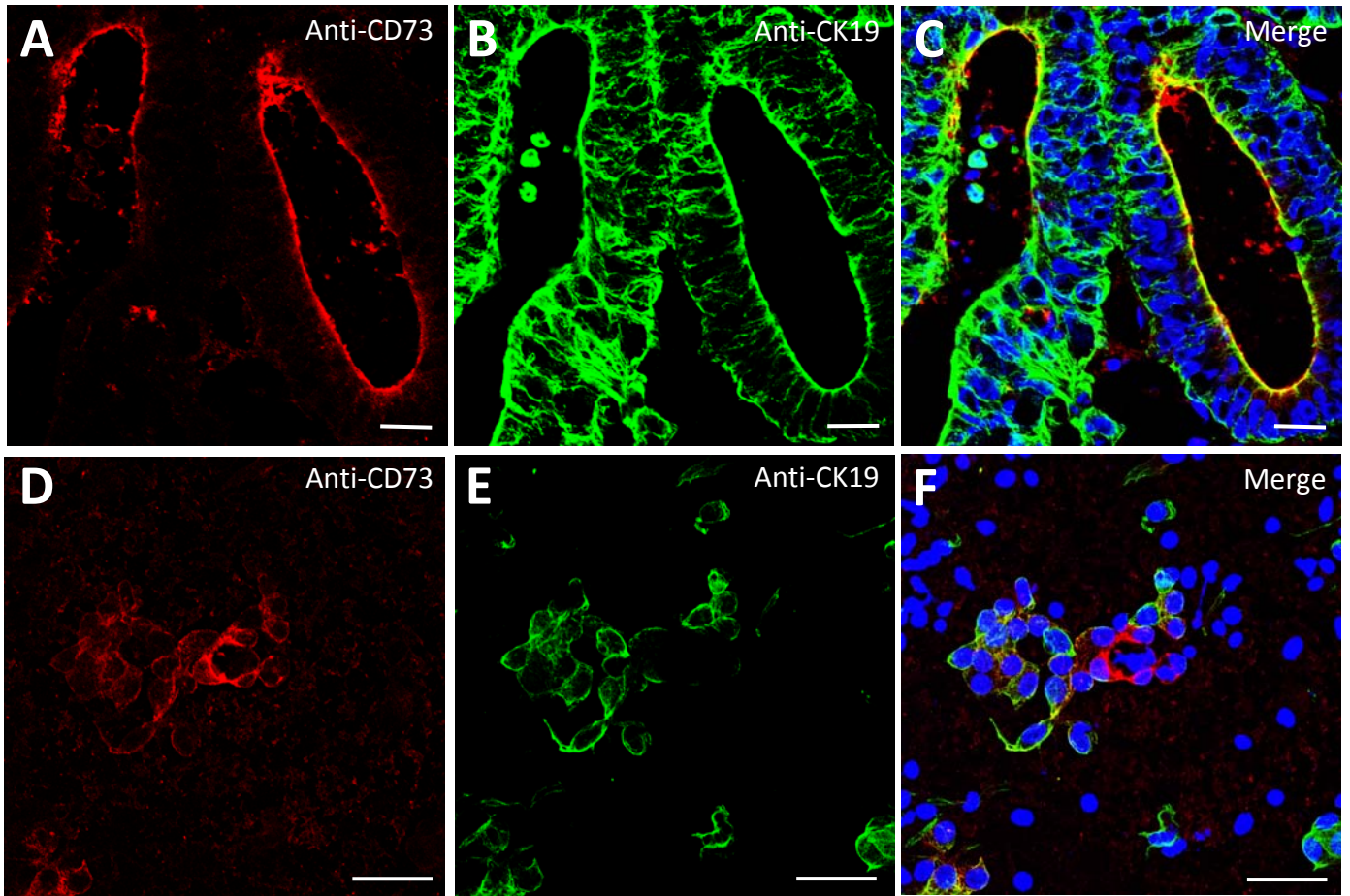
Supplementary figure 1. Immunolocalization of NTPDase1/CD39 and cytokeratin 19 (CK19) in human endometrioid adenocarcinomas (A-C) and endometrial touch preparations (D-F). CD39 (red) was localized in the stroma (A, D) and CK19 (green) in the epithelial cells (B, E). Merge images show that there is no colocalization between CD39 and CK19 (C, F). Scale bars = 25 μm (A-C) and 50 μm (D-F).

Supplementary figure 2. Immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and cytokeratin 19 (CK19) in human endometrioid adenocarcinomas (A-C) and endometrial touch preparations (D-F). CD73 (red) was mainly localized in the apical domain of glands (A, D) whereas CK19 (green) labelled completely the glandular epithelium (B, E). Merge images show, in yellow, colocalization between CD73 and CK19 (C, F). Scale bars = 20 μm (A-C) and 40 μm (D-F).

Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



CAPÍTOL 4

Validació de models cel·lulars per a l'estudi de les ecto-nucleotidases. Efecte del tamoxifen, l'anastrozol i l'estradiol

Aliagas E, Texidó L, Torrejón-Escribano B, Martín-Satué M.

CAPÍTOL 4. INTRODUCCIÓ

El **carcinoma endometrial** (CE) és el càncer més freqüent del tracte genital femení. Es relaciona amb la hiperplàsia endometrial, amb l'exposició a estrògens no compensada amb progestàgens i amb el **tamoxifen** (TAM), modulador selectiu dels receptors d'estrògens (SERM), utilitzat gràcies als seus efectes anti-estrogènics en el teixit mamari, com a teràpia adjuvant en el tractament del càncer de mama en aquelles pacients que presenten receptors d'estrògens (revisat per Shang, 2006). Els mecanismes moleculars exactes relacionats amb la carcinogènesi endometrial induïda pel TAM no es coneixen encara, i són de gran interès per als investigadors clínics i bàsics. Tot i així, en els darrers anys alguns dels mecanismes moleculars involucrats en l'aparició del càncer endometrial han estat identificats (revisat per Doll et al., 2008; revisat per Llobet et al., 2009; Yasue, Hasegawa i Udagawa, 2011; Yeramian et al., 2013; Shai, Segev i Narod, 2014). Així, el de Tipus I es relaciona amb un silenciament del gen supressor de tumors PTEN, amb mutacions en el gen de la β -catenina i, en especial, amb la inestabilitat de microsatèl·lits. La sobreexpressió de β -catenina també s'associa amb la exposició al TAM (Turbiner et al., 2008). El de Tipus II es relaciona especialment amb mutacions en el gen supressor de tumors p53. Aprofundir en el coneixement de la patogènesi a nivell molecular és essencial per identificar **nous biomarcadors** d'utilitat diagnòstica i pronòstica així com **noves dianes terapèutiques** per al tractament d'aquest tipus de càncer.

Diversos estudis suggereixen que els estrògens i els SERMs, especialment el TAM, podrien estar implicats en la **carcinogènesi endometrial** degut als seus efectes en la regulació transcripcional (revisat per Shang, 2006); resta per estudiar, però, els seus efectes a nivell molecular. Existeixen antecedents que la senyalització purinèrgica juga un paper en la patogènesi del càncer d'endometri; així, l'ATP, a través de receptors P2X₂, té efectes antiproliferatius en cèl·lules de carcinoma endometrial (Katzur et al., 1999) i, a través de receptors P2X₇, activa l'apoptosi. L'expressió del receptor P2X₇ es troba disminuïda en els teixits cancerosos i pre-cancerosos en comparació amb els teixits normals, afavorint així la progressió tumoral (Li et al., 2009). Els estudis que formen part d'aquesta tesi demostren variacions en l'expressió i l'activitat de les ecto-nucleotidases endometrials al llarg del cicle (veure **capítol 1 i 2**) i l'expressió elevada d'aquests enzims en el càncer d'endometri (veure **capítol 3**). A més, estudis d'altres grups demostren alteracions en l'activitat ecto-nucleotidàsica en les plaquetes de pacients amb càncer de mama tractades amb TAM (do Carmo Araújo, et al., 2005). No obstant, no es coneixen encara, els efectes d'aquest fàrmac sobre les ecto-nucleotidases endometrials, en part, degut a la manca de models cel·lulars on estudiar-los.

En el treball presentat en aquest capítol, hem validat tres línies cel·lulars d'origen epitelial (ECC-1, KLE i HEC-1-B) i hem posat a punt els cultius primaris de cèl·lules de l'estroma per a l'estudi de les ecto-nucleotidases endometrials. En aquests models cel·lulars hem estudiat l'efecte dels estrògens [estradiol (E_2)] i del TAM. En paral·lel al TAM hem estudiat l'efecte de l'anastrozol, fàrmac utilitzat en el tractament del càncer de mama el qual a diferència del TAM inhibeix selectivament l'aromatasa, implicant així, la síntesi d'estrògens, i sobre el que no es tenia coneixement previ en relació als seus efectes sobre la senyalització purinèrgica.

CAPÍTOL 4. OBJECTIUS

Pretenem contribuir al coneixement dels mecanismes moleculars implicats en la patogènesi i progressió tumoral de l'adenocarcinoma endometrial, i aportar eines per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. Per això ens hem proposat, com a objectiu principal, estudiar l'expressió de les ecto-nucleotidases, com a fins reguladors de les concentracions d'ATP i adenosina extracel·lulars, al càncer d'endometri.

L'objectiu específic d'aquest treball ha estat:

1. Establir i validar models cel·lulars (línies cel·lulars i cultius primaris) per estudiar-hi *in vitro* l'efecte de fàrmacs, com el TAM i l'anastrozol, i d'hormones com l' E_2 , en l'expressió de les ecto-nucleotidases així com en d'altres elements del purinoma.

CAPÍTOL 4. MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

Per dur a terme aquest estudi, es van posar a punt dos tipus de cultius cel·lulars per representar les principals cèl·lules que formen l'endometri: **cèl·lules epitelials** i **cèl·lules de l'estroma**. Així doncs, es van seleccionar tres línies cel·lulars comercials d'origen epitelial, i degut a la manca de línies cel·lulars comercials de cèl·lules de l'estroma, ens vam plantejar obtenir-les establint cultius primaris d'endometri humà.

1.1 LÍNIES CEL·LULARS

Com a cèl·lules epitelials es van utilitzar tres línies cel·lulars tumorals humanes d'adenocarcinoma endometrial: **ECC-1**, **KLE** i **HEC-1-B**, adquirides a l'ATCC (*American Type Culture Collection*). ECC-1, prové de l'epiteli luminal de l'endometri, les altres dues, KLE i HEC-1-B, provenen de l'epiteli glandular.

La línia cel·lular ECC-1 es va mantenir en medi RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 suplementat amb L-glutamina, 25 mM HEPES, 5% sèrum fetal boví (FBS; Invitrogen, Paisley, Regne Unit), 100 U/ml de penicil·lina i 100 U/ml d'estreptomicina. Les altres dues, KLE i HEC-1-B, es van mantenir en medi DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) F-12 (Ham) relació 1:1, suplementat amb L-glutamina, 15 mM HEPES, 10% FBS, 100 U/ml de penicil·lina i 100 U/ml d'estreptomicina. Les tres línies cel·lulars es van incubar a 37°C i a una atmosfera humida de 5% de CO₂. Per a l'observació de rutina de les cèl·lules es va emprar un microscopi invertit model Olympus CK-40.

Cada línia cel·lular es va criopreservar en nitrogen líquid, amb el medi de cultiu corresponent i 10% de dimetilsulfòxid (DMSO).

1.2 CULTIUS PRIMARIS

Per obtenir cèl·lules de l'estroma, es van realitzar cultius primaris d'endometris no tumorals obtinguts per histerectomia al Servei de Ginecologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge procedents de pacients sense patologia endometrial.

A continuació, explicaré el procés d'obtenció i el posterior processament dels endometris utilitzats en els cultius.

Al Servei d'Anatomia Patològica, immediatament després de la histerectomia, es va recollir un petit fragment (1-2 cm³) de la peça quirúrgica en condicions estèrils, es va netejar amb PBS (*Phosphate Buffer Saline*), es va separar la capa muscular adjacent i es va conservar en medi HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) lliure de Ca²⁺ i Mg²⁺ fins a ser processat, el més ràpid possible, al nostre laboratori.

El teixit endometrial es va disseccionar en cubs aproximadament d'un mm³, es van rentar amb HBSS i es van centrifugar a 800 rpm durant 5 minuts per eliminar les restes de sang. Posteriorment, es van incubar amb 10 ml d'AccumaxTM (solució de digestió comercial que conté enzims proteolítics i col·lagenolítics; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanya; ref: A7089), suplementada amb 100 U/ml de penicil·lina i 100 U/ml d'estreptomicina, durant 1 hora en agitació suau a temperatura ambient (TA), per dissociar les cèl·lules del teixit. Per aïllar les cèl·lules de l'estroma de la resta de cèl·lules digerides, la solució es va fer passar a través d'un filtre de niló amb porus de 70 µm de diàmetre (BD FalconTM, Durham, Carolina del Nort, USA; ref: 352350). Aquest filtre deixa passar només les cèl·lules de l'estroma i del sistema immunitari, i reté les cèl·lules epitelials que formen agregats de mida superior. Les cèl·lules filtrades, principalment cèl·lules de l'estroma, es van centrifugar a 800 rpm durant 5 minuts, i el pellet resultant es va resuspendre en medi de cultiu DMEM F-12 (Ham) relació 1:1, suplementat amb L-glutamina, 15 mM HEPES, 10% FBS, 100 U/ml de penicil·lina i 100 U/ml

d'estreptomina. Finalment, en aquest mateix medi, que no afavoreix el creixement de les cèl·lules del sistema immunitari, es van cultivar les cèl·lules de l'estroma obtingudes en flascons de 25 cm². El manteniment en cultiu i la criopreservació de les cèl·lules de l'estroma es va realitzar sota les mateixes condicions que les línies cel·lulars.

Per a l'observació morfològica de les cèl·lules de l'estroma després del cultiu i durant els posteriors passes es va utilitzar el microscopi invertit model Olympus CK-40.

Un cop establerts els cultius de cèl·lules epitelials i cèl·lules de l'estroma es van utilitzar per als estudis d'expressió proteica, d'activitat enzimàtica *in situ* i d'expressió gènica. A continuació, explicaré el processament de les cèl·lules per a la realització d'aquests estudis.

2. PROCESSAMENT DE LES CÈL·LULES PER ALS ESTUDIS D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA I D'ACTIVITAT ENZIMÀTICA *IN SITU*

Per a la realització dels experiments d'immunofluorescència i d'activitat enzimàtica *in situ* en línies cel·lulars i cultius primaris, les cèl·lules es van cultivar en plaques de 24 pous (25.000 cèl·lules/pou) sobre cobreobjectes rodons de 12 mm de diàmetre (VWR, Radnor, Filadèlfia, USA; ref: ECN 631-1577) prèviament tractats amb poli-lisina al 0.05% (*poly-L-lysine solution, Sigma-Aldrich*). En arribar a la confluència, es van fixar amb paraformaldehid (PFA) al 4% durant 15 minuts i finalment es van rentar 3 cops amb PBS, abans de ser conservades a 4°C.

2.1 EXPERIMENTS D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Per caracteritzar l'expressió de les ecto-nucleotidases de membrana i altres proteïnes en els models cel·lulars, es van realitzar experiments d'immunofluorescència.

Després de fixar i rentar les cèl·lules, es van bloquejar les unions inespecífiques amb un 20% de sèrum de cabra o de cavall (Gibco, Paisley, Regne Unit) i 0.1% de gelatina en PBS, durant 1 hora en agitació suau a TA. Alternativament, per detectar antígens intracel·lulars, les cèl·lules es van permeabilitzar amb 0.2% de saponina durant 15 minuts a TA abans de fer el bloqueig.

Seguidament, les cèl·lules es van incubar amb l'anticòs primari a les concentracions indicades a la **Taula M1**, durant tota la nit a 4°C. Totes les dilucions es van fer amb PBS. Després de rentar l'anticòs 3 vegades amb PBS, les cèl·lules es van incubar amb l'anticòs secundari adient [anticossos contra immunoglobulines de ratolí, conill o cabra amb fluorocroms Alexa 488 (verd) o Alexa 555 (vermell); Molecular Probes, Leiden, Països Baixos] diluït 1:500 en PBS durant 1 hora, a la foscor, en agitació i a TA. En els dobles marcatges, es van utilitzar anticossos primaris de diferents espècies i els corresponents anticossos secundaris.

ANTICÒS PRIMARI	CLON	ORIGEN	DILUCIÓ ÒPTIMA			FONT
			IF	CF	WB	
Anti-CD39	BU-61	Ratolí	1:500	1:500	ND	Ancell (188-020)
Anti-NTPDasa3	B ₃ S ₁₀	Ratolí	1:500	1:500	ND	http://ectonucleotidases-ab.com/
Anti-NPP1	915-925	Cabra	1:250	1:500	ND	Abcam (ab40003)
Anti-NPP3	NP4D6	Ratolí	1:100	1:50	ND	Abcam (ab90754)
Anti-TNAP	[3H414(T RA-2-49)]	Ratolí	1:50	1:200	ND	Abcam (ab17973)
Anti-PLAP	8B6	Ratolí	1:1000	1:3000	ND	Sigma-Aldrich (A2951)
Anti-CD73	4G4	Ratolí	1:50	1:50	ND	Abcam (ab81720)
Anti-ADA	D-4	Ratolí	1:50	1:50	ND	Santa Cruz (28346)
Anti-CD26	202-36	Ratolí	1:100	1:100	1:40	Abcam (ab3154)
Anti-ADK	-	Conill	1:200	1:200	ND	Sigma-Aldrich (HPA038409)
Anti-A ₁	309-326	Conill	1:100	1:1000	ND	Calbiochem (119117)
Anti-A _{2A}	373-391	Conill	1:100	1:100	ND	Abcam (ab3461)
Anti-A _{2B}	C-20	Cabra	1:50	ND	ND	Santa Cruz (7505)
Anti-ENT1	hENT1a	Conill	1:250	ND	ND	Anticòs cedit pel Dr. M. Pastor-Anglada
Anti-ENT2	hENT2	Conill	1:500	ND	ND	Anticòs cedit pel Dr. M. Pastor-Anglada
Anti-CNT1	hCNT1a	Conill	1:500	ND	ND	Anticòs cedit pel Dr. M. Pastor-Anglada
Anti-CNT2	hCNT2b	Conill	1:50	ND	ND	Anticòs cedit pel Dr. M. Pastor-Anglada
Anti-Vimentina	3B4	Ratolí	1:200	ND	ND	DAKO (M7020)
Anti- α -tubulina	DM 1A	Ratolí	-	-	1:5000	Sigma-Aldrich (T9026)
Anti-Lamp1	-	Conill	1:1000	ND	ND	Abcam (ab24170)
Anti-EEA1	-	Conill	1:300	ND	ND	Abcam (ab2900)
Anti-LC3B	-	Conill	1:150	ND	ND	Abcam (ab48394)
Anti-Rab11	-	Conill	1:200	ND	ND	Abcam (ab3612)

Taula M1. Llistat d'anticossos primaris utilitzats. (IF) immunofluorescència, (CF) citometria de flux, (WB) Western Blot, (ND) no determinat.

Després de rentar 3 vegades l'anticòs secundari amb PBS, es va realitzar el marcatge dels nuclis amb el marcador de nuclis To-Pro[®]-3 (Invitrogen) diluït 1:1000 en PBS durant 7 minuts a TA. Seguidament, els cobreobjectes es van rentar 3 cops amb PBS i es van muntar amb medi de muntatge aquós (Fluoromount, Sigma-Aldrich). Els resultats van ser visualitzats i fotografiats amb el microscopi d'espectre confocal Leica TCS-SL (Leica, Wetzlar, Alemanya) als Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB) al Campus de Bellvitge. Per tal de comparar les intensitats de fluorescència en les diferents situacions experimentals, dins de cada experiment, es van mantenir els mateixos paràmetres de captura d'imatges.

En els experiments control es va elidir l'anticòs primari per tal de detectar les possibles unions inespecífiques de l'anticòs secundari.

2.1.1 QUANTIFICACIÓ DE LA INTENSITAT DE FLUORESCÈNCIA DE LES IMATGES I ANÀLISI DE LA COLOCALITZACIÓ

Per quantificar la intensitat de fluorescència de les imatges es va utilitzar el programa ImageJ (Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA) utilitzant com a mesura de la fluorescència total relativa la mitja dels paràmetres. La colocalització entre els píxels verds i vermells de les imatges es va analitzar mitjançant el programa ImageJ, i per a l'anàlisi estadístic es va utilitzar el coeficient de Manders (Manders et al., 1992).

2.2 EXPERIMENTS D'ACTIVITAT ATPÀSICA, ADPÀSICA I AMPÀSICA *IN SITU*

Per detectar i localitzar les activitats ecto-nucleotidàsiques en els models cel·lulars, es van dur a terme assaigs d'activitat enzimàtica *in situ* utilitzant diferents substrats.

El mètode del fosfat de plom Wachstein/Meisel es basa en la formació de precipitats de fosfat de plom (PbP) en els llocs on hi ha activitat fosfatàsica. El fosfat generat es combina amb el nitrat de plom $[Pb(NO_3)_2]$ afegit a la reacció d'incubació (Braun et al., 2003; Aliagas et al., 2010; 2013a; 2013b; 2014). El sulfur d'amoní $[(NH_4)_2S]$ s'utilitza per donar color marró als precipitats. La **Figura M1** resumeix el procés.

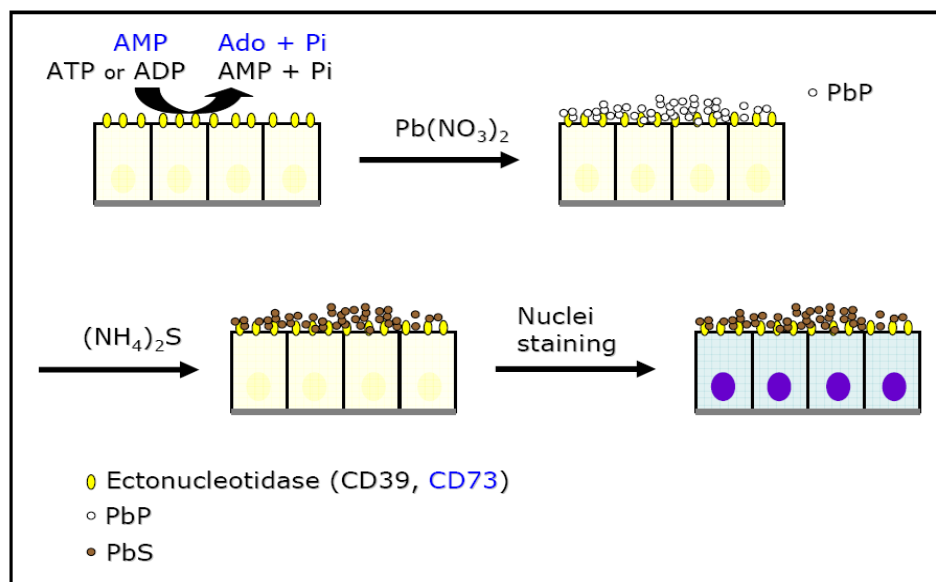


Figura M1. Mètode del fosfat de plom Wachstein/Meisel.

Després de la fixació, les cèl·lules es van preincubar durant 1 hora a TA amb el tampó de bloqueig següent:

REACTIU	CONCENTRACIÓ FINAL
Sucrosa	0.25 M
Tris-maleat	50 mM
CaCl ₂	2 mM

Per preparar 500 ml de Tris-maleat 200 mM es van dissoldre 12.1 g de Tris (Merck, Darmstadt, Alemanya) i 11.6 g d'àcid màlic (Sigma-Aldrich). Finalment, es va ajustar el pH a 7.4 amb NaOH 5 M.

Seguidament, per a la reacció enzimàtica, es van incubar les cèl·lules durant 1 hora a 37°C amb la solució d'incubació següent:

REACTIU	CONCENTRACIÓ FINAL
Tris-maleat, pH 7.4	50 mM
Sucrosa	0.25 M
Pb(NO ₃) ₂	2 mM
MnCl ₂	5 mM
CaCl ₂	2 mM
Substrat/Nucleòtid	ATP i ADP 200 µM; AMP 1 mM
Levamisol (inhibidor de fosfatases alcalines)	2.5 mM
Dextran T250	3%

Després d'aturar la reacció amb aigua mQ, es va procedir al revelat incubant les cèl·lules amb (NH₄)₂S 1% (v/v) durant exactament 1 minut. La reacció es va aturar traient el sulfur d'amoni i afegint aigua mQ.

A continuació, els nuclis es van contratenyir amb hematoxilina durant 30 segons. Després de treure l'excés de colorant amb aigua mQ, els cobreobjectes es van muntar tal com s'ha indicat anteriorment. Finalment, els resultats van ser visualitzats i fotografiats amb el microscopi de camp clar Leica DMD 108 (Leica).

En els experiments d'inhibició, es va afegir 1 mM de NF279 (Tocris Bioscience, Bristol, Regne Unit) o 1 mM d' α,β -metilen-ADP (α,β -meADP; Sigma-Aldrich), tant a la solució de bloqueig com a l'enzimàtica.

En els experiments control es va ometre el substrat.

2.3 ASSAIG D'ACTIVITAT ENZIMÀTICA *IN SITU* DE LES FOSFATASES ALCALINES (AP)

L'activitat *in situ* de les AP es va detectar utilitzant el substrat BCIP®/NBT (Sigma-Aldrich), que precipita i es torna de color blau quan és desfosforilat (Aliagas et al., 2013a; Aliagas et al., 2013b).

Després de la fixació, les cèl·lules es van rentar 2 cops amb tampó 0.1 M Tris-HCl i 5 mM MgCl₂, pH 7.4. A continuació, es van preincubar amb el mateix tampó a pH 9.4 durant 15 minuts a TA. Per a iniciar la reacció enzimàtica, es van afegir 200 µl de BCIP®/NBT, substrat de l'enzim, al tampó de preincubació durant 7 minuts a TA. La reacció va ser aturada amb tampó 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4.

Tot seguit, els nuclis es van contratenyir amb verd de metil, prèviament escalfat a 60°C, durant 10 minuts a TA. Després de treure l'excés de colorant amb aigua mQ, les cèl·lules es van banyar amb alcohol de 95° durant uns segons per virar el color del colorant de blau a verd (i així diferenciar els nuclis dels precipitats de color blau). El muntatge dels cobreobjectes es va realitzar tal com s'ha explicat anteriorment. Finalment, els resultats van ser visualitzats i fotografiats amb el microscopi de camp clar Leica DMD 108 (Leica).

Els experiments d'inhibició es van realitzar en presència de levamisol 5 mM (Sigma-Aldrich), inhibidor específic de les AP, tant al tampó de preincubació com al de la reacció enzimàtica.

En els experiments control el substrat va ser elidit.

3. PROCESSAMENT DE LES CÈL·LULES PER ALS ESTUDIS DE CITOMETRIA DE FLUX

Els experiments de citometria de flux es van posar a punt per estudiar, quantificar i comparar els nivells d'expressió proteica a les cèl·lules.

Per a la realització d'aquests experiments, les cèl·lules es van fer créixer en plaques de 100 mm de diàmetre fins a la confluència. En aquest punt, les cèl·lules es van desenganxar del suport mitjançant tripsinització, i es van comptar amb el comptador de cèl·lules automàtic TC10™ *Automated Cell Counter* (Bio-Rad, Hercules, Califòrnia, USA).

Es van seleccionar 400.000 cèl·lules per cada condició experimental, i es van rentar amb tampó de citometria (1% FBS i 0.1% azida en PBS) abans de ser fixades amb PFA al 4% durant 10 minuts. A continuació, si l'antigen a detectar era intracel·lular, les cèl·lules es van permeabilitzar, afegint saponina al 0.2% al tampó de citometria, i incubant durant 15 minuts. Tota la tècnica es va dur a terme a 4°C.

Després de rentar les cèl·lules fixades amb tampó de citometria, es van incubar amb l'anticòs primari (veure **Taula M1**), diluït en tampó de citometria, durant 30 minuts. Després de rentar les cèl·lules 3

vegades, es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent [anticossos contra immunoglobulines de ratolí, conill o cabra amb fluorocroms Alexa 488 (verd) o Alexa 555 (vermell)] a la foscor. Després de rentar 3 vegades amb tampó de citometria les cèl·lules es van analitzar amb el citòmetre FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Califòrnia, USA) i els resultats van ser adquirits amb el programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson), als CCIUB del Campus de Bellvitge.

A tots els experiments es van incloure dos controls. En un cas, es van elidir els anticossos primari i secundari per tal de detectar la possible autofluorescència de les cèl·lules, i en l'altre, es va elidir l'anticòs primari amb la finalitat de mesurar les possibles unions inespecífiques de l'anticòs secundari.

4. PROCESSAMENT DE LES CÈL·LULES PER ALS ESTUDIS D'EXPRESSION GÈNICA I PROTEICA EN HOMOGENATS CEL·LULARS

Per a la realització de les PCR i dels experiments Western Blot (WB) en homogenats cel·lulars, les cèl·lules es van fer créixer en plaques de 100 mm de diàmetre fins a la confluència, per obtenir posteriorment l'RNA i la proteïna total, respectivament.

4.1 OBTENCIÓ DEL RNA TOTAL I DEL cDNA

L'RNA total de les cèl·lules es va aïllar utilitzant el kit d'extracció *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint el protocol recomanat pel fabricant. Cadascuna de les mostres es va tractar amb el kit *DNase-Free RNase Set* (Qiagen) per tal d'eliminar el DNA residual que pogués causar falsos-positius en els resultats. La quantitat i qualitat de l'RNA extret es va mesurar utilitzant l'espectrofotòmetre Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). La transcripció reversa es va dur a terme a partir de 1.5 µg d'RNA utilitzant el kit *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Chicago, Illinois, USA).

4.1.1 PCR CONVENCIONAL

La PCR convencional es va dur a terme per identificar l'expressió dels gens d'interès expressats en les línies cel·lulars en condicions basals.

Els experiments de PCR es van realitzar amb el kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, Califòrnia, USA) d'acord amb les instruccions del fabricant i els primers detallats a la **Taula M2**.

GEN	SEQÜÈNCIES (5'-3') DELS PRIMERS (FORWARD/REVERSE)	MIDA DEL FRAGMENT (pb)	T ANNEALING (°C)
ENTPD1	ATGGCAAGGACTACAATG/GAAAAGCAGTATTCCTCA	519	52
ENTPD2	CAGGATGTGCCCAAAGAGA/CCCATTGAAAGAGCATCG	687	59
ENTPD3	GTGCTGACCCGCCAACCATGT/GAAGACCCGGCATCCAGCACA	188	57
ENPP1	GTCGCTGTGATGCTGCCTGTGT/AGCAGTCGCCCTTGTCCCTTGC	171	58
ENPP3	GCAGGTGGACCAGTCAGTGCC/GGGGGCAGGCCCTTCGTACAT	225	58
TNAP	GGCATTGGCACCTGCCTTACT/TGACCCTTGAGGATGCGGGC	204	58
PLAP	ACCCGGACTTCTGGAACCGC/TAGCGATGTCCTGGCACCCCTC	540	58
CD73	ACCTGGGAGAACCTGGCTGCT/TGGGCACTCGACTTGGTGC	229	56
ADA	CAGACGCCCGCCTTCGACAA/GCCCGCATAGCAGGCATGT	216	56
CD26	GGCACCTGGGAAGTCATCGGGA/AGAGGGGCAGACCAGGACCG	241	58
ADK	GCCAAAAAGACACAAGCCCTGCC/GCTGCATAGTGCCAGCACGG	248	56
ADORA1	CACAGACCTACTTCCACACCTG/GCTCCCCATGCTGCCGTTG	275	58
ADORA2A	GGCCATCGCCATTGACCGCTA/CCGCAGCCCTGGGAGTGGTTC	192	58
ADORA2B	GTGGGGCTCTTCGCCATCCC/TCGGGTCCCCGTGACCAA	198	58
ADORA3	TGGGGTGCTGGTCATGCCTTT/TAGAATGCACCCAGGGAGCCCA	202	57
P2X1	CTGGCCGCCTTCTCTTCGAG/AGGGCGCGGGATGTCGTCA	503	58
P2X2	CACAGACGGGTACCTGAAGC/CGACGGAAGTCAGAGCTGTG	404	55
P2X3	GAGAGTGAGGAGAAATACCG/CACTGGTCCCAGGCCTTG	443	60
P2X4	TGCATTTATGATGCTAAAACA/CAAGACCCTGCTCGTAAT	498	58
P2X5	CCGGGAGCGACTTCCAGGATATAG/ GGCATGGGATCACTGGGTGCTAGAC	613	58
P2X6	AAAAACAGGCCAGTGTGTGGTGTTC/ TGCCTGCCCGGTGACGAGGATGTCA	520	60
P2X7	AGATCGTGGAGAATGGAGTG/TTCTCGTGGTGTAGTTGTGG	398	58
P2Y1	GCAACAGCGTGGCCATCTGGA/CCGGTGGGCACTGATGCATGT	245	56
P2Y2	GCCATTCCACGTCACCCGCA/AGCGTACGAGCCTCTGCCCA	170	58
P2Y4	GCCCACAACCACTGGCCCTT/AGGCAGCCGGCTACGACCAA	212	58
P2Y6	TGTATTCGGCGGTGCTGGCG/AGGCGAAGTCGCCAAAGGGC	201	56
P2Y11	CAGCCAACGTCTCGGGTGCC/GTCAGGGCGCAGAGCAGGTC	238	58
P2Y12	CTCTGTTGTCATCTGGGCATTCAT/ GGTTTGGCTCAGGGTGTAAAGGA	360	55
P2Y13	TGTGTCGTTTTTCTTCGGTG/TGCTGCCAAAAGAGAGTTG	577	55
P2Y14	GTGCAGGGTCTCTGCCGTGC/ TGGAACAGCAAGGAGGAGCATGAG	187	56

Taula M2. Relació de primers utilitzats en les PCR, mida dels fragments obtinguts i la temperatura d'annealing dels primers.

4.1.2 PCR A TEMPS REAL (RT-PCR)

L'RT-PCR es va dur a terme per analitzar i quantificar l'expressió dels gens *CD26*, *CD73* i *AP*, utilitzant les plaques *TaqMan low-density array* (TLDA) (Applied Biosystems). Els 384 pous de cada placa, es van carregar prèviament amb els primers i les sondes fluorogèniques *TaqMan*, predissenyats específicament per detectar els gens d'interès. A continuació, es va carregar 1 µg de cDNA de cada mostra, combinat amb el reactiu *TaqMan 2X Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), als

ports de càrrega de la placa. Les reaccions de RT-PCR es van dur a terme usant el termociclador ABI PRISM 7900HT *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) seguint el següent protocol de temperatures: a 50°C durant 2 minuts i a 94.5°C durant 10 minuts, seguit de 40 cicles a 97°C durant 30 segons i 59.7°C durant 1 minut. Els resultats es van recollir mitjançant el *software* SDS v2.1 (Applied Biosystems) i es van analitzar amb el mètode de quantificació comparativa del doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) utilitzant el *software* *Expression Suite* v1.0 (Applied Biosystems). Els nivells d'expressió relativa dels gens es van determinar utilitzant l'mRNA 18S com a control endogen per a la normalització. Els resultats es van expressar com la mitja de la quantificació relativa (RQ) dels transcrits analitzats \pm l'error estàndard de la mitja (SEM). Els resultats es van obtenir a partir de 4 experiments independents. No es va detectar cap senyal en els controls negatius sense cDNA. L'anàlisi estadístic es va realitzar utilitzant el *software* SigmaStat 3.2 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Els valors s'expressen com la mitja \pm SEM. Per comparar les mitges dels resultats de tres grups independents amb distribució normal, es va utilitzar l'ANOVA d'un únic factor (*one-way analysis of variance*), seguida, quan corresponia, del test de Bonferroni per comparacions múltiples.

4.2 OBTENCIÓ DE PROTEÏNA TOTAL

Després de rentar les cèl·lules amb PBS, es van aixecar del suport amb 300 μ l de tampó 10 mM Tris-HCl i 150 mM NaCl a pH 7.4 suplementat amb inhibidors de proteases (1% PMSF, 0.2% EGTA, 0.1% aprotinina i 0.1% leupeptina) i l'ajuda d'un rascador. Les cèl·lules recollides es van incubar 10 minuts a TA i es van llisar mitjançant tres cicles de congelació i descongelació. A continuació, per separar els nuclis, les cèl·lules es van centrifugar a 900 X g durant 5 minuts a 4°C. El sobrenedant es va centrifugar a 20.000 X g durant 30 minuts. Finalment, la concentració de proteïna va ser quantificada mitjançant el mètode colorimètric de Bradford (Bradford,1976).

4.2.1 WESTERN BLOT

El WB es va dur a terme per detectar i quantificar proteïnes.

Per a la realització del WB es van fer servir gels d'electroforesi *Mini-Protean® TGX™ Any kDa* (Bio-Rad, ref: 456-9033) que permeten la separació de proteïnes amb pesos moleculars compresos entre 10 i 250 kDa. Es van carregar 20 μ g de proteïna total per carril i un marcador de pes molecular *Precision plus protein™ standards Dual Color* (Bio-Rad, ref: 161-0374). El gel es va córrer durant 90 minuts a 200 volts en tampó d'elèctrodes 1X. El tampó d'elèctrodes 1X es va preparar en aigua mQ, diluint 10 vegades el tampó d'elèctrodes 10X que conté 1.92 M glicina, 0.25 M Tris i 1% (p/v) SDS.

A continuació, les proteïnes del gel es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa de 0.2 μ m *Trans-blot® turbo™ transfer pack* (Bio-Rad, ref: 170-4158) amb una solució de transferència 1X

durant 3 minuts a 100 volts, amb l'aparell *Trans-blot® turbo™ transfer System* (Bio-Rad, ref: 170-4155). El tampó de transferència 1X es va preparar diluint 10 vegades el tampó de transferència 10X que conté 1.92 M glicina i 0.25 M Tris, i afegint-hi aigua mQ i un 20% (v/v) de metanol.

Un cop finalitzada la transferència, la membrana es va incubar amb una solució de bloqueig formada per 5% (p/v) de llet desnatada en pols i tampó TBS-Tween [10 mM Tris HCl a pH 7.4, 140 mM NaCl i 1% (v/v) Tween-20] en agitació durant 1 hora. A continuació, es va incubar l'anticòs primari monoclonal de ratolí contra CD26 en PBS (veure **Taula M1**), durant tota la nit a 4°C. Després de rentar la membrana tres vegades amb tampó TBS-Tween durant 5 minuts, es va incubar l'anticòs secundari anti-ratolí amb peroxidasa de rave (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluït 1:2000 en PBS durant 1 hora en agitació a TA. Com a control de la quantitat de proteïna carregada es va utilitzar l' α -tubulina. Després de rentar la membrana 3 vegades amb TBS-Tween es va incubar amb reactius quimioluminescents de l'ECL (*Enhanced Chemiluminescence*; GE Healthcare, Buckinghamshire, Regne Unit) durant 1 minut. El senyal quimioluminescent es va transferir a un film quimioluminescent *Amersham Hyperfilm™ ECL* (GE Healthcare) exposant-lo durant 1 minut. Finalment, el senyal luminescent es va captar amb l'aparell *Luminescent Image Analyzer LAS-3000* (Fujifilm, Tòquio, Japó).

5. ASSAIG DE VIABILITAT

La citotoxicitat dels fàrmacs (TAM i anastrozol) i de l'E₂, es va analitzar sobre els cultius cel·lulars (línies cel·lulars i cultius primaris). Les cèl·lules es van fer créixer en plaques de 24 pous fins a un 80% de confluència i, posteriorment, es van incubar en presència de TAM, anastrozol o E₂ a diferents temps i concentracions, amb la finalitat d'establir els paràmetres d'incubació de cada factor que no comprometin la viabilitat cel·lular.

En els controls, es van incubar els dissolvents utilitzats per preparar la solució mare de cada tractament, amb les mateixes condicions que aquests (**Taula M3**).

La viabilitat dels cultius es va comprovar amb l'assaig d'MTT (Sigma-Aldrich; ref: M5655), afegint 0.5 mg/ml d'MTT a cada pou i mantenint-ho durant 30 minuts a 37°C. La reacció es va aturar amb una solució d'isopropanol en un volum equivalent al volum del medi. Aquest assaig es basa en la capacitat de les cèl·lules vives de reduir el tetrazolium MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) a formazan, generant equivalents reduïts com NADH i NADPH. El formazan acumulat és de color porpra i es pot solubilitzar i quantificar per espectrofotometria. La quantitat generada és proporcional al nombre de cèl·lules vives.

Un cop el formazan acumulat es va dissoldre completament, es va agafar una alíquota de 100 µl per mesurar-ne l'absorbància a 550 nm en una placa de 96 pouets en un lector de plaques (ASYS, Cambridge, Regne Unit).

6. TRACTAMENTS CEL·LULARS

Els medis d'incubació van ser: 1) RPMI 1640 sense *phenol red* suplementat amb L-glutamina, 25 mM HEPES, 5% *charcoal stripped*-FBS, 100 U/ml de penicil·lina i 100 U/ml d'estreptomicina i 2) DMEM F-12 (Ham) relació 1:1 sense *phenol red*, suplementat amb L-glutamina, 15 mM HEPES, 10% *charcoal stripped*-FBS, 100 U/ml de penicil·lina i 100 U/ml d'estreptomicina.

Els paràmetres d'incubació (temps i concentració) de cada tractament es van determinar empíricament i també a partir de la literatura prèvia que hi ha en alguns casos (**Taula M3**).

TRACTAMENT	TEMPS	CONCENTRACIÓ	DISSOLVENT
TAMOXIFEN (Sigma-Aldrich; ref: T5648)	0, 24, 48 i 72 h	10 µM	DMSO
β-ESTRADIOL (Sigma-Aldrich; ref: E4389)	0, 24, 48 i 72 h	1 nM	Etanol
ANASTROZOL (Sigma-Aldrich; ref: A2736)	0, 24, 48 i 72 h	1 µM	DMSO
CICLOHEXIMIDA A (Sigma-Aldrich; ref: C4859)	0, 24 h	50 µg/ml	DMSO
CLORUR D'AMONI (Sigma-Aldrich; ref: A9434)	0, 6 h	30 mM	H ₂ O
METIL-β-CICLODEXTRINA (Sigma-Aldrich; ref: C4555)	0, 2 h	5 mM	H ₂ O

Taula M3. Tractaments cel·lulars, durada, concentració i dissolvent.

En alguna situació experimental, on calia estudiar la reversibilitat del tractament, passades les 72 hores, aquest es va eliminar del medi i les cèl·lules es van incubar 24 hores més amb medi de cultiu.

Com a control dels experiments, les cèl·lules es van incubar amb medi de cultiu en absència del tractament, i a més, en el cas dels tractaments dobles les cèl·lules es van incubar amb els tractaments per separat durant els temps indicats en cada cas.

CAPÍTOL 4. RESULTATS

A. PRIMER APARTAT

En aquesta tesi doctoral, es van posar a punt dos tipus de cultius cel·lulars: (1) **línies cel·lulars** tumorals humanes d'adenocarcinoma endometrial i (2) **cultius primaris** de cèl·lules de l'estroma endometrial humà.

Un cop establerts els cultius, es va estudiar l'**expressió** i l'**activitat enzimàtica** de les ecto-nucleotidases i d'altres elements del purinoma en (1) les línies cel·lulars crescudes en absència i en presència de TAM, anastrozol i E₂ en el medi de cultiu i en (2) els cultius primaris d'estroma crescuts en absència i presència de TAM en el medi de cultiu, mitjançant experiments d'**immunofluorescència** i **citometria de flux, assaigs d'activitat enzimàtica *in situ*, PCR i RT-PCR.**

El primer pas va ser caracteritzar l'expressió i l'activitat en cèl·lules crescudes en **absència** de TAM, anastrozol o E₂ en el medi de cultiu (anomenades també cèl·lules control o cèl·lules no tractades), per analitzar-les posteriorment en cèl·lules crescudes en **presència** d'aquests factors (anomenades cèl·lules tractades), i finalment comparar-les.

En primer lloc, es van realitzar els estudis amb les línies cel·lulars, i en segon lloc, es van dur a terme els estudis amb els cultius primaris.

Els resultats d'aquest primer apartat, s'explicaran en funció de la tècnica utilitzada i es classificaran en quatre blocs ordenats de la següent manera:

Primer bloc:

R1. Resultats de l'estudi de l'expressió proteica en línies cel·lulars d'adenocarcinoma endometrial crescudes en absència de TAM, anastrozol i E₂ (condicions basals).

R2. Resultats de l'estudi de l'activitat enzimàtica en línies cel·lulars d'adenocarcinoma endometrial en condicions basals.

R3. Resultats de l'estudi de l'expressió gènica en línies cel·lulars d'adenocarcinoma endometrial en condicions basals.

Segon bloc:

R4. Resultats de l'estudi de l'expressió proteica en línies cel·lulars d'adenocarcinoma endometrial crescudes en presència de TAM, anastrozol o E₂.

R5. Resultats de l'estudi de l'activitat enzimàtica en línies cel·lulars d'adenocarcinoma endometrial crescudes en presència de TAM o E₂.

R6. Resultats de l'estudi de l'expressió gènica en línies cel·lulars d'adenocarcinoma endometrial crescudes en presència de TAM o E₂.

Tercer bloc:

R7. Resultats de l'estudi de l'expressió proteica en cultius primaris de cèl·lules de l'estroma endometrial humà crescuts en absència de TAM en el medi de cultiu (condicions basals).

R8. Resultats de l'estudi de l'activitat enzimàtica en cultius primaris de cèl·lules de l'estroma endometrial humà crescuts en condicions basals.

Quart bloc:

R9. Resultats de l'estudi de l'expressió proteica en cultius primaris de cèl·lules de l'estroma endometrial humà crescuts en presència de TAM.

R10. Resultats de l'estudi de l'activitat enzimàtica en cultius primaris de cèl·lules de l'estroma endometrial humà crescuts en presència de TAM.

A continuació, presento els resultats obtinguts en cada bloc.

Primer bloc

R1. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA EN LÍNIES CEL·LULARS D'ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL CRESCUDES EN CONDICIONS BASALS.

Per **caracteritzar l'expressió basal de les ecto-nucleotidases i altres proteïnes** a les línies cel·lulars, es van dur a terme experiments d'immunofluorescència (per localitzar les proteïnes) i de citometria de flux (per mesurar-ne els nivells d'expressió). Els resultats obtinguts es troben resumits a la **Taula R1**.

Es va detectar expressió de TNAP, PLAP, CD73, ADA, CD26, ADK i del receptor A₁ d'adenosina. Així doncs, les línies cel·lulars HEC-1-B, KLE i ECC-1 són bons models cel·lulars per estudiar-hi l'expressió de les ecto-nucleotidases i d'altres proteïnes a través de tècniques d'immunofluorescència i citometria de flux.

	HEC-1-B		KLE		ECC-1	
	IF	CF	IF	CF	IF	CF
NTPDasa1/CD39	×	×	×	×	×	×
NTPDasa3	×	×	×	×	×	×
NPP1	×	×	×	×	×	×
NPP3	×	×	×	×	×	×
TNAP	×	×	×	✓	×	×
PLAP	×	×	×	×	✓	✓
CD73	✓	✓	✓	✓	✓ *	✓ 20%
ADA	×	×	×	×	×	✓ 50%
CD26	✓	✓	✓	✓	×	×
ADK	×	✓	×	✓	×	✓
Receptor A₁	×	✓	×	✓	×	✓
Receptor A_{2A}	×	×	×	×	×	×
Receptor A_{2B}	×	×	×	×	×	×
ENT1	×	ND	×	ND	×	ND
ENT2	×	ND	×	ND	×	ND
CNT1	×	ND	×	ND	×	ND
CNT2	×	ND	×	ND	×	ND

Taula R1. Expressió de diferents elements del purinoma en les línies cel·lulars HEC-1-B, KLE i ECC-1. Resum dels resultats obtinguts per immunofluorescència (IF) i citometria de flux (CF). ✓ expressió, × manca d'expressió, ND no determinat. Si no s'indica el contrari, l'expressió era del 100%. A la columna ECC-1, l'asterisc indica que l'expressió només va ser detectada en petits grups de cèl·lules.

R2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA EN LÍNIES CEL·LULARS D'ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL CRESCUDES EN CONDICIONS BASALS.

Per tal de **detectar i localitzar l'activitat ATPàsica, ADPàsica, AMPàsica i fosfatasa alcalina** a les línies cel·lulars HEC-1-B, KLE i ECC-1 en condicions basals, es van dur a terme assaigs d'activitat enzimàtica *in situ* en cèl·lules fixades.

Les NTPDases tenen activitat ATPàsica i ADPàsica, mentre que les NPPs i CD73 només tenen activitat ATPàsica i AMPàsica, respectivament. Les fosfatases alcalines tenen activitat ATPàsica, ADPàsica i AMPàsica.

Per tal de caracteritzar les activitats ATPàsica, ADPàsica, AMPàsica i fosfatasa alcalina, es van utilitzar inhibidors de les diferents famílies d'ecto-nucleotidases. Així, es va utilitzar l'inhibidor específic de CD73, l' α,β -meADP, i el de la fosfatasa alcalina, el levamisol. Degut a la manca d'inhibidors específics

de les NTPDases i NPPs es va utilitzar un inhibidor més general de l'activitat ATPàsica i ADPàsica, el NF279.

Totes les activitats *in situ* es localitzen principalment a la membrana cel·lular. L'activitat ATPàsica es detecta a les tres línies cel·lulars i és especialment elevada a les cèl·lules ECC-1. L'activitat ADPàsica, és més dèbil i es troba a les tres línies cel·lulars de manera similar. L'activitat AMPàsica es detecta a les línies cel·lulars HEC-1-B i KLE de manera equivalent, però només es detecta en petits grups de cèl·lules ECC-1. L'activitat fosfatasa alcalina únicament es detecta, i molt intensament, a les cèl·lules ECC-1. Els resultats es resumeixen a la **Taula R2**. Les **Figures R1 i R2** mostren imatges representatives d'aquests experiments.

Els experiments d'inhibició amb α,β -meADP indiquen que l'activitat AMPàsica observada és específica de CD73. Les activitats ATPàsica i ADPàsica detectades serien atribuïbles a ecto-nucleotidases de les famílies NTPDasa i NPP, mentre que, l'activitat fosfatasa alcalina detectada provindria d'ecto-nucleotidases de la família de les fosfatases alcalines com per exemple TNAP i PLAP.

	ACTIVITAT ATPàsica	ACTIVITAT ADPàsica	ACTIVITAT AMPàsica	ACTIVITAT FOSFATASA ALCALINA
HEC-1-B	+	+	+++	-
KLE	++	+	++	-
ECC-1	+++	+	+	+++

Taula R2. Intensitat de les activitats ATPàsica, ADPàsica, AMPàsica i fosfatasa alcalina detectades a les línies cel·lulars HEC-1-B, KLE i ECC-1. – activitat nul·la, + activitat baixa, ++ activitat moderada, +++ activitat alta.

R3. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LÍNIES CEL·LULARS D'ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL CRESCUDES EN CONDICIONS BASALS.

Per **detectar i identificar els gens d'interès** expressats a les línies cel·lulars estudiades en condicions basals, es van dur a terme PCRs convencionals.

A continuació, es mostra una taula amb els gens estudiats i l'expressió d'aquests, a cadascuna de les línies cel·lulars (**Taula R3**).

	HEC-1-B	KLE	ECC-1
<i>ENTPD1</i>	X	✓	X
<i>ENTPD2</i>	✓	✓	X
<i>ENTPD3</i>	X	X	X
<i>ENPP1</i>	✓	✓	✓
<i>ENPP3</i>	✓	✓	✓
<i>TNAP</i>	✓	✓	✓
<i>PLAP</i>	✓	✓	✓
<i>CD73</i>	✓	✓	✓
<i>ADA</i>	✓	✓	✓
<i>CD26</i>	✓	✓	✓
<i>ADK</i>	✓	✓	✓
<i>ADORA1</i>	✓	✓	✓
<i>ADORA2A</i>	✓	✓	✓
<i>ADORA2B</i>	✓	✓	✓
<i>ADORA3</i>	X	X	X
<i>P2X1</i>	X	✓	X
<i>P2X2</i>	✓	✓	X
<i>P2X3</i>	X	X	X
<i>P2X4</i>	✓	✓	✓
<i>P2X5</i>	✓	✓	✓
<i>P2X6</i>	X	✓	✓
<i>P2X7</i>	✓	✓	✓
<i>P2Y1</i>	✓	✓	✓
<i>P2Y2</i>	✓	✓	✓
<i>P2Y4</i>	✓	✓	✓
<i>P2Y6</i>	✓	✓	✓
<i>P2Y11</i>	X	X	X
<i>P2Y12</i>	✓	✓	✓
<i>P2Y13</i>	X	X	X
<i>P2Y14</i>	✓	✓	✓

Taula R3. Resum dels resultats obtinguts de l'anàlisi de l'expressió gènica per PCR a les línies cel·lulars HEC-1-B, KLE i ECC-1. ✓ expressió positiva X expressió negativa

Per concloure aquest primer apartat de resultats, presento les **Figures R1 i R2** on es mostra un exemple representatiu dels resultats obtinguts en aquest estudi per cada una de les tècniques realitzades amb les tres línies cel·lulars, demostrant la concordança entre ells.

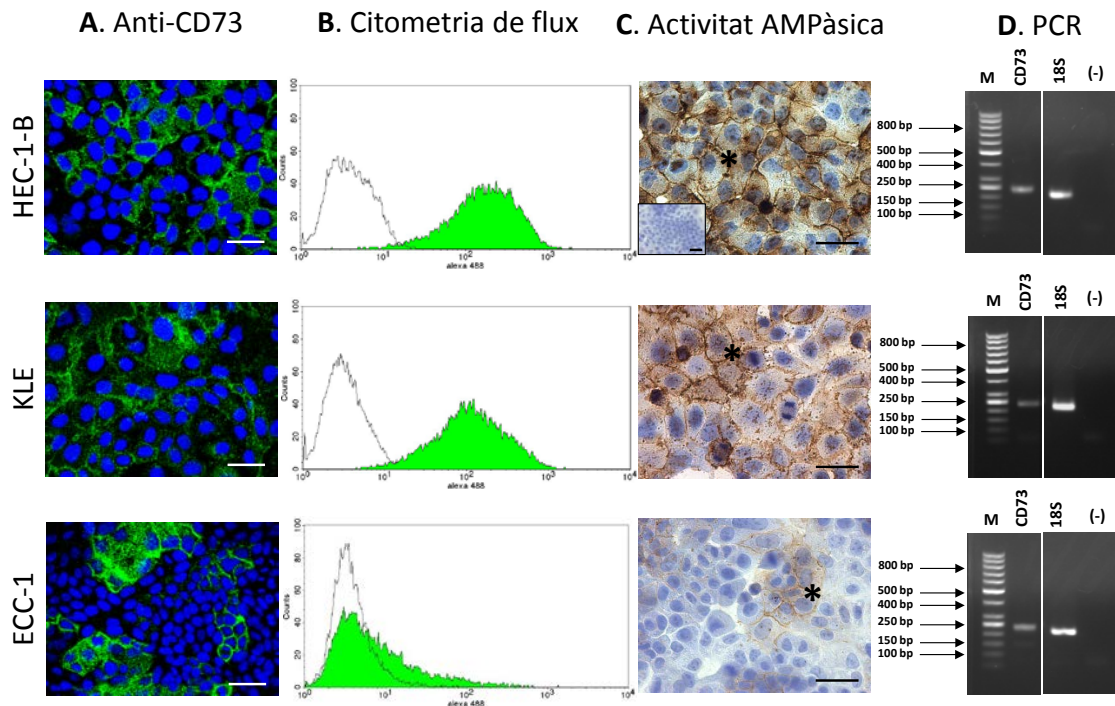


Figura R1. Expressió i activitat de CD73 a les línies cel·lulars humanes d'adenocarcinoma endometrial (HEC-1-B, KLE i ECC-1). A. Immunofluorescència de CD73 (en verd). B. Citometria de flux. C. Activitat enzimàtica AMPàsica *in situ* (asteriscs). El requadre petit correspon a experiments control realitzats en absència del nucleòtid. D. Expressió gènica de CD73 mitjançant PCR. La mida de les barres és de 40 µm. Noteu la concordança entre els resultats obtinguts mitjançant les quatre tècniques.

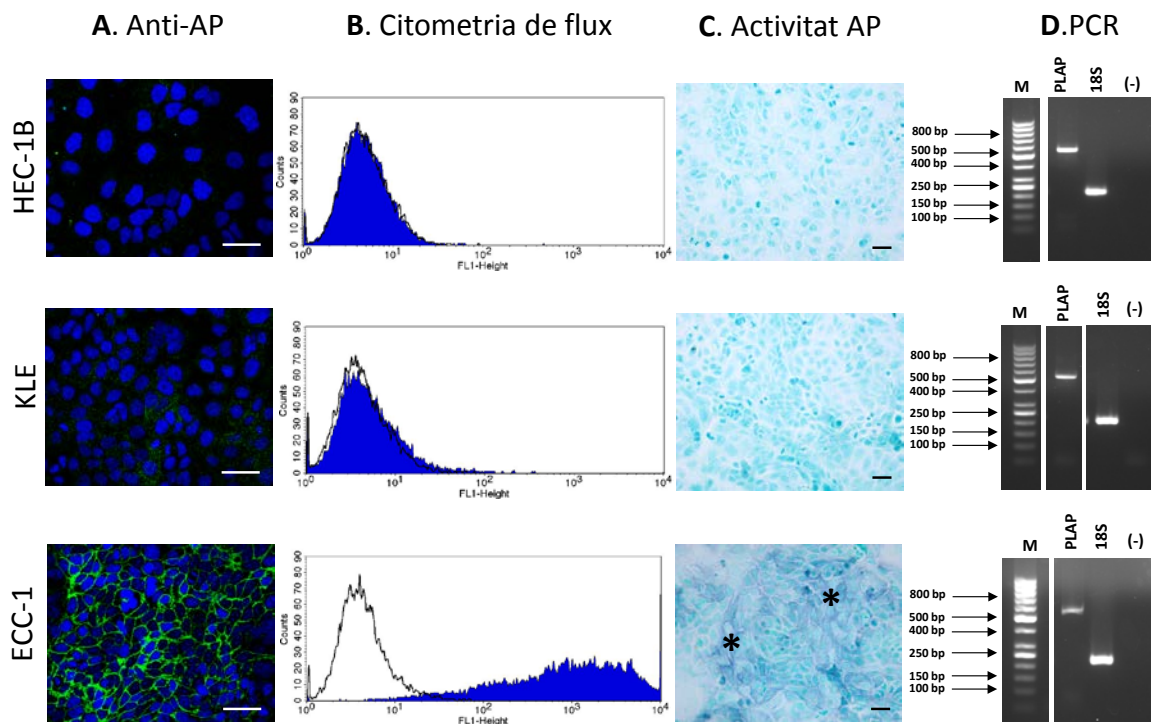


Figura R2. Expressió i activitat de AP en línies cel·lulars humanes d'adenocarcinoma endometrial (HEC-1-B, KLE i ECC-1). A. Immunofluorescència de AP (en verd). B. Citometria de flux. C. Activitat enzimàtica fosfatasa alcalina *in situ* (asteriscs). D. Expressió gènica de PLAP mitjançant PCR. La mida de les barres és de 40 µm.

Segon bloc:

Un cop completada la caracterització en les tres línies cel·lulars en condicions basals, vam decidir estudiar l'efecte de TAM, anastrozol i E_2 en l'expressió i l'activitat enzimàtica de les ecto-nucleotidases i d'altres elements del purinoma. Amb aquest objectiu, les cèl·lules es van fer créixer en presència d'aquests factors en el medi de cultiu.

Els resultats anteriors, del primer bloc, ens van servir per determinar i acotar els estudis d'aquest segon bloc. Així doncs vam decidir:

- Estudiar l'expressió proteica del receptor CD26 i de l'enzim CD73 a la línia cel·lular HEC-1-B, i de l'enzim AP a la línia ECC-1, mitjançant experiments de immunofluorescència.
- Estudiar l'expressió proteica dels enzims CD73 i ADK, i dels receptors CD26 i A_1 d'adenosina a la línia cel·lular HEC-1-B, i l'expressió dels enzims CD73, ADK i AP i del receptor A_1 d'adenosina a la línia cel·lular ECC-1, mitjançant citometria de flux.
- Estudiar l'activitat ATPàsica i fosfatasa alcalina a la línia cel·lular ECC-1, i l'activitat AMPàsica a la línia HEC-1-B, a través d'assaigs d'activitat enzimàtica *in situ*.
- Estudiar el gens d'aquestes proteïnes en les línies cel·lulars on s'expressen.
- Prescindir de la línia KLE i usar únicament les línies HEC-1-B i ECC-1, ja que els resultats obtinguts en cadascun dels estudis usant les línies KLE i HEC-1-B eren molt semblants, i la representació de cèl·lules epitelials d'origen luminal i glandular, proposada inicialment, continuava coberta amb les línies ECC-1 i HEC-1-B, respectivament.

R4. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA EN LÍNIES CEL·LULARS D'ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL CRESCUDES EN PRESENCIA DE TAM, ANASTROZOL O E_2 .

L'expressió de CD73, ADK, AP i dels receptors CD26 i A_1 es va estudiar en línies cel·lulars crescudes en presència de TAM, anastrozol o E_2 durant 72 hores en el medi de cultiu, mitjançant experiments d'immunofluorescència i citometria de flux.

Els resultats de l'estudi s'explicaran en funció de la tècnica utilitzada.

a) Experiments d'immunofluorescència:

Per tal de **localitzar** i **comparar** les **expressions** del receptor CD26 i de les ecto-nucleotidases CD73 i AP entre les cèl·lules crescudes en absència i en presència de TAM o E_2 en el medi de cultiu, es van realitzar experiments d'immunofluorescència i microscòpia confocal. L'expressió del receptor CD26 i

de l'enzim CD73 es va estudiar a la línia cel·lular HEC-1-B, i l'expressió d'AP es va estudiar a la línia cel·lular ECC-1.

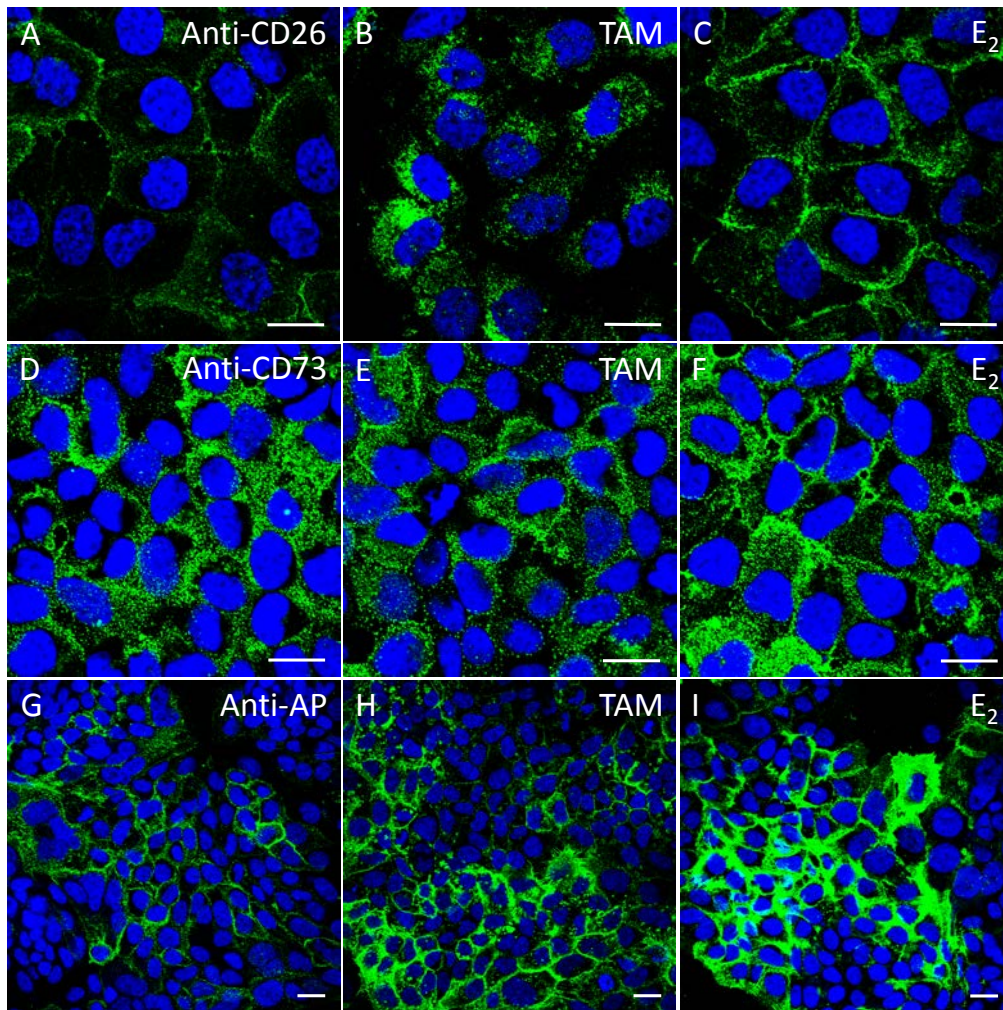


Figura R3. Expressió de CD26 i CD73 a HEC-1-B i de l'AP a ECC-1. Immunolocalització de CD26 (A, B i C), CD73 (D, E i F) i AP (G, H i I) en cèl·lules control (A, D i G) i incubades en presència de TAM (B, E i H) i d'E₂ (C, F i I) durant 72 hores. El receptor CD26 es localitza a la membrana plasmàtica de les cèl·lules control (A) però apareix al citoplasma de les cèl·lules tractades amb TAM (B). Aquest canvi no s'observa a les cèl·lules tractades amb E₂ (C). La localització i els nivells d'expressió de CD73 no varien entre les cèl·lules control (D) i les tractades amb TAM (E) i E₂ (F). L'AP es localitza a la membrana plasmàtica de les cèl·lules no tractades (G). El TAM i l'E₂ no afecten la localització de l'AP però si els nivells d'expressió de la proteïna, que augmenten amb el TAM (H) i especialment amb l'E₂ (I). La mida de les barres és de 20 μm.

El receptor CD26 i les ecto-nucleotidases CD73 i AP es localitzen a la membrana plasmàtica de les cèl·lules control. La localització del receptor CD26 varia en aquelles cèl·lules que han estat incubades en presència de TAM. Així, CD26 desapareix de la membrana i s'acumula intracel·lularment. Ni la localització ni els nivells d'expressió varien en les cèl·lules incubades en presència d'E₂, on CD26 s'expressa a la membrana plasmàtica tal com ho fa a les cèl·lules control. CD73 s'expressa, de manera similar, a la membrana plasmàtica de les cèl·lules no tractades i tractades amb TAM o amb E₂. Així doncs, cap dels dos tractaments té un efecte sobre l'expressió d'aquesta ecto-nucleotidasa. Mentre que la localització de l'AP no varia en cap dels tractaments, els nivells d'expressió augmenten

força en les cèl·lules incubades en presència de TAM o d'E₂, sent superior en aquest últim cas. Els resultats es poden observar a la **Figura R3**.

b) Experiments de citometria de flux:

Per tal de **comparar i quantificar** els **nivells d'expressió** dels enzims CD73, AP i ADK i dels receptors CD26 i A₁ entre les cèl·lules crescudes en absència i en presència de TAM, anastrozol o E₂ en el medi de cultiu, es van dur a terme experiments de citometria de flux. Primer s'explicaran els resultats obtinguts amb les cèl·lules HEC-1-B i després amb les ECC-1.

Els resultats es mostren mitjançant gràfics de barres que representen la ràtio entre la mitjana de l'expressió obtinguda per les cèl·lules incubades amb l'anticòs contra la proteïna a analitzar i la mitjana de l'expressió obtinguda a les mateixes cèl·lules incubades únicament amb el corresponent anticòs secundari. Els resultats es representen respecte el valor normalitzat de les cèl·lules control.

A les cèl·lules HEC-1-B, els nivells d'expressió de CD73 no varien entre les crescudes en condicions basals i les crescudes en presència de TAM, anastrozol o E₂, sent pròxims al 100% en tots els casos (**Figura R4 A**). En canvi, els nivells d'expressió d'ADK disminueixen prop d'un 45% en les cèl·lules tractades amb TAM, mentre que, continuen al voltant del 100% en les cèl·lules tractades amb E₂ (**Figura R4 B**). Els nivells d'expressió de CD26 disminueixen fins al 40% a les cèl·lules tractades amb TAM, i fins al 80% a les cèl·lules tractades amb E₂. En canvi, aquests no varien a les cèl·lules tractades amb anastrozol (**Figura R4 C**). L'expressió del receptor A₁ d'adenosina augmenta més d'un 50% a les cèl·lules tractades amb TAM, mentre que gairebé no varia a les cèl·lules tractades amb E₂ (**Figura R4 D**).

L'efecte de TAM i E₂ en l'expressió de CD73 i CD26 observats per citometria de flux coincideixen amb els observats per immunofluorescència.

A les cèl·lules ECC-1, l'efecte dels tractaments TAM i E₂ en l'expressió de CD73 és feble. Així doncs, els nivells d'expressió de CD73 només disminueixen aproximadament un 10% a les cèl·lules tractades amb TAM i amb E₂ (**Figura R5 A**). Els tractaments amb TAM i E₂ augmenten significativament els nivells d'AP (30% amb TAM i 40% amb E₂), tal com s'havia detectat per immunofluorescència, en canvi, l'anastrozol no els modifica (**Figura R5 B**). Els nivells d'expressió d'ADK disminueixen prop d'un 20% a les cèl·lules tractades amb TAM i aproximadament un 30% a les cèl·lules tractades amb E₂ (**Figura R5 C**). Per últim, mentre que el tractament amb TAM no modifica els nivells d'expressió del receptor A₁ d'adenosina, el tractament amb E₂ els disminueix aproximadament un 30% (**Figura R5 D**).

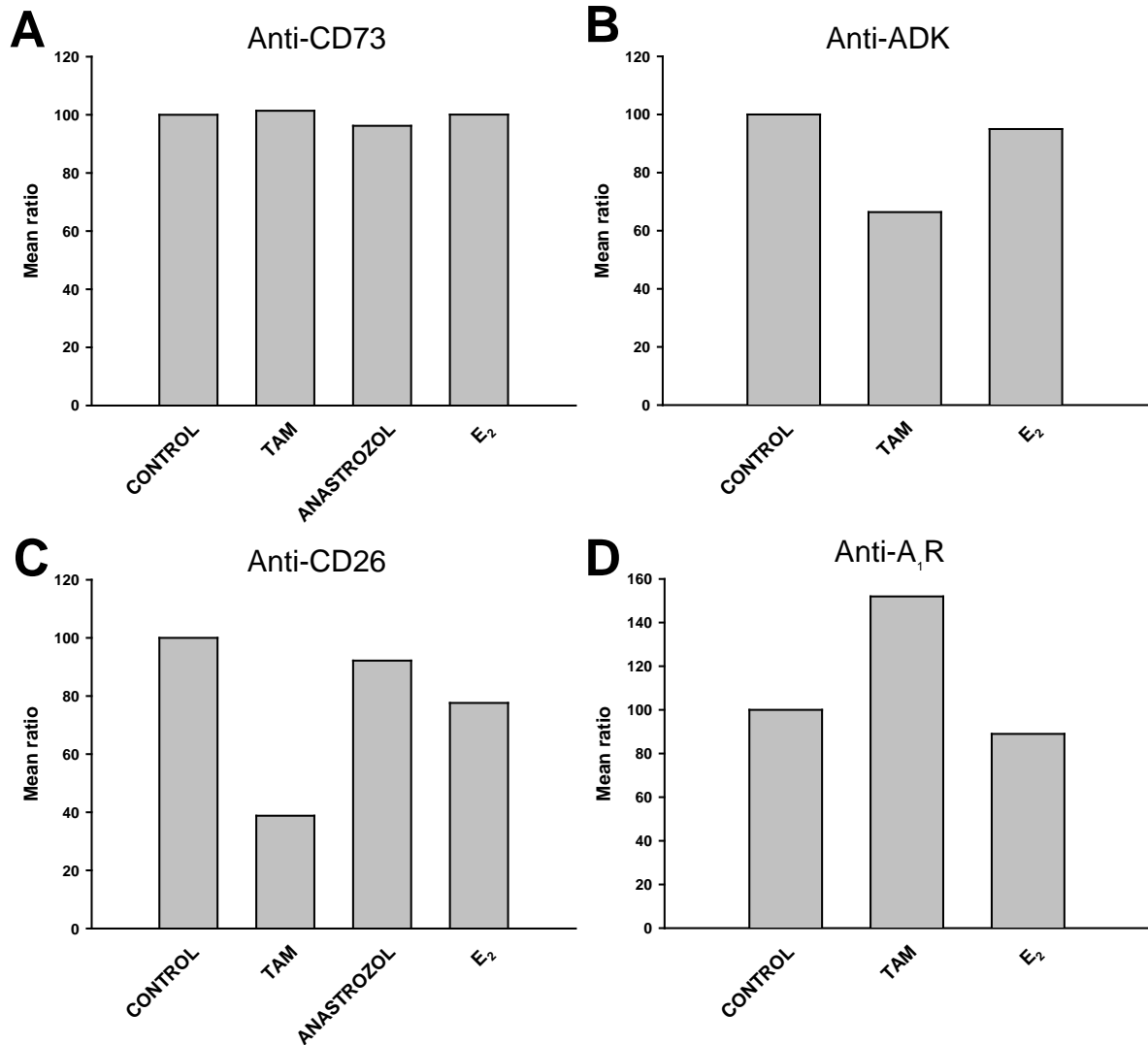


Figura R4. Representació gràfica de la fluorescència (*mean ratio*) obtinguda per citometria de flux amb els anticossos anti-CD73 (A), anti-ADK (B), anti-CD26 (C) i anti-A₁R (D) en cèl·lules HEC-1-B control o tractades amb TAM, anastrozol o E₂ durant 72 hores. Els nivells d'expressió de CD73 no varien amb els tractaments (A). Els nivells d'ADK disminueixen gairebé a la meitat a les cèl·lules tractades amb TAM, mentre que resten igual a les tractades amb E₂ (B). L'expressió de CD26 disminueix més de la meitat a les cèl·lules tractades amb TAM, mentre que, amb E₂ la disminució és lleu. L'expressió no varia a les cèl·lules tractades amb anastrozol (C). Els nivells d'expressió de anti-A₁R augmenten més d'un 50% degut a l'efecte de TAM. Aquest efecte no es produeix amb el tractament amb E₂.

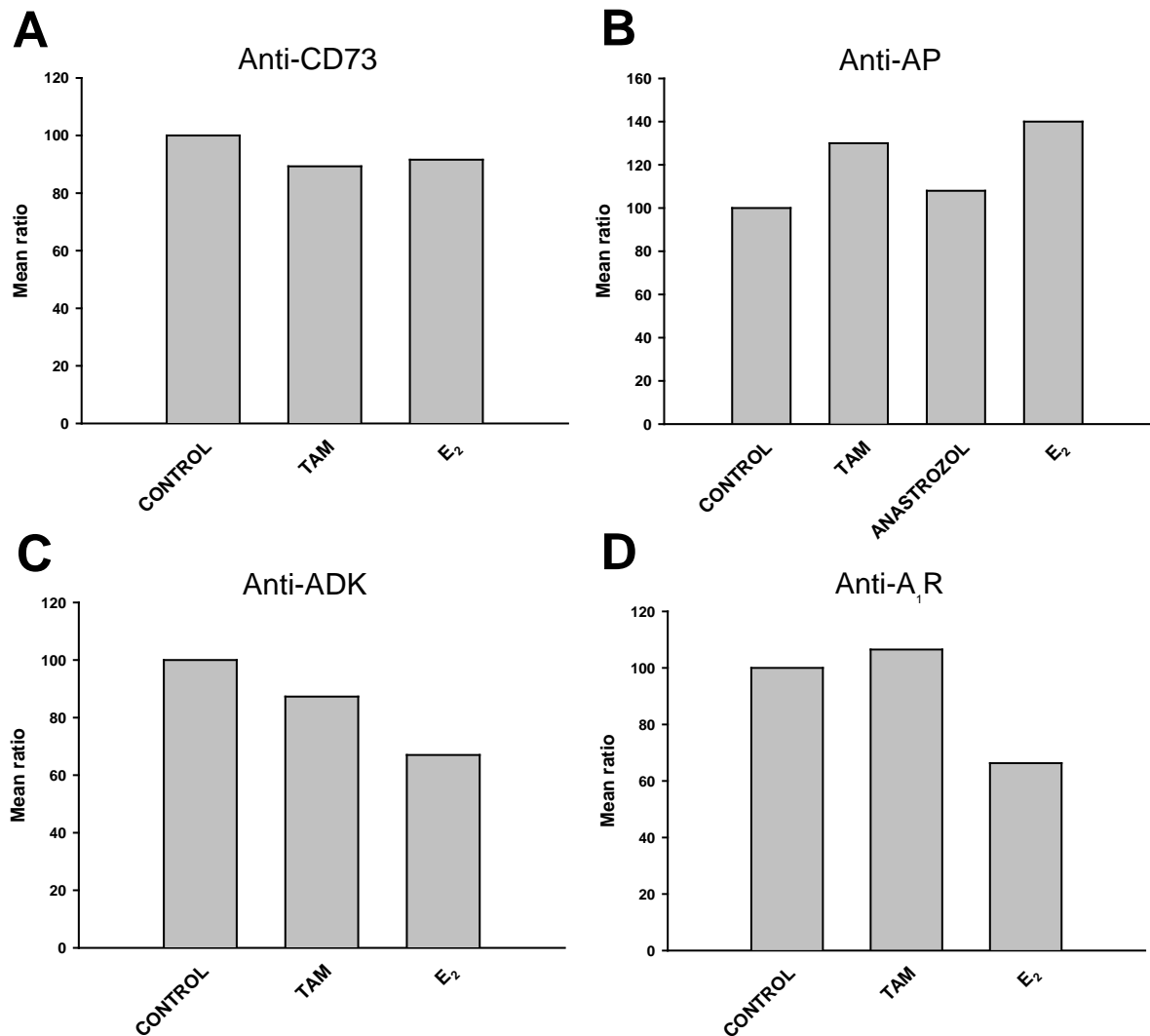


Figura R5. Representació gràfica de la fluorescència (*mean ratio*) obtinguda per citometria de flux amb els anticossos anti-CD73 (A), anti-AP (B), anti-ADK (C) i anti-A₁R (D) en cèl·lules ECC-1 control o tractades amb TAM, anastrozol o E₂ durant 72 hores. TAM i E₂ no modifiquen l'expressió de CD73 (A), en canvi augmenten l'expressió d'AP (B), i disminueixen la d'ADK (C). Només l'E₂ disminueix l'expressió del receptor A₁R (D). L'anastrozol no té cap efecte sobre l'expressió d'AP (B).

R5. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA EN LÍNIES CEL·LULARS D'ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL CRESCUDES EN PRESENCIA DE TAM O E₂.

Per **comparar** les **activitats ATPàsica, AMPàsica i fosfatasa alcalina** entre les cèl·lules no tractades i tractades amb TAM o E₂ durant 72 hores, es van dur a terme assaigs d'activitat *in situ* en cèl·lules fixades. Les activitats ATPàsica i fosfatasa alcalina es van estudiar a la línia cel·lular ECC-1, i l'activitat AMPàsica, a la línia cel·lular HEC-1-B.

En condicions basals, l'activitat ATPàsica es detecta a la membrana plasmàtica de petits grups de cèl·lules ECC-1. L'activitat enzimàtica augmenta i es detecta en un major número de cèl·lules quan aquestes s'incuben en presència de TAM o E₂. L'activitat retorna als nivells de les cèl·lules control

quan s'elimina el TAM del medi d'incubació, indicant que es tracta d'un efecte reversible. L'activitat ATPàsica, però, es manté elevada després de treure l'E₂ del medi (**Figura R6 A-E**). En presència de l'inhibidor NF279, no es formen els precipitats de color marró (resultats no mostrats).

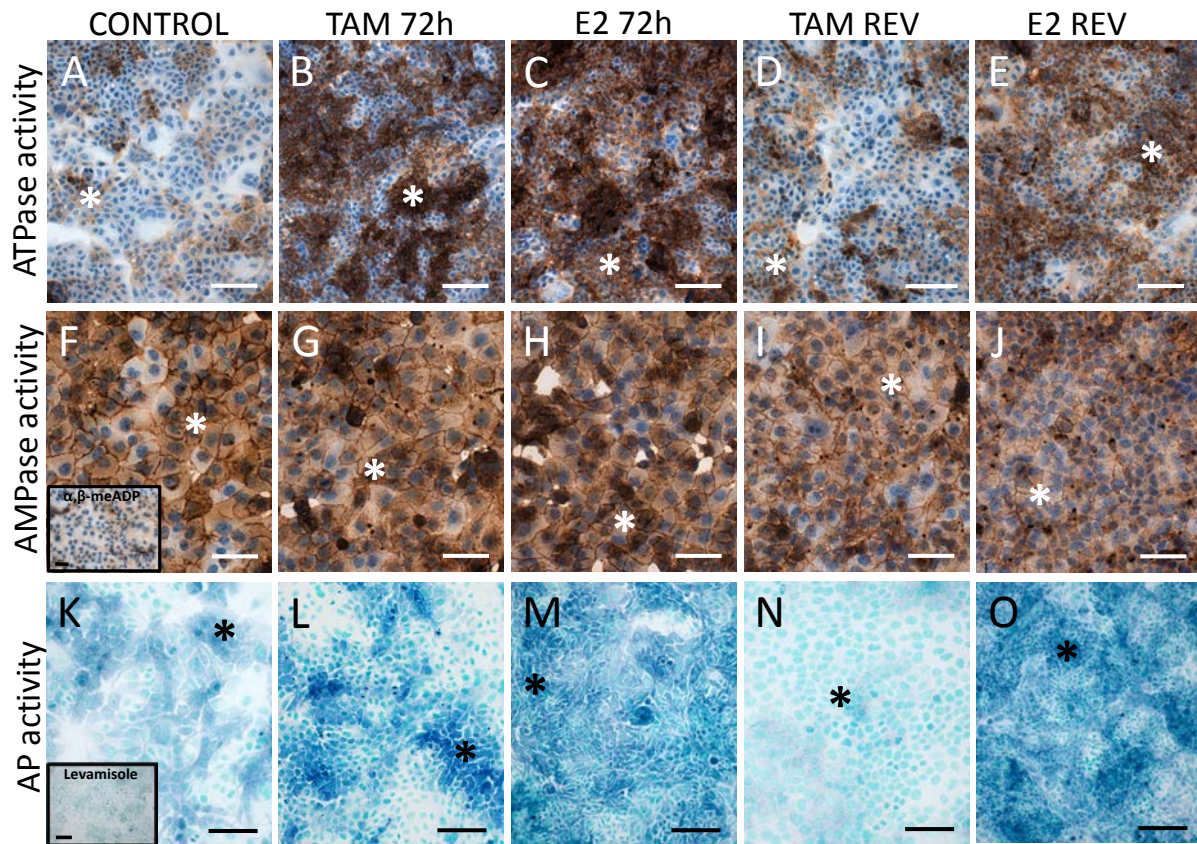


Figura R6. Experiments d'histoquímica enzimàtica. Activitat ATPàsica (A-E), AMPàsica (F-J) i fosfatasa alcalina (K-O) (asteriscs) en cèl·lules ECC-1 (A-E i K-O) i HEC-1-B (F-J) en condicions basals (A, F i K), tractades amb TAM (B, G i L) i E₂ (C, H i M) durant 72 hores i crescudes durant 24 hores després d'eliminar el TAM (D, I i N) i l'E₂ (E, J i O). L'activitat ATPàsica augmenta a les cèl·lules crescudes en presència de TAM o E₂. Aquest augment desapareix en treure el TAM del medi, però es manté en treure l'E₂ (A-E). L'activitat AMPàsica no varia en cap de les condicions experimentals (F-J). El requadre petit a (F) correspon als experiments d'inhibició utilitzant l'α,β-meADP. L'activitat AP, es comporta igual que l'activitat ATPàsica (K-O). El requadre petit a (K) mostra la inhibició de l'activitat AP amb levamisole. La mida de les barres és de 50 μm.

L'activitat AMPàsica detectada coincideix amb la immunolocalització de l'enzim CD73. En concordança amb l'expressió de la proteïna, l'activitat enzimàtica no varia entre les cèl·lules HEC-1-B no tractades i les tractades amb TAM o E₂, ni tampoc després d'eliminar aquests tractaments del medi de cultiu. L'inhibidor α,β-meADP, específic de l'enzim CD73, aboleix completament aquesta activitat (**Figura R6 F-J**).

En condicions basals, l'activitat fosfatasa alcalina, igual que la proteïna AP, es detecta a la membrana plasmàtica de les cèl·lules ECC-1. Aquesta queda completament inhibida pel levamisole. Coincidint amb l'expressió de la proteïna, l'activitat enzimàtica és també més elevada a les cèl·lules incubades

en presència de TAM o d'E₂. Dels experiments de reversió podem concloure que als temps estudiats, l'efecte del TAM és reversible i el de l'E₂ irreversible (Figura R6 K-O).

R6. RESULTATS DE L'ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN LÍNIES CEL·LULARS D'ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL CRESCUDES EN PRESENCIA DE TAM O E₂.

L'expressió dels gens *CD26* i *CD73* va ser estudiada a la línia cel·lular HEC-1-B, i l'expressió de *AP* a la línia ECC-1. Per tal de **comparar i quantificar els nivells d'expressió dels gens *CD26*, *CD73* i *AP*** entre les cèl·lules crescudes en condicions basals i incubades amb TAM o E₂ durant 72 hores, es van dur a terme experiments RT-PCR.

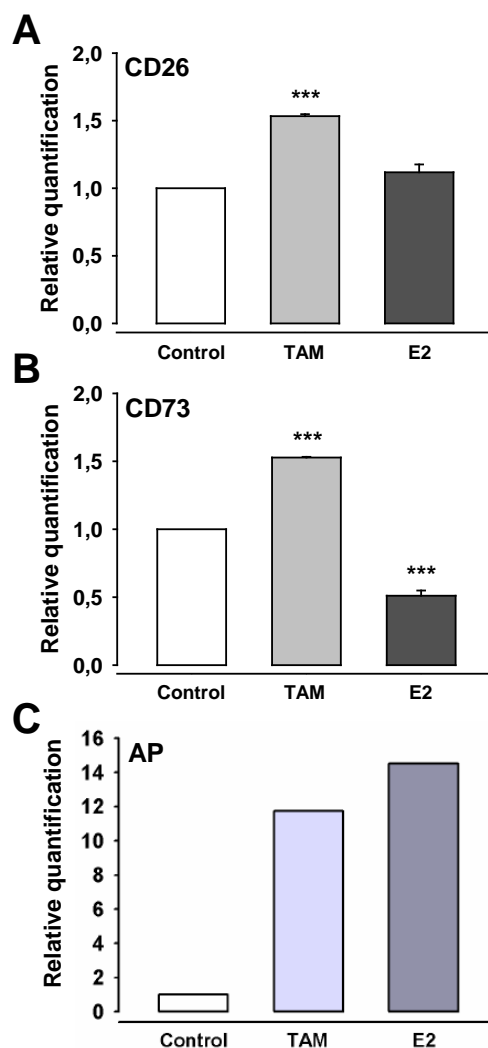


Figura R7. Expressió gènica de *CD26* (A), *CD73* (B) i *AP* (C) mitjançant RT-PCR en cèl·lules HEC-1-B (A i B) i ECC-1 (C) control i tractades amb TAM o E₂ durant 72 hores. El tractament amb TAM augmenta l'expressió dels gens *CD26*, *CD73* i *AP*, mentre que el tractament amb E₂ disminueix l'expressió de *CD73* i augmenta la del gen *AP*.

L'expressió del gen *CD26*, a diferència de l'expressió proteica detectada per citometria de flux, augmenta amb el tractament amb TAM mentre que no varia amb l'E₂ (Figura R7 A). En canvi,

l'expressió de *CD73* es veu modificada per ambdós tractaments: mentre que TAM augmenta l'expressió del gen, l'E₂ la disminueix (**Figura R7 B**). Aquestes diferències no han estat observades a nivell de la proteïna. L'expressió de *AP* es troba augmentada a les cèl·lules ECC-1 després de ser tractades amb TAM, i sobretot amb E₂ (**Figura R7 C**) coincidint amb els canvis detectats en l'expressió de la proteïna.

Tercer bloc

Un cop completat l'estudi amb les línies cel·lulars, vam continuar amb l'estudi de les cèl·lules de l'estroma.

Per obtenir cèl·lules de l'estroma, es van realitzar cultius primaris de tres endometris no patològics seguint el protocol explicat a l'apartat 1.2 de materials i mètodes. Primer de tot, es va comprovar que les cèl·lules obtingudes en els cultius primaris fossin cèl·lules de l'estroma. Per caracteritzar-les, ens vam basar en la morfologia i en l'ús de marcadors específics de cèl·lula de l'estroma com la vimentina.

Un cop caracteritzades les cèl·lules de l'estroma, es van realitzar els següents estudis.

R7. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ PROTEICA EN CULTIUS PRIMARIS DE CÈL·LULES DE L'ESTROMA ENDOMETRIAL HUMÀ CRESCUTS EN CONDICIONS BASALS.

Els estudis duts a terme en teixit, demostren expressió de les ecto-nucleotidases CD39 i CD73 a les cèl·lules de l'estroma endometrial humà (Aliagas et al., 2013a; veure **capítol 2**). Basant-nos en aquests resultats, ens vam plantejar estudiar l'expressió d'aquestes dues proteïnes en els cultius primaris.

Per **caracteritzar l'expressió basal de les ecto-nucleotidases CD39 i CD73** en els cultius primaris, es van realitzar experiments d'immunofluorescència.

CD73 s'expressa a la membrana plasmàtica de les cèl·lules de l'estroma, en canvi, no es detecta expressió de CD39 en aquestes cèl·lules (resultats no mostrats).

R8. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA EN CULTIUS PRIMARIS DE CÈL·LULES DE L'ESTROMA ENDOMETRIAL HUMÀ CRESCUTS EN CONDICIONS BASALS.

Basant-nos en l'expressió de CD39 i CD73 en aquestes cèl·lules, vam decidir estudiar només l'activitat AMPàsica.

Per **estudiar l'activitat AMPàsica** en els cultius primaris, es van realitzar assaigs d'activitat enzimàtica *in situ* en cèl·lules fixades.

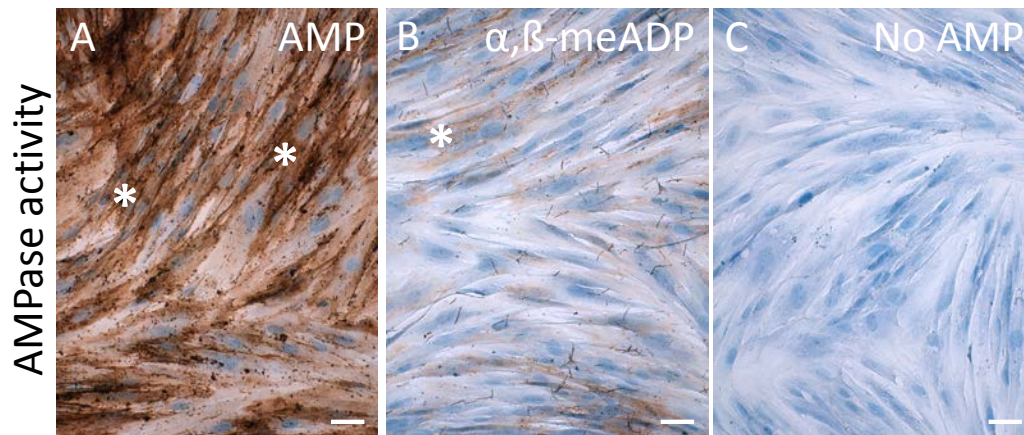


Figura R8. Activitat *in situ* de CD73 mitjançant experiments d'histoquímica enzimàtica en cultius primaris d'estroma endometrial humà. L'activitat AMPàsica es localitza a la membrana plasmàtica de les cèl·lules de l'estroma (asteriscs) (A). Aquesta activitat és totalment abolida per l'inhibidor α,β -meADP (B). En els experiments control, realitzats en absència del nucleòtid AMP, no s'observen precipitats de color marró (C). La mida de les barres és de 50 μm .

L'activitat AMPàsica es detecta a la membrana de les cèl·lules de l'estroma coincidint amb la localització de CD73. Aquesta activitat és abolida per l'inhibidor α,β -meADP, específic de CD73. En els experiments control, realitzats en absència del nucleòtid, no hi ha formació de precipitats de color marró (**Figura R8**).

Quart bloc

R9. ESTUDI DE L'EXPRESSIONI PROTEICA EN CULTIUS PRIMARIS DE CÈL·LULES DE L'ESTROMA ENDOMETRIAL HUMÀ CRESCUTS EN PRESENCIA DE TAM.

Per **estudiar l'efecte de TAM en l'expressió proteica** de les cèl·lules de l'estroma, aquestes es van incubar amb TAM durant 0, 24, 48 i 72 hores.

L'expressió de CD73 es va estudiar mitjançant experiments d'immunofluorescència. A més de CD73, es va estudiar l'expressió de l'enzim ADK i del receptor A_1 d'adenosina mitjançant citometria de flux.

Els resultats obtinguts s'explicaran en funció de la tècnica utilitzada.

a) Experiments d'immunofluorescència

L'expressió de CD73 es detecta a la membrana plasmàtica de les cèl·lules de l'estroma. Els nivells d'expressió de l'enzim no varien entre les cèl·lules control i les tractades amb TAM (**Figura R9**).

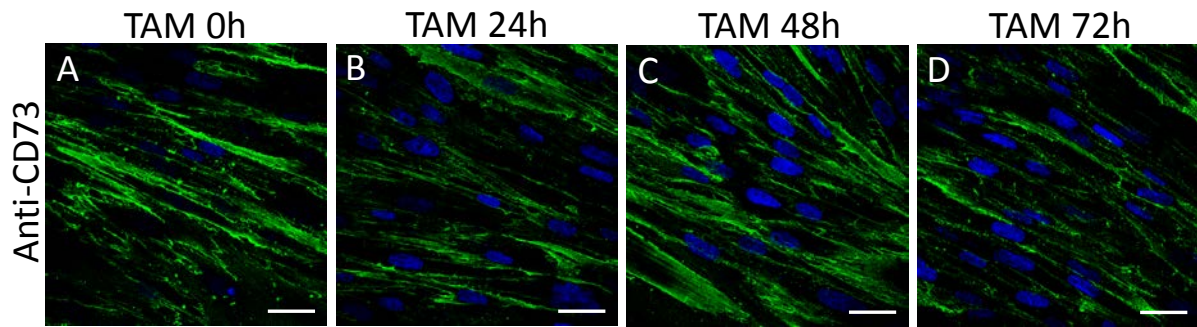


Figura R9. Expressió de CD73 (verd) mitjançant immunofluorescència en cultius primaris d'estroma endometrial sense tractar (A) i tractats amb TAM durant 24 hores (B), 48 hores (C) i 72 hores (D). CD73 s'expressa a la membrana plasmàtica de les cèl·lules de l'estroma. No s'observen canvis en els nivells d'expressió d'aquesta proteïna en les diferents condicions experimentals (A-D). La mida de les barres és de 40 μm .

b) Experiments de citometria de flux

L'expressió de les proteïnes CD73 i ADK i del receptor A_1 d'adenosina, no varia entre els cultius primaris d'estroma endometrial no tractats i tractats amb TAM (**Figura R10**).

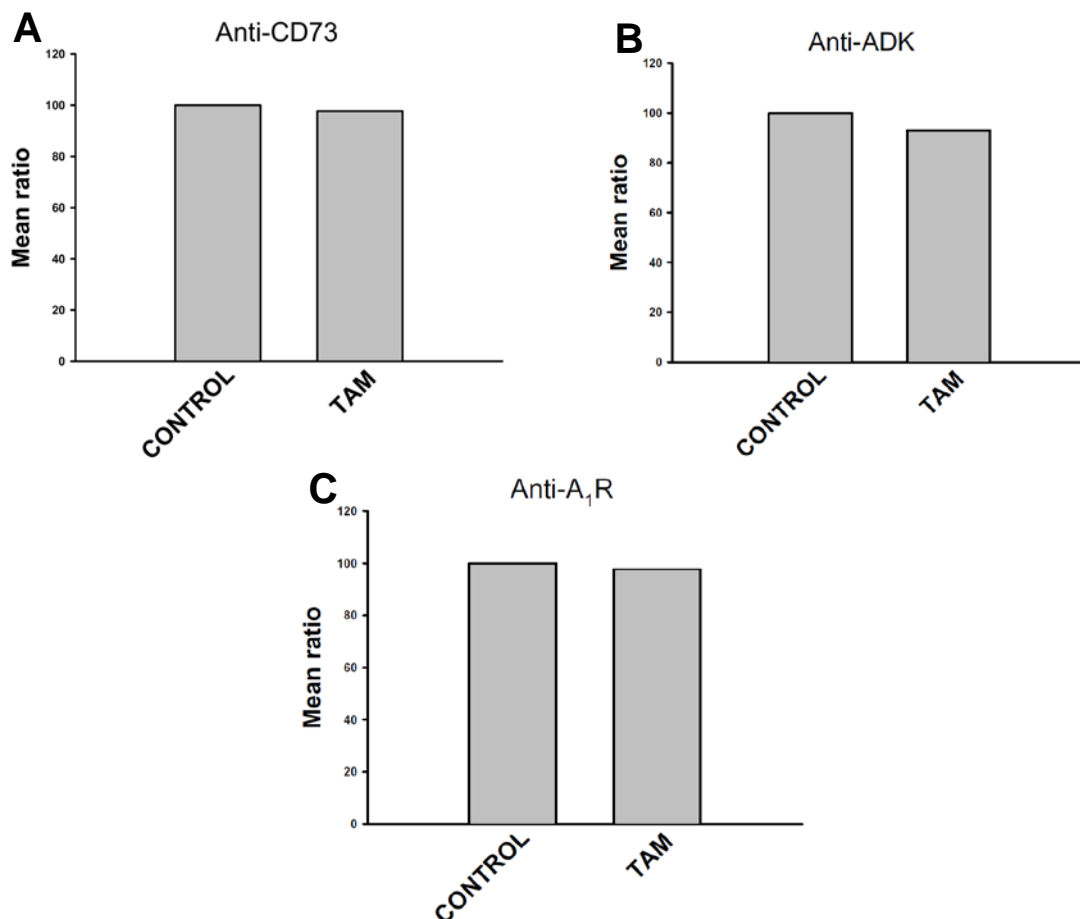


Figura R10. Representació gràfica de la fluorescència (*mean ratio*) obtinguda pels anticòssols anti-CD73 (A), anti-ADK (B), i anti- A_1R (C) en cèl·lules de l'estroma control i tractades amb TAM durant 72 hores. TAM no afecta a l'expressió de cap d'aquestes proteïnes. En els tres casos, l'expressió a les cèl·lules tractades és similar a l'expressió de les cèl·lules control.

R10. ESTUDI DE L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA EN CULTIUS PRIMARIS DE CÈL·LULES DE L'ESTROMA ENDOMETRIAL HUMÀ CRESCUTS EN PRESENCIA DE TAM.

Per estudiar l'efecte de TAM en l'activitat AMPàsica de les cèl·lules de l'estroma, aquestes es van fer créixer en absència i en presència durant 72 hores de TAM.

L'activitat AMPàsica es va estudiar mitjançant assaigs d'activitat enzimàtica *in situ* en cèl·lules fixades.

No es van detectar diferències entre l'activitat AMPàsica dels cultius primaris d'estroma endometrial incubats en absència i en presència de TAM (Figura R11).

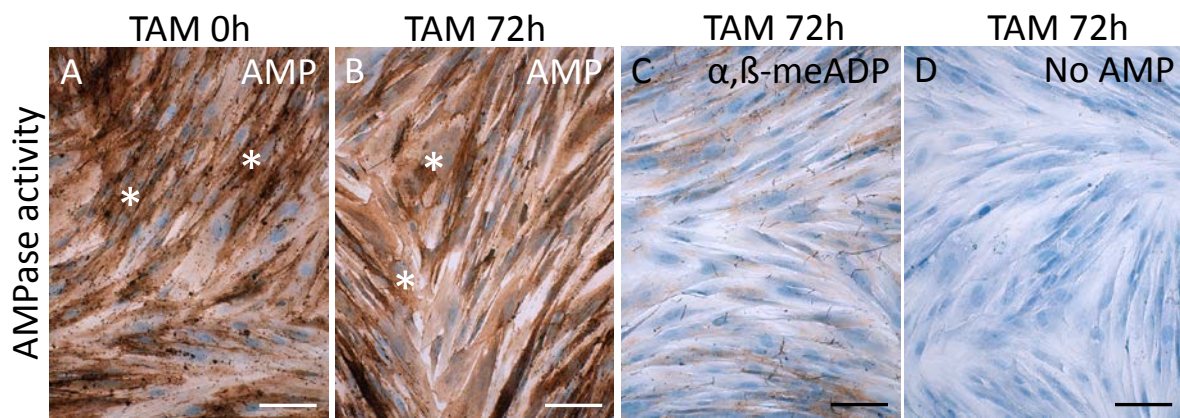


Figura R11. Activitat AMPàsica (asteriscs), detectada mitjançant assaig d'activitat enzimàtica *in situ*, en cultius primaris d'estroma endometrial crescuts en absència (A) i en presència de TAM durant 72 hores (B-D). L'activitat AMPàsica es localitza, de manera similar, a la membrana plasmàtica de les cèl·lules control (A) i tractades amb TAM durant 72 hores (B). L'inhibidor específic α, β -meADP, aboleix completament aquesta activitat (C). En absència del nucleòtids no s'observen precipitats de color marró (D). La mida de les barres és de 100 μm .

B. SEGON APARTAT

CD26, receptor expressat majoritàriament a la membrana plasmàtica de les cèl·lules epitelials, té com a principal lligand fisiològic l'ecto-enzim adenosina deaminasa (ecto-ADA), el qual hidrolitza l'adenosina formant inosina (revisat per Yegutkin, 2008). Per tant es troba implicat en el control dels nivells d'adenosina extracel·lulars.

Tal com s'observa a la **Figura R3**, el tractament de les cèl·lules HEC-1-B amb TAM comporta un canvi en la localització cel·lular del receptor CD26, expressat a la membrana plasmàtica en condicions basals i al citoplasma després del tractament. Tot i disminuir l'expressió de CD26 a la membrana d'aquestes cèl·lules (**Figura R4 C**), amb el TAM l'expressió gènica augmenta (**Figura R7**). Es desconeix, però, el mecanisme pel qual es produeix aquest fenomen.

R1. EFECTES DEL TAMOXIFEN EN LA LOCALITZACIÓ I L'EXPRESSIÓ DE CD26

Per caracteritzar l'efecte del TAM en la localització i l'expressió del receptor CD26 al llarg del temps, es va estudiar d'entrada la seva expressió i la possible localització als lisosomes. Es va utilitzar l'anticòs anti-Lamp1 en experiments d'immunofluorescència duts a terme en cèl·lules crescudes en presència de TAM durant 0, 24, 48 i 72 hores en el medi d'incubació i 24 hores després d'eliminar TAM del medi havent estat present durant 72 hores.

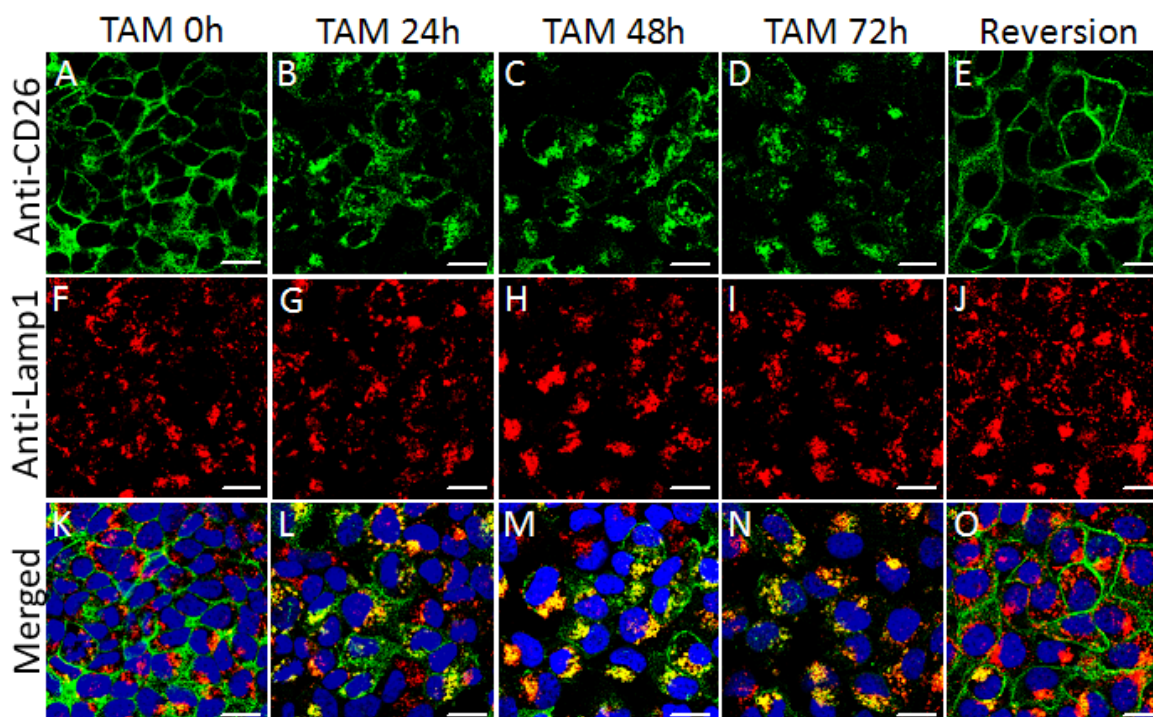


Figura R12. Efecte del TAM en la localització i l'expressió del receptor CD26 al llarg del temps. Immunolocalització de CD26 (en verd) i Lamp1 (en vermell) en cèl·lules HEC-1-B crescudes en condicions basals (A, F i K) i en presència de TAM durant 24 hores (B, G i L), 48 hores (C, H i M) i 72 hores (D, I i N) i crescudes 24 hores després d'eliminar el TAM del medi (E, J i O). La colocalització entre CD26 i Lamp1 es mostra en groc. El TAM indueix un canvi en la localització i l'expressió del receptor CD26 al llarg del temps, que de manera progressiva disminueix de la membrana plasmàtica i augmenta als lisosomes. Quan s'elimina el TAM desapareix aquest efecte. La mida de les barres és de 30 µm.

A les cèl·lules HEC-1-B control (0 hores d'exposició al fàrmac), el receptor CD26 es localitza principalment a la membrana plasmàtica i la colocalització entre els anticossos CD26 i Lamp1 és molt baixa. A les 24 hores d'exposició, s'observa menys presència del receptor CD26 a la membrana plasmàtica i més als lisosomes, on trobem colocalització entre els anticossos CD26 i Lamp1. A les 48 hores, continua disminuint la presència del receptor CD26 a la membrana plasmàtica i augmentant als lisosomes. A les 72 hores de tractament, el receptor CD26 desapareix de la membrana plasmàtica i el trobem localitzat majoritàriament als lisosomes, on la colocalització és màxima. A les cèl·lules crescudes durant les 24 hores després d'eliminar el tractament del medi, la localització de CD26 i la colocalització entre els anticossos CD26 i Lamp1 són semblants a aquelles detectades a les cèl·lules control (**Figura R12**).

Aquests resultats indiquen que TAM modifica la localització del receptor CD26, que de manera progressiva, disminueix de la membrana plasmàtica i augmenta als lisosomes. A més, aquest tractament és reversible.

Per esbrinar si el receptor CD26 s'associa amb d'altres orgànuls cel·lulars, es van realitzar estudis de colocalització mitjançant experiments d'immunofluorescència dobles combinant l'anticòs anti-CD26 amb marcadors específics de lisosomes (anti-Lamp1), endosomes primerencs (anti-EEA1), endosomes tardans (anti-Rab11) i autofagosomes (anti-LC3B) (veure **Taula M1**).

El receptor CD26 es localitza als lisosomes com es veu per la colocalització entre els anticossos anti-Lamp1 i anti-CD26 (**Figura R13**), però no ho fa a cap de les altres estructures subcel·lulars estudiades com són els endosomes primerencs, les vesícules endocítiques o els autofagosomes.

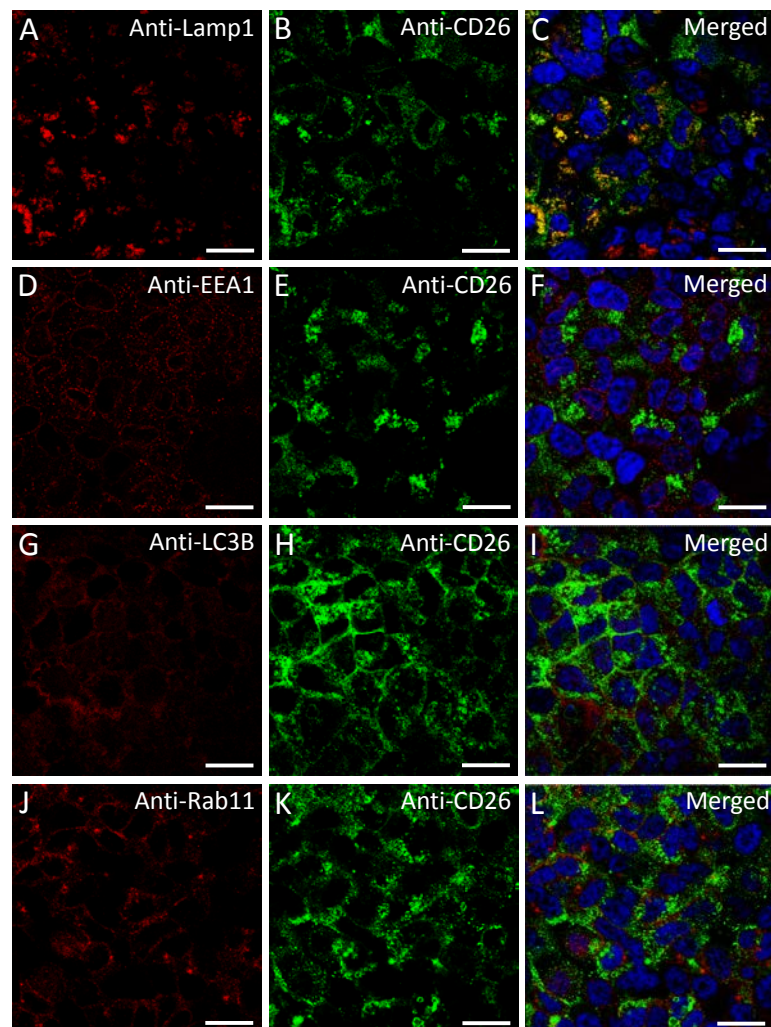


Figura R13. Immunofluorescència doble amb l'anticòs anti-CD26 (B, E, H i K) (en verd) i els anticossos anti-Lamp1 (A), anti-EEA1 (D), anti-LC3B (G) i anti-Rab11 (J) (en vermell) en cèl·lules HEC-1-B tractades amb TAM durant 72 hores. Les imatges de fluorescència combinades (C, F, I i L) mostren que l'anticòs anti-CD26 colocalitza amb l'anticòs anti-Lamp1 (C) però no ho fa amb els anticossos anti-EEA1 (F), anti-LC3B (I) i anti-Rab11 (L). La mida de les barres és de 20 µm.

R2. TAM AUGMENTA ELS NIVELLS DE PROTEÏNA CD26 TOTAL

Per estudiar els efectes del TAM i de l'E₂ en l'expressió de la proteïna total, es van realitzar experiments WB.

La quantitat de proteïna CD26 total detectada és major a les cèl·lules tractades amb TAM en comparació amb les cèl·lules control o les tractades amb E₂ (**Figura R14**). Així doncs, el TAM augmenta els nivells de proteïna CD26 total. Aquest efecte no es produeix amb l'E₂.

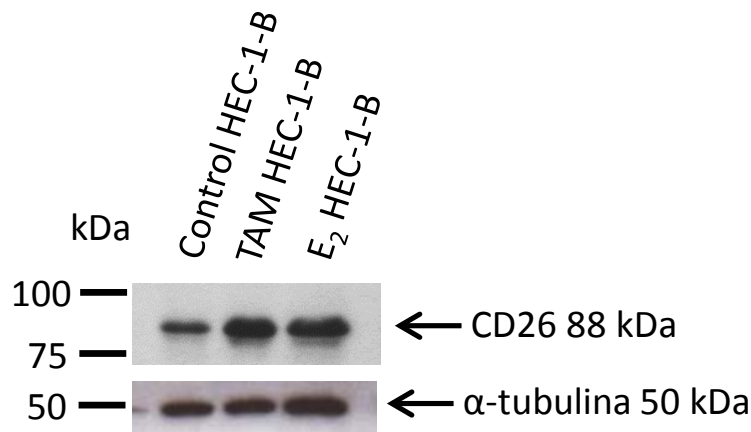


Figura R14. Expressió de CD26 mitjançant WB en cèl·lules HEC-1-B control i tractades amb TAM o E₂ durant 72 hores. Les cèl·lules tractades amb TAM expressen més CD26. L'α-tubulina es va utilitzar com a control de càrrega.

Per confirmar l'augment en l'expressió de la proteïna CD26 en les cèl·lules tractades amb TAM es va quantificar la intensitat de fluorescència dels anticossos anti-CD26 i anti-Lamp1 en imatges de microscòpia confocal realitzades en cèl·lules HEC-1-B tractades amb TAM durant 72 hores.

La intensitat de fluorescència tant de CD26 com de Lamp1 és més elevada a les cèl·lules tractades amb TAM que a les cèl·lules control o tractades amb E₂ indicant que el TAM augmenta tant la proteïna CD26 total com el número de lisosomes (**Figura R15**). Aquesta última dada concorda amb els resultats d'altres grups els quals demostren un increment significatiu del número de lisosomes a l'epiteli mamari de pacients amb càncer de mama tractades amb TAM durant 30 dies abans de l'extracció (Tanaka, 1997).

Així doncs, el tractament de les cèl·lules HEC-1-B amb TAM provoca un canvi en la localització del receptor CD26, de la membrana plasmàtica als lisosomes a més d'augmentar l'expressió de la proteïna CD26 total i el número de lisosomes en aquestes cèl·lules. Aquests resultats indicarien que el TAM promou la degradació del receptor CD26.

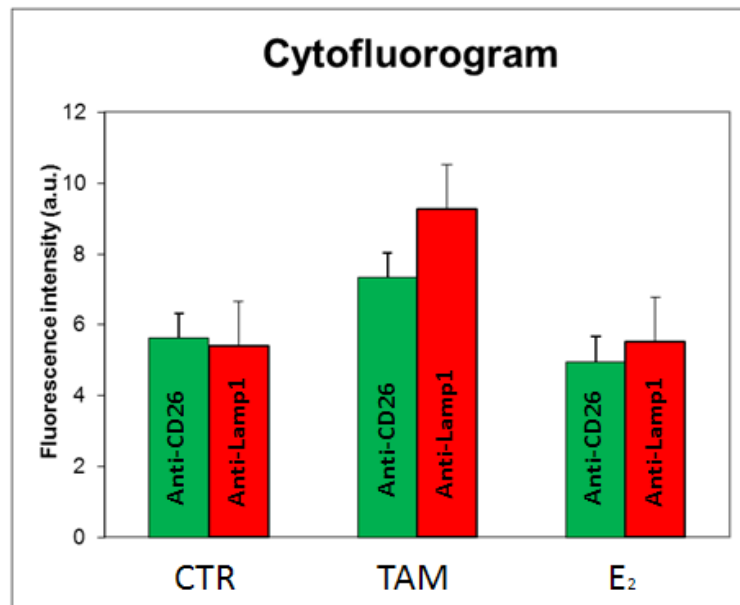


Figura R15. Intensitat de fluorescència dels anticossos anti-CD26 (verd) i anti-Lamp1 (vermell) mesurada en cèl·lules HEC-1-B control i tractades amb TAM o E₂ durant 72 h. La fluorescència mesurada per CD26 i Lamp1 és més elevada a les cèl·lules tractades amb TAM que a les cèl·lules control o tractades amb E₂. (a.u. = *arbitrary units*).

R3. TAM PROMOU LA DEGRADACIÓ DEL RECEPTOR CD26 ALS LISOSOMES

Per comprovar si el TAM indueix la degradació del receptor CD26 als lisosomes, es va mesurar la quantitat de CD26 present als lisosomes en imatges de microscòpia confocal realitzades en cèl·lules HEC-1-B control i tractades amb TAM o E₂ durant 72 hores, temps en que la colocalització observada a les fotografies és màxima.

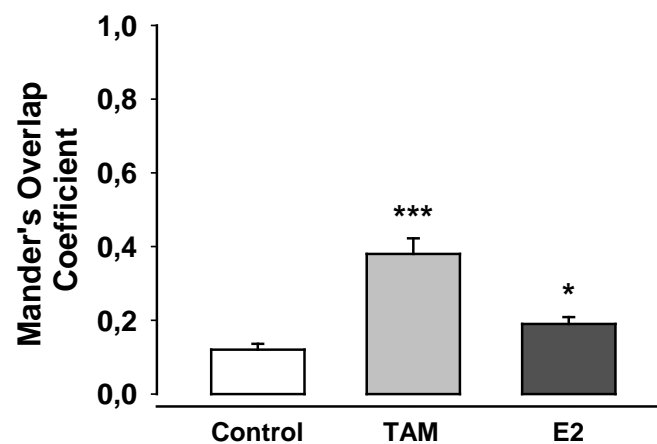


Figura R16. Quantificació de la colocalització entre CD26 i Lamp1 en cèl·lules HEC-1-B control i tractades amb TAM o E₂ durant 72 hores. La colocalització entre ambdós anticossos és significativament més elevada a les cèl·lules tractades (TAM i E₂) en comparació amb les cèl·lules control.

La colocalització entre els dos senyals mesurats (anti-CD26 i anti-Lamp1) és significativament més elevada en les cèl·lules tractades amb TAM o amb E₂ en comparació amb les cèl·lules control, essent el tractament amb TAM on s'observa un percentatge de colocalització major (**Figura R16**). Aquests resultats indicarien que TAM promou la degradació del receptor CD26 als lisosomes.

Per comprovar aquesta hipòtesi, es va bloquejar la síntesi proteica amb **cicloheximida** (CHX) durant 24 hores amb la finalitat d'estudiar l'expressió de la proteïna ja sintetitzada. Simultàniament, les cèl·lules es van incubar amb TAM. Posteriorment, es va estudiar l'expressió del receptor CD26 a la membrana plasmàtica i als lisosomes mitjançant experiments d'immunofluorescència.

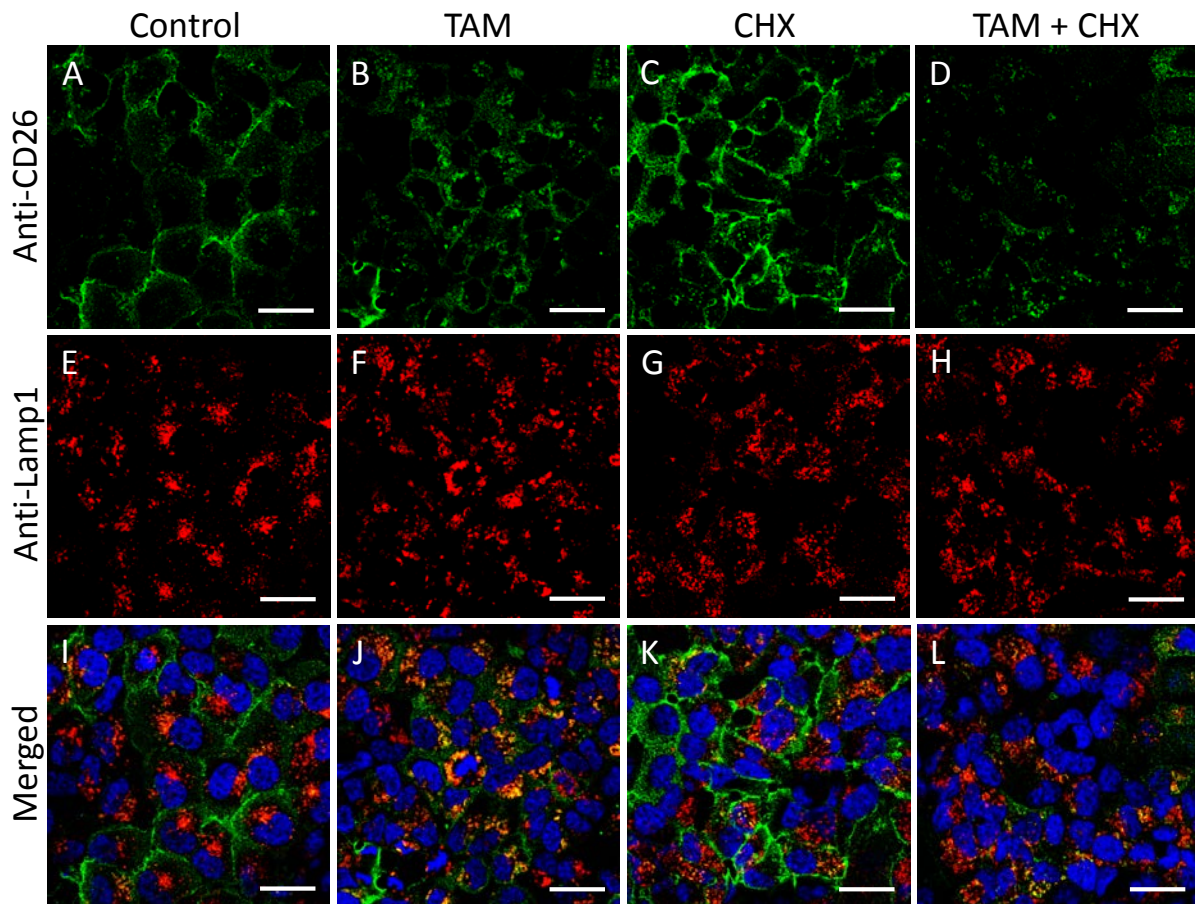


Figura R17. Expressió del receptor CD26 (en verd) i dels lisosomes (en vermell) en cèl·lules HEC-1-B control (A, E i I), incubades amb TAM (B, F i J), amb CHX (C, G i K) i amb TAM i CHX (D, H i L). La durada d'ambdós tractaments és de 72 hores. Les imatges (I-L) corresponen a la superposició de les imatges (A-D) amb les imatges (E-H) respectivament. El receptor CD26 es localitza a la membrana plasmàtica de les cèl·lules control i de les tractades amb CHX, mentre que es troba als lisosomes de les cèl·lules tractades amb TAM. L'expressió del receptor CD26 és molt baixa en les cèl·lules tractades amb TAM i CHX, detectant-se principalment als lisosomes, indicant que el receptor està sent degradat. La mida de les barres és de 30 µm.

A les cèl·lules control, el receptor CD26 es localitza principalment a la membrana plasmàtica i no es troba als lisosomes, és per això que no s'observen punts de colocalització entre els receptor CD26 i Lamp1 (**Figura R17 I**). En canvi, a les cèl·lules tractades amb TAM durant 24 hores, el receptor CD26 es troba majoritàriament localitzat als lisosomes (**Figura R17 J**). A les cèl·lules tractades amb CHX, el

receptor CD26 es troba expressat a la membrana plasmàtica de manera similar a com ho fa a les cèl·lules control, i es localitza també als lisosomes, indicant que es produeix la degradació basal de la proteïna, però s'observen menys punts de colocalització que en les cèl·lules tractades amb TAM, on la degradació es produeix de manera més accelerada (**Figura R17 K**). Quan es combinen ambdós tractaments, l'expressió del receptor CD26 detectada és molt baixa, al no sintetitzar-se proteïna de nou, però la existent es localitza pràcticament tota als lisosomes, indicant que s'envia a degradar (**Figura R17 L**). Aquests resultats confirmen la hipòtesi que TAM indueix la degradació del receptor CD26 als lisosomes.

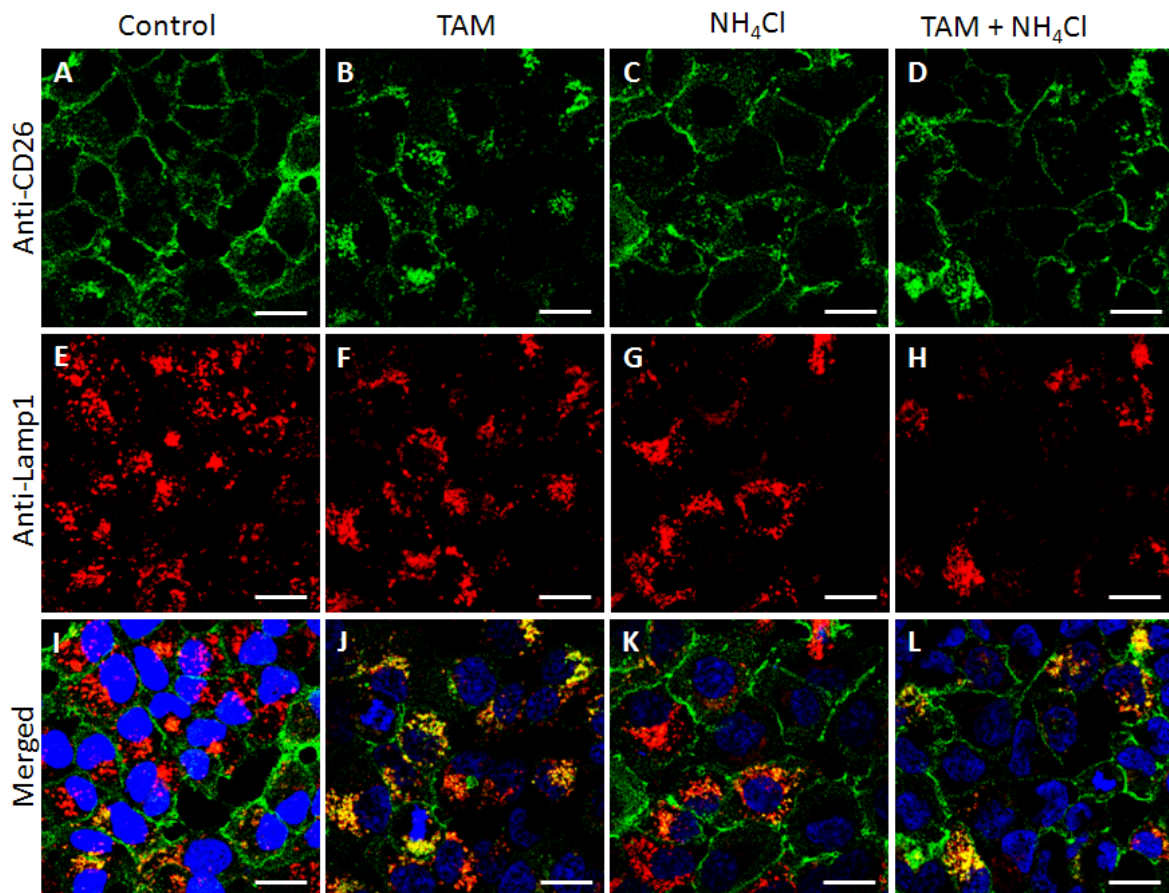


Figura R18. Localització del receptor CD26 (en verd) i de Lamp1 (en vermell) en cèl·lules HEC-1-B control (A, E i I) i tractades amb: TAM (B, F i J), NH_4Cl (C, G i K), i TAM + NH_4Cl (D, H i L). El color groc de les imatges correspon a la colocalització entre CD26 i Lamp1. El receptor CD26 es localitza a la membrana plasmàtica de les cèl·lules control i de les cèl·lules tractades amb NH_4Cl , mentre que es troba majoritàriament als lisosomes en les cèl·lules tractades amb TAM. A les cèl·lules incubades amb els dos tractaments, CD26 es localitza a la membrana i en menor part als lisosomes. La mida de les barres és de 20 μm .

Per investigar el paper de la degradació lisosomal, es va inhibir la funció dels lisosomes amb NH_4Cl . Posteriorment es va analitzar la localització de CD26 als lisosomes per immunofluorescència en cèl·lules HEC-1-B tractades amb TAM 48 hores i amb NH_4Cl 6 hores (de les 42 a les 48 hores). Vam pensar que si la disminució de CD26 a la membrana plasmàtica induïda per TAM és deguda a la degradació lisosomal, inhibint aquest procés s'hauria de restablir la presència de CD26 a la

membrana. Efectivament, el tractament amb NH_4Cl i TAM impedeix que CD26 desaparegui de la membrana (**Figura R18**).

A les cèl·lules control, el receptor CD26 es localitza principalment a la membrana plasmàtica (**Figura R18 I**). A les cèl·lules tractades amb TAM, la presència del receptor CD26 disminueix a la membrana plasmàtica i augmenta als lisosomes (**Figura R18 J**). A les cèl·lules tractades amb NH_4Cl , CD26 es troba localitzat a la membrana plasmàtica, de manera similar a les cèl·lules control (**Figura R18 K**). A les cèl·lules tractades amb TAM i NH_4Cl , el receptor es localitza majoritàriament a la membrana plasmàtica tot i que encara s'observen alguns punts de colocalització amb els lisosomes (**Figura R18 L**). En aquest cas els lisosomes són menys nombrosos que a les cèl·lules control.

R4. TAM INDUEIX LA DEGRADACIÓ DE CD26 PER LA VIA DE L'ENDOCITOSI

La via per la qual TAM indueix la degradació de CD26 no es coneix. En aquest treball hem explorat la via de l'endocitosi com a possible mecanisme a través del qual es produeix aquest fenomen. Per dur a terme aquest estudi, es van realitzar experiments d'immunofluorescència en cèl·lules HEC-1-B tractades amb TAM durant 24 hores i amb M β CD (inhibidor de l'endocitosi) durant 2 hores (de les 22 a les 24 hores).

A les cèl·lules control, el receptor CD26 s'expressa principalment a la membrana plasmàtica i en menor part es localitza als lisosomes (**Figura R19 C**). A les cèl·lules tractades 2 hores amb M β CD, CD26 s'expressa principalment a la membrana plasmàtica però, en aquest cas, hi ha menor quantitat de lisosomes (**Figura R19 F**). A les cèl·lules tractades amb TAM durant 24 hores, l'expressió del receptor a la membrana plasmàtica es troba disminuïda en comparació amb les cèl·lules control, i la localització als lisosomes és màxima (**Figura R19 I**). A les cèl·lules tractades simultàniament amb M β CD i TAM, CD26 s'expressa a la membrana plasmàtica, de manera similar a la situació control, i als lisosomes on la colocalització entre CD26 i Lamp1 és menor que en les cèl·lules control (**Figura R19 L**). Sembla doncs, que en presència de TAM el receptor CD26 és endocitat i es dirigeix als lisosomes, però en afegir M β CD el receptor deixa de ser endocitat i resta expressat a la membrana. La proteïna que detectem als lisosomes sembla ser la proteïna endocitada prèviament a l'addició de M β CD al medi. De fet, pràcticament tota la proteïna no expressada a la membrana plasmàtica es localitza als lisosomes.

Així doncs, si inhibim l'endocitosi tampoc es produeix la internalització de CD26, indicant que el TAM indueix la degradació del receptor CD26 als lisosomes per la via de l'endocitosi.

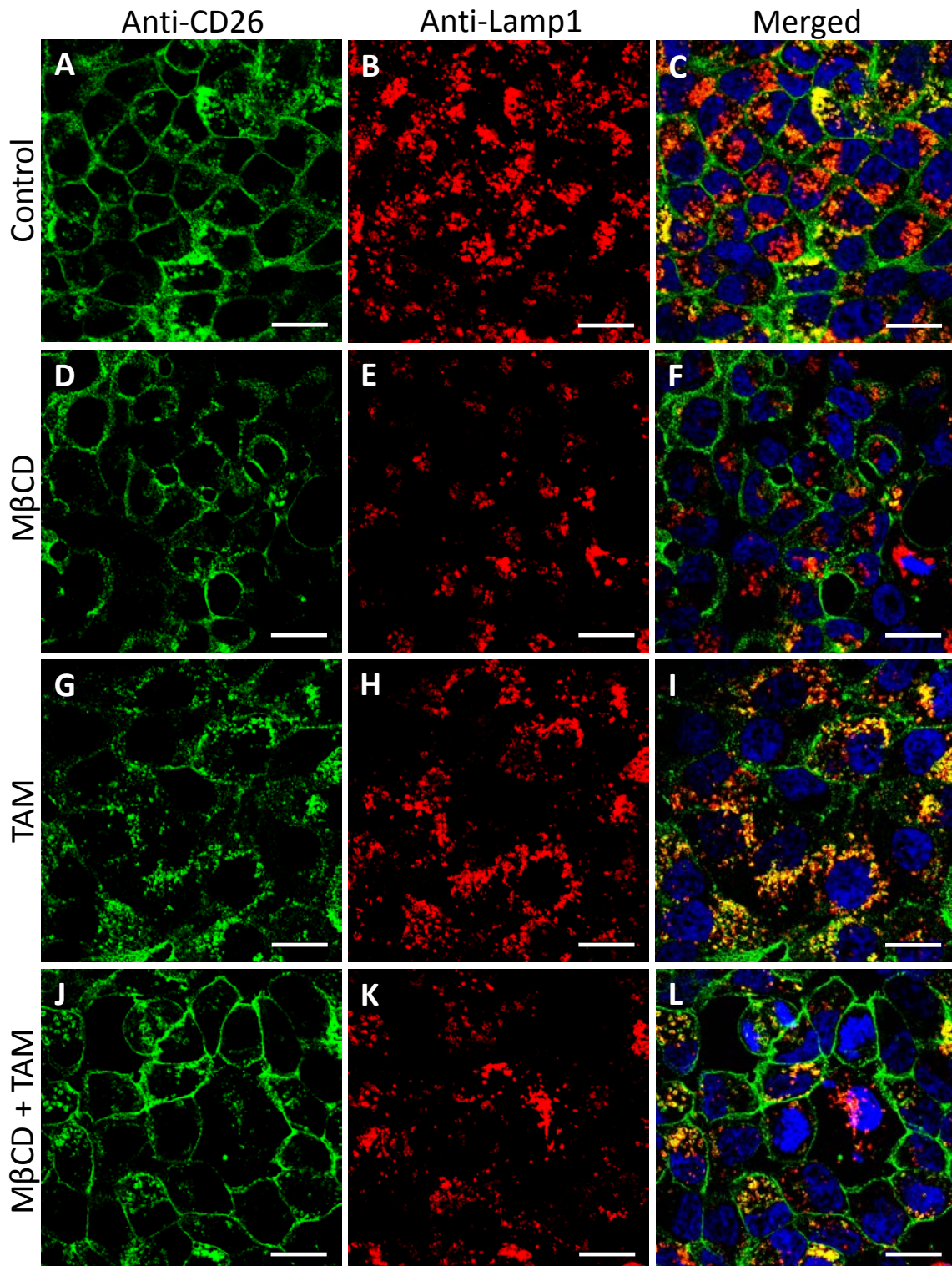


Figura R19. Colocalització entre el receptor CD26 (en verd) i Lamp1 (en vermell) en cèl·lules HEC-1-B control (A-C) i tractades amb: M β CD (D-F), TAM (G-I) i M β CD + TAM (J-L). La colocalització entre CD26 i Lamp1 es mostra en groc. El receptor CD26 s'expressa a la membrana de les cèl·lules control i de les cèl·lules tractades amb M β CD, i amb M β CD i TAM. En canvi, s'expressa majoritàriament als lisosomes en les cèl·lules tractades amb TAM. A les cèl·lules tractades amb M β CD i TAM, l'expressió de CD26 és similar a la de les cèl·lules control. La mida de les barres és de 20 μ m.

CAPÍTOL 4. DISCUSSIÓ

El CE és el càncer més freqüent del tracte genital femení. Aprofundir en el coneixement dels mecanismes patogènics que indueixen carcinogènesi a l'endometri és de gran interès per als investigadors. Diversos estudis demostren que els estrògens i els SERMS, especialment el TAM, estan implicats en la carcinogènesi endometrial (revisat per Shang, 2006). Així, per exemple, l'administració prolongada de TAM es relaciona amb diverses patologies endometrials, incloses el càncer d'endometri (revisat per Cohen, 2004) i n'augmenta el risc (revisat per Smith et al., 2000). No es coneixen, però, els mecanismes implicats en aquest fenomen. Així doncs, el nostre objectiu ha estat aclarir si l'expressió de les ecto-nucleotidases es veu afectada pel TAM, i si aquests enzims es relacionen amb la carcinogènesi endometrial induïda pel TAM. En aquest estudi hem inclòs també l'anastrozol, fàrmac utilitzat en el tractament del càncer de mama el qual a diferència del TAM inhibeix l'aromatasa impedit així la síntesi d'estrògens, i l'E₂ en ser una de les principals hormones que regulen les funcions endometrials.

Durant la primera part d'aquest estudi, hem caracteritzat mitjançant tècniques immunològiques, moleculars i d'activitat enzimàtica *in situ* les principals ecto-nucleotidases endometrials i altres proteïnes del purinoma, en tres línies cel·lulars epitelials d'adenocarcinoma endometrial humanes (ECC-1, KLE i HEC-1-B) i en cultius primaris de cèl·lules de l'estroma procedents d'endometris sense patologia endometrial. La detecció de proteïnes, gens i activitats enzimàtiques d'interès a les línies cel·lulars i els cultius primaris, ens ha permès validar-los com a models cel·lulars per a l'estudi del purinoma, i estudiar-hi l'efecte de fàrmacs (TAM i anastrozol) i d'hormones (E₂). Els nostres resultats, resumits a la **Taula D1**, mostren diferències en l'expressió gènica i proteica i en l'activitat enzimàtica degudes als efectes del TAM i de l'E₂, però no de l'anastrozol.

A les línies cel·lulars, TAM disminueix l'expressió de les proteïnes CD26 i ADK i augmenta la de AP i A₁-R, però no afecta l'expressió de CD73. TAM, a més, modifica la localització de CD26, receptor expressat a la membrana plasmàtica en condicions basals i al citoplasma després del tractament. Hem observat, també, que augmenta de manera reversible les activitats ATPàsica i AP però, no afecta l'activitat AMPàsica. I, inclús, incrementa significativament l'expressió dels gens estudiats. En el cas de *CD26*, aquest increment coincideix amb un augment en l'expressió de la proteïna total, tal com indiquen els experiments WB i l'anàlisi de la intensitat de fluorescència de les imatges. Tot i així, la seva presència a la membrana es detecta disminuïda per citometria de flux com a conseqüència de la internalització del receptor induïda per TAM. L'augment en l'expressió del gen *AP* coincideix amb un augment en l'expressió de la proteïna, mentre que l'increment en l'expressió de *CD73* no va acompanyat d'un augment de la proteïna. L'anastrozol no produeix cap dels efectes observats amb el

TAM. L'E₂ no té cap efecte sobre l'expressió proteica de CD26 i CD73, però augmenta l'expressió de l'AP i disminueix la del receptor A₁ d'adenosina. El tractament amb E₂ disminueix l'expressió d'ADK a les cèl·lules ECC-1, mentre que no en modifica l'expressió a les cèl·lules HEC-1-B. Aquestes diferències podrien ser degudes al diferent origen cel·lular de les línies. L'E₂, de la mateixa manera que TAM, augmenta l'activitat ATPàsica i AP *in situ* però, en aquest cas, els efectes són irreversibles als temps estudiats. L'increment de l'activitat AP estimulada pels estrògens ha estat descrit anteriorment a cèl·lules Ishikawa, procedents de tumors endometrials (Holinka et al., 1986). Amb l'E₂, l'activitat AMPàsica es manté elevada després del tractament i demostrem que aquesta és completament abolida per l'inhibidor α,β -meADP específic de CD73. L'E₂ no té cap efecte sobre l'expressió del gen *CD26*, en canvi, disminueix l'expressió de *CD73* i augmenta la d'AP. Tot i la disminució del gen *CD73*, l'expressió i l'activitat de CD73 no varien, en canvi, l'augment de l'expressió d'AP coincideix amb l'augment de l'expressió de la proteïna i de l'activitat enzimàtica.

Expressió proteica	Línies cel·lulars			Cèl·lules de l'estroma
	TAM	Anastrozol	E ₂	TAM
CD26	↓*	=	=	ND
CD73	=	=	=	=
AP	↑	=	↑	ND
ADK	↓	ND	=/↓**	=
A ₁ -R	↑	ND	↓	=
Activitat enzimàtica <i>in situ</i>	TAM	Anastrozol	E ₂	TAM
ATPàsica	↑ _(r)	ND	↑ _(ir)	ND
AMPàsica	=	ND	=	=
AP	↑ _(r)	ND	↑ _(ir)	ND
Expressió gènica	TAM	Anastrozol	E ₂	TAM
<i>CD26</i>	↑	ND	=	ND
<i>CD73</i>	↑	ND	↓	ND
<i>AP</i>	↑	ND	↑	ND

Taula D1. Efectes del TAM, l'anastrozol i l'E₂ en l'expressió i l'activitat de les ecto-nucleotidases i altres proteïnes del purinoma en línies cel·lulars i cultius primaris. (*) La disminució de l'expressió va acompanyada d'un canvi en la localització de la proteïna. (**) L'E₂ no afecta l'expressió d'ADK a les cèl·lules HEC-1-B però la disminueix a les ECC-1. (↑) augment, (r) reversible, (ir) irreversible, (↓) disminució, (=) absència d'efecte, (ND) no determinat.

A les cèl·lules de l'estroma, TAM no varia l'expressió de cap de les proteïnes estudiades ni tampoc l'activitat AMPàsica *in situ* essent aquesta força elevada a les cèl·lules control fet que dificulta l'observació de les possibles diferències. Resta per estudiar l'efecte d'aquest fàrmac sobre l'expressió

del gen *CD73*, i completar l'estudi amb l'anastrozol i l'E₂. Serà necessari, a més, estudiar els efectes del TAM, l'anastrozol i l'E₂ en cultius primaris de cèl·lules de l'estroma procedents d'endometris amb adenocarcinoma Tipus I i Tipus II.

Així doncs, en el nostre model de cèl·lules tumorals d'adenocarcinoma endometrial, TAM modificaria l'expressió d'alguns elements del purinoma afavorint el manteniment de nivells elevats d'adenosina extracel·lular. Aquesta hipòtesi es representa a la **Figura D1**. L'acumulació d'adenosina extracel·lular afavoreix la proliferació de les cèl·lules tumorals i els hi permet, a més, escapar del control del sistema immunitari, donant-se així les condicions òptimes per a la progressió del tumor.

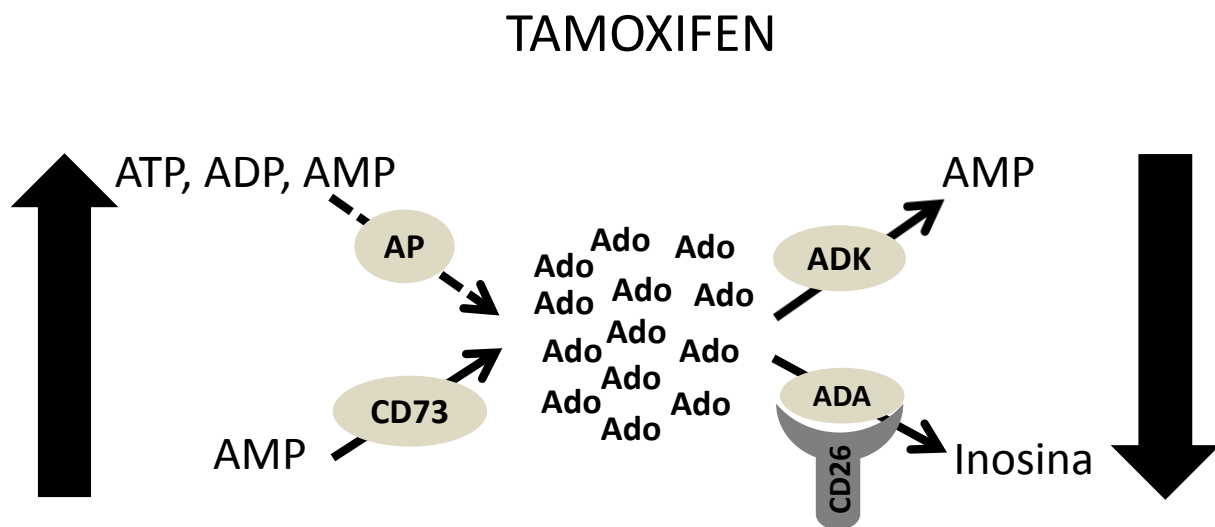


Figura D1. Model de carcinogènesi endometrial induïda pel TAM. L'augment de l'expressió dels enzims AP i CD73 comporta un augment de la hidròlisi de l'ATP, l'ADP i l'AMP, precursors de l'adenosina, i afavoreix l'acumulació d'aquesta a l'espai extracel·lular. A més, la disminució de l'expressió de CD26 i ADK suposa, d'una banda, una disminució de la hidròlisi de l'adenosina, i de l'altre, una disminució de la fosforilació d'aquesta per formar AMP, mantenint elevats, així, els nivells d'adenosina extracel·lulars.

Durant la segona part d'aquest treball hem estudiat el mecanisme a través del qual el TAM modifica la localització del receptor CD26, expressat a la membrana plasmàtica en condicions basals i al lisosomes després del tractament. Aquest efecte induït pel TAM es produeix de manera progressiva i és reversible, així ho indiquen els experiments de reversió, on CD26 es localitza novament a la membrana plasmàtica 24 hores després d'eliminar el tractament. Aquest fenomen ha estat descrit anteriorment a cèl·lules de carcinoma colorectal, on s'ha observat que el tractament amb forscolina (potent activador de l'activitat adenilat ciclasa) bloqueja l'expressió apical de CD26 i indueix la seva retenció en vesícules positives per Lamp1 i amb morfologia autofàgica (Baricault et al., 1993). Els autors, posteriorment, conclouen que aquest fenomen és produït per una via independent de l'AMP cíclic (Baricault et al., 1995). A més a més, hem comprovat mitjançant experiments d'immunofluorescència, que CD26 no colocalitza amb d'altres orgànuls cel·lulars com els endosomes primerencs, els endosomes tardans i els autofagosomes.

La disminució de l'expressió de CD26 a la membrana plasmàtica no es relaciona, però, amb una disminució de la quantitat total de proteïna ni tampoc dels nivells de mRNA com demostren els WB i les PCRs, respectivament. Per examinar aquesta qüestió, hem mesurat la quantitat de CD26 total present en cèl·lules tractades amb TAM mitjançant la quantificació de la fluorescència de la proteïna en imatges de microscòpia confocal. L'anàlisi dels resultats revela que, efectivament, CD26 està augmentat en aquestes cèl·lules, explicant així, l'increment de proteïna total observat per WB. A més, coincidint amb els efectes del fàrmac descrits per altres grups, hem detectat un augment de la quantitat de lisosomes a les cèl·lules tractades amb TAM (Tanaka et al., 1997). D'altra banda, els experiments de colocalització demostren un increment significatiu de la presència de CD26 als lisosomes, fet que explica la disminució de l'expressió a la membrana detectada per citometria de flux.

Així, TAM no només afecta la localització de CD26 sinó que n'augmenta l'expressió (gènica i proteica) i la seva presència als lisosomes. A les cèl·lules tractades amb TAM, el fet que el receptor CD26 es localitzi en grans quantitats als lisosomes (orgànuls encarregats de degradar proteïnes) i no a la membrana tal com ho fa a les cèl·lules control, suggereix que el TAM indueix la degradació de CD26 en aquestes cèl·lules. A més, els experiments d'inhibició de la síntesi proteica també apunten en aquesta direcció. Altres evidències a favor d'aquesta hipòtesi provenen d'estudis anteriors els quals demostren que el TAM i el seu metabòlit 4-hidroxitamoxifen promouen la degradació de proteïnes priòniques en línies cel·lulars neuronals (Marzo et al., 2013).

L'elevada expressió de CD26 als lisosomes fa pensar que la degradació es produeix en aquests orgànuls. Per esbrinar si la disminució dels nivells de CD26 induïda pel TAM és deguda a la degradació lisosomal, la inhibició d'aquest procés amb NH_4Cl hauria de restablir la presència de CD26 a la membrana. Efectivament, les cèl·lules tractades amb TAM i NH_4Cl expressen el receptor CD26 a la membrana plasmàtica tal com ho fan les cèl·lules control. D'acord amb aquests resultats, s'ha demostrat que el TAM indueix la degradació de proteïnes als lisosomes (Marzo et al., 2013). Existeix molta controvèrsia, però, sobre el mecanisme a través del qual es produeix aquest fenomen. Així, hi ha estudis a favor de la via del proteasoma (Kuo et al., 2007) i d'altres a favor de mecanismes independents de l'autofàgia (Marzo et al., 2013).

En aquest treball hem analitzat la via de l'endocitosi com a possible mecanisme a través del qual el TAM indueix la degradació del receptor CD26 als lisosomes. Els experiments d'inhibició de l'endocitosi amb M β CD demostren expressió del receptor CD26 a la membrana plasmàtica de les cèl·lules tractades amb TAM i M β CD. El fet que la degradació del receptor CD26 no sigui possible

estan bloquejada l'endocitosis, indica que aquest procés està implicat en la degradació del receptor CD26 induïda per TAM.

Els nostres estudis demostren, per primera vegada, que TAM disminueix l'expressió del receptor CD26 a la membrana de cèl·lules d'adenocarcinoma endometrial tot induint la degradació del receptor als lisosomes per la via de l'endocitosis. Tot i que calen més estudis, tot indica que la pèrdua d'expressió del receptor CD26 induïda pel TAM estaria afavorint l'acumulació d'adenosina a l'espai extracel·lular i podria influir, així, en la carcinogènesi endometrial.

DISCUSSIÓ

*“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow.
The important thing is not to stop questioning”*

Albert Einstein

DISCUSSIÓ

En els darrers anys ha nascut un nou concepte, el **purinoma**, que engloba tots els elements que d'una manera o altra intervenen en l'activació, la conservació o la terminació de la **senyalització purinèrgica**. Formant part d'aquest complex molecular trobem els nucleòtids extracel·lulars, com l'ATP, i els nucleòsids que deriven de la seva hidròlisi, com l'adenosina, els seus receptors i transportadors, i les **ecto-nucleotidases**, enzims de membrana que controlen la seva concentració extracel·lular.

L'ATP i l'adenosina extracel·lulars són importants molècules senyalitzadores que, a través de receptors específics (purinoceptors), tenen un paper rellevant en diverses funcions fisiològiques i fisiopatològiques de l'aparell reproductor (revisat per Burnstock, 2014). Per exemple, estudis recents posen de manifest el paper de l'adenosina en la funció dels espermatozoides, estimulants-ne la capacitació i inhibint la reacció acrosòmica espontània (revisat per Fraser, 2008). Estudis previs del nostre grup mostren expressió de les NTPDases 1, 2 i 3, ecto-nucleotidases capaces d'hidrolitzar l'ATP i l'ADP fins AMP (Martín-Satué et al., 2009), i de CD73, ecto-enzim encarregat de degradar l'AMP fins adenosina al sistema reproductor (Martín-Satué et al., 2010). A més, aquest últim treball mostra, també, coexpressió de dues ecto-nucleotidases (NTPDasa3 i CD73) a les cèl·lules principals de l'epidídim, evidenciant la implicació d'aquests dos enzims en el control de la composició del fluid espermàtic, i per tant, en la fertilitat masculina. El treball de la meua tesi ha estat, precisament, continuar aquesta línia de recerca amb l'estudi de les ecto-nucleotidases a l'aparell reproductor femení en particular a l'endometri no patològic i tumoral.

Així, el primer objectiu d'aquesta tesi ha estat caracteritzar l'enzim CD73, com a font principal d'adenosina extracel·lular, a l'aparell reproductor femení murí al llarg del cicle estral. La consecució d'aquest objectiu ha comportat un important objectiu metodològic previ: la determinació de les quatre fases del cicle estral (diestre, proestre, estre i metestre) mitjançant l'anàlisi citològic (proporcions relatives de cèl·lules epitelials nucleades, cèl·lules escamoses i leucòcits) de rentats vaginals i l'anàlisi morfològic de l'úter (revisat per Westwood, 2008).

A continuació, hem estudiat l'expressió i l'activitat de CD73 a l'ovari, l'oviducte i l'úter de cada una de les fases, amb la finalitat d'identificar possibles variacions al llarg del cicle. Als ovaris, CD73 s'expressa i és activa als cossos lutis, però no en d'altres fol·licles ovàrics, fet que suggereix una relació entre l'expressió de CD73 i l'estadi de desenvolupament dels fol·licles, tal com s'ha descrit per l'expressió dels receptors de l'ATP del tipus P2X (Bardini, Lee i Burnstock, 2000). Estudis més recents realitzats en ovaris humans, relacionen els elevats nivells d'adenosina en el fluid fol·licular i la maduració dels fol·licles i de l'oòcit (Wen et al., 2010). Treballs previs del nostre grup demostren

expressió de l'NTPDasa1 als cossos lútics (Martín-Satué et al., 2009), coincidint amb el fet que la concentració d'ATP en el fluid extracel·lular dels fol·licles ovàrics grans és deu vegades inferior que la present en els fol·licles ovàrics més petits (Park et al., 2003).

Als oviductes, CD73 s'expressa al pol apical de les cèl·lules epitelials, on la proteïna és també enzimàticament activa. S'ha descrit que l'ATP estimula la secreció d'ions per part de les cèl·lules epitelials de l'oviducte, contribuint així, a la composició del fluid (Keating i Quinlan, 2008) que, al seu torn, influeix en el transport i en la fertilització de l'oòcit, així com en els estadis primerencs del desenvolupament de l'embrió. L'expressió de NTPDasa3 per part de les cèl·lules epitelials de l'oviducte ha estat prèviament descrita (Martín-Satué et al., 2009), suggerint una possible coordinació d'ambdós enzims, NTPDasa3 i CD73, en el control dels nivells d'ATP i adenosina a l'espai luminal.

A l'úter, CD73 s'expressa al miometri, al múscul llis i als vasos sanguinis, i a l'endometri, a l'estroma i als epitelis luminal i glandular. Aquests epitelis presenten variacions en l'expressió i l'activitat de CD73 al llarg del cicle estral, sent ambdues màximes a la fase de l'estre, coincidint amb el període de màxima receptivitat sexual de la femella i on l'adenosina és clau en el procés de capacitació dels espermatozoides. L'estroma de l'endometri, especialment l'àrea al voltant del lumen, mostra una elevada expressió i activitat de CD73, fet que no succeeix en d'altres fases. Aquests resultats estan en la línia de treballs anteriors que demostren canvis en l'expressió i la distribució de CD73 a l'úter durant la fase primerenca de l'embaràs (Bucci i Murphy, 1999), coincidint també amb canvis en els nivells d'adenosina (Blackburn et al., 1992).

Basant-nos en l'expressió de CD73 en el sistema reproductor de ratolins, on tot apunta que aquest enzim estaria regulat hormonalment, el segon objectiu d'aquesta tesi ha estat caracteritzar l'expressió i la distribució de les ecto-nucleotidases a l'endometri humà al llarg del cicle menstrual i després de la menopausa.

L'expressió i l'activitat de les principals ecto-nucleotidases endometrials han estat estudiades a endometris humans funcionals (proliferatius i secretors) i atròfics (als epitelis glandular i de superfície, l'estroma i les arterioles espirals). A continuació, discutirem detalladament els resultats obtinguts per cada família d'enzims.

La família de les fosfatases alcalines està formada per enzims ubicus que degraden específicament una àmplia varietat de compostos amb grups fosfats. En rates, s'ha localitzat activitat fosfatasa alcalina als epitelis luminal i glandular de l'úter, establint una correlació entre l'elevada activitat luminal i el període de màxima sensibilitat de l'endometri a la implantació del blastocist (Bansode et

al., 1998). A més, s'ha demostrat que es produeix un augment local de l'activitat fosfatasa alcalina en el lloc on ocorre la implantació del blastocist (Weitlauf, 1994). Aquests enzims, estarien implicats en la unió del blastocist a l'endometri i en el manteniment de la composició i el volum de la secreció luminal, essent doncs essencials per al desenvolupament de l'embrió (Emadi i Salehnia, 2004). S'han dut a terme estudis en dones relacionant la fosfatasa alcalina amb la fertilitat, i s'ha vist que hi ha una regulació a l'alça del gen *PLAP-2*, que ha estat proposat com a marcador de la correcta implantació de l'embrió després de tractaments de fertilització *in vitro* (Bersinger et al., 2008). Els nostres estudis han demostrat expressió i activitat de dos enzims d'aquesta família, PLAP i TNAP, als epitelis luminal i glandular de l'endometri humà. Aquests resultats coincideixen amb estudis previs que demostren expressió de PLAP (Davies et al., 1985) i de TNAP (Sobiesiak et al., 2010) a la part luminal de les glàndules endometrials. El nostre estudi, però, aporta noves dades al comparar l'expressió d'aquests enzims al llarg del cicle menstrual i durant la menopausa. Hem detectat canvis en la distribució de l'expressió de PLAP i TNAP, ambdós absents a la part luminal de l'endometri secretor. A més, en aquest endometri, hem detectat una nova localització de TNAP a l'estroma subjacent al lumen. Aquestes variacions podrien estar relacionades amb els canvis que pateix l'endometri necessaris per a la implantació de l'embrió, que té lloc principalment a la part luminal de l'endometri.

CD73 s'expressa de manera abundant a l'epiteli glandular i a l'estroma. A part del seu rol en la regulació de la composició del fluid uterí mitjançant el control de la secreció d'ions (Keating i Quinlan, 2008), se li ha atribuït un paper com a principal enzim encarregat de produir l'adenosina necessària per a la capacitat dels espermatozoides (Monks i Fraser, 1988a; 1988b; Takayama et al., 2000). A més, proposem que l'adenosina generada per aquest enzim i acumulada a l'estroma, està involucrada en la regulació de la inflamació cíclica i fisiològica que ocorre a l'endometri funcional (Maybin, Critchley i Jabbour, 2011). Així, els nivells d'ATP i adenosina extracel·lulars vindrien regulats per l'acció seqüencial de CD39 i CD73, ambdós coexpressats a l'estroma.

NTPDasa3 s'expressa als epitelis luminal i glandular. L'NTPDasa3 ja ha estat identificada en d'altres epitelis secretors d'òrgans reproductius murins com per exemple l'epidídim, la pròstata i els oviductes (Martín-Satué et al., 2009; 2010). Demostrem que l'NTPDasa3 s'expressa també a cèl·lules musculars de les artèries espirals de l'endometri però no a cap més vas sanguini i tampoc al miometri. De fet, és la primera vegada que s'identifica aquest enzim en relació als vasos sanguinis. La remodelació de les artèries espirals, exclusives de l'endometri, condicionen l'establiment i el manteniment d'un embaràs normal (Whitley i Cartwright, 2010; Elia, Charalambous i Georgiades, 2011). Encara es coneixen poc, però, sobre el mecanisme responsable d'aquesta remodelació i per

això la nostra troballa, que contribueix a la caracterització fenotípica d'aquests vasos, pot ajudar a comprendre aquest fenomen.

La família d'enzims NPPs ha estat identificada a cèl·lules epitelials en relació amb el transport d'ions entre altres funcions (Stefan, Jansen i Bollen, 2006). Els nostres resultats han demostrat expressió de NPP1 i NPP3 a l'epiteli glandular amb marcades variacions entre els diferents endometris. L'expressió dels dos enzims sembla complementar-se al llarg del cicle, així, quan hi ha menys expressió d'un n'hi ha més de l'altre. L'expressió d'NPP3 es limita a l'endometri cíclic i només s'ha identificat a endometris postmenopausics en relació a casos de metaplàsia tubàrica. Per aquest motiu NPP3 resulta un biomarcador de gran utilitat per a la identificació d'aquest tipus d'alteració.

CD26 ha estat identificada a òrgans reproductors femenins com la placenta, l'ovari i l'endometri, i s'ha indicat un possible paper d'aquest receptor en la implantació del blastocist humà (Shimomura et al., 2006). El fet que l'ecto-ADA estigui sovint associada amb CD26 ens ha permès incloure l'estudi de l'expressió de CD26 en aquest treball. Demostrem que CD26 està fortament expressada a l'endometri secretor i pràcticament està absent a l'endometri atròfic, altre vegada, indicant una possible relació amb la fertilitat femenina.

Així doncs, demostrem que les ecto-nucleotidases s'expressen de manera abundant a l'endometri, fluctuant significativament al llarg del cicle, i mostrant una expressió diferencial a l'endometri atròfic. Aquests resultats indiquen una relació d'aquests enzims amb la fertilitat femenina i proposem realitzar estudis amb dones amb problemes de fertilitat d'etiologia desconeguda.

Després de caracteritzar les ecto-nucleotidases a l'endometri no patològic, ens vam plantejar estudiar les ecto-nucleotidases al càncer d'endometri. Així, el tercer objectiu d'aquesta tesi ha estat localitzar i caracteritzar l'expressió i l'activitat a tumors d'endometri de les ecto-nucleotidases CD39 i CD73 en ser els principals enzims implicats directament en el control dels nivells d'ATP i adenosina extracel·lulars en d'altres tipus de tumors. En aquest estudi hem utilitzat mostres d'endometris humans amb adenocarcinoma endometrial (Tipus I i Tipus II) i les corresponents mostres d'endometris normals, sempre que fos possible, amb la finalitat de comparar-les entre elles.

En el tumors, l'adenosina extracel·lular generada principalment per l'acció seqüencial de les ecto-nucleotidases, té efectes immunosupressors com per exemple la inhibició de la funció antitumoral de les cèl·lules T, la modificació dels nivells locals d'interleuquines, i la inhibició de la fagocitosi (revisat per Stagg i Smyth, 2010). A continuació, discutirem els resultats de l'estudi de l'expressió de les ecto-nucleotidases CD39 i CD73 a l'endometri humà amb adenocarcinoma endometrial Tipus I i Tipus II.

CD39 es localitza a l'estroma dels endometris no tumorals i tumorals. Tant l'expressió com l'activitat de CD39 és significativament més alta en els tumors al comparar-les amb les del corresponent endometri no tumoral. L'expressió és major en els tumors de Tipus II, coincidint també amb el grau més alt d'aquests (grau 3 versus grau 1 dels de Tipus I).

CD73 es troba fortament expressada en ambdós tipus de tumors, tant als epitelis com a l'estroma. Degut a l'elevada expressió de CD73 en els endometris tumorals i no tumorals, no ha estat possible comparar-ne els nivells d'expressió.

Així, els tumors endometrials presenten elevats nivells de CD39 i CD73 afavorint, d'aquesta manera, l'acumulació d'adenosina a l'espai extracel·lular del tumor endometrial. Aquesta elevada concentració d'adenosina extracel·lular potenciarà la progressió del tumor permetent a les cèl·lules tumorals escapar del control del sistema immunitari, tal com ha estat proposat anteriorment per altres tipus de tumors (Blay, White i Hoskin, 1997; revisat per Stagg i Smith, 2010). Els resultats obtinguts en tumors endometrials afegits a la llarga llista de càncers humans en els que CD39 està sobreexpressada, evidencien el potencial terapèutic de CD39 com a diana en la immunoteràpia contra el càncer (revisat per Bastid et al., 2013). Els nostres resultats reforcen la rellevància de CD73 en els tumors, tal com han evidenciat també altres estudis (revisat per Stagg i Smith, 2010; Forte et al., 2013).

En aquest treball, a més, hem validat l'ús de les empremtes per a l'estudi de les ecto-nucleotidases. Els resultats de l'immunomarcatge i les activitat *in situ* obtinguts amb les empremtes són equivalents als obtinguts amb les seccions histològiques. La utilitat de les empremtes per al diagnòstic ha estat demostrada pel càncer de mama, aportant el 100% de sensibilitat i especificitat en l'avaluació dels marges de tumors obtinguts durant la cirurgia (Klimberg, Westbrook i Korourian, 1998). A més, aquesta tècnica ha estat prèviament usada per demostrar mitjançant immunomarcatge una disminució en l'expressió del receptor de l'ATP P2X₇ en cèl·lules de càncer d'endometri (Li et al., 2007), i més recentment, la relació entre l'expressió de p53 i el grau del tumor (Konstantinos et al., 2013). De totes maneres, aquest és el primer estudi que ha validat l'ús de les empremtes per als estudis d'activitat enzimàtica, obrint així, la possibilitat de realitzar més estudis en mostres citològiques.

Finalment, el quart i últim objectiu ha estat estudiar l'efecte de fàrmacs, com el TAM i l'anastrozol, i d'hormones com l'E₂ sobre les ecto-nucleotidases endometrials. Per això hem validat un model cel·lular estable (les línies cel·lulars epitelials HEC-1-B, KLE i ECC-1 i els cultius primaris de cèl·lules de l'estroma) per a l'estudi del purinoma.

Aquest estudi s'ha dut a terme mitjançant tècniques immunològiques, moleculars i d'activitat enzimàtica *in situ* les quals ens han permès estudiar de manera senzilla, quantitativa i reproducible, els canvis en l'expressió i l'activitat de les ecto-nucleotidases degut a l'efecte dels factors estudiats. Els nostres resultats demostren un efecte de TAM i de l'E₂, però no de l'anastrozol en l'expressió i l'activitat enzimàtica de les ecto-nucleotidases.

A les cèl·lules tumorals d'adenocarcinoma endometrial, TAM augmenta l'expressió d'AP i del receptor A₁ d'adenosina, les activitats ATPàsica i AP, i l'expressió dels gens *CD26*, *CD73* i *AP*, mentre que disminueix l'expressió de *CD26* i *ADK*. L'expressió i l'activitat de *CD73* es mantenen elevades en presència de TAM. L'anastrozol, no produeix cap dels efectes observats amb el TAM. L'E₂ augmenta l'expressió proteica i gènica de l'AP i les activitats ATPàsica i AP, en canvi disminueix l'expressió del receptor A₁ d'adenosina i del gen *CD73*. Als cultius primaris de cèl·lules de l'estroma, on hem estudiat l'expressió i l'activitat de *CD73* en absència i en presència de TAM, no ha estat possible l'observació de possibles diferències degut a l'elevada expressió i activitat de *CD73* en ambdues situacions experimentals. Podem concloure que ambdós models cel·lulars són útils per a l'estudi de la regulació de les ecto-nucleotidases.

TAM, a més, modifica progressivament i de manera reversible la distribució subcel·lular de *CD26*, que passa de la membrana plasmàtica als lisosomes on no pot actuar com a receptor de l'ecto-ADA. La pèrdua d'expressió a la membrana no es relaciona amb una disminució de l'expressió gènica i proteica sinó que tant l'expressió gènica com la proteïna total estan augmentades. El número de lisosomes està augmentat en les cèl·lules tractades amb TAM tal com ja havia estat demostrat en les cèl·lules epitelials de les glàndules mamàries (Tanaka et al., 1997). Així, el TAM indueix la internalització del receptor *CD26* per la via de l'endocitosi i la seva degradació als lisosomes. Aquests resultats coincideixen amb un treball recent que demostra que el TAM estimula la degradació de proteïnes priòniques en cultius cel·lulars de neurones (Marzo et al., 2013).

El TAM modificaria l'expressió d'alguns elements del purinoma afavorint el manteniment de nivells elevats d'adenosina extracel·lular. L'acumulació d'adenosina extracel·lular afavoreix la proliferació de les cèl·lules tumorals i els hi permet, a més, escapar del control del sistema immunitari, donant-se així, les condicions òptimes per a la progressió del tumor. Sugerim que les ecto-nucleotidases podrien estar implicades en la carcinogènesi endometrial induïda pel TAM.

CONCLUSIONS

“Science never solves a problem without creating ten more”

George Bernard Shaw

CONCLUSIONS

Les principals conclusions extretes d'aquest treball són:

- CD73, principal enzim responsable de la hidròlisi de l'AMP, s'expressa i és actiu als ovaris, als oviductes i a l'úter. A l'endometri, l'expressió de CD73 varia al llarg del cicle estral, essent màxima a la fase de l'estre, coincidint amb la màxima receptivitat sexual de la femella i on l'adenosina és necessària per a la capacitat dels espermatozoides.
- Les ecto-nucleotidases endometrials s'expressen als epitelis (glandular i luminal), a l'estroma i a les arterioles espirals de l'endometri humà de tipus proliferatiu, secretor i atròfic. La seva expressió fluctua al llarg del cicle menstrual i varia també després de la menopausa, evidenciant, així, la seva regulació hormonal.
- Els estrògens regulen l'expressió de les ecto-nucleotidases endometrials.
- NPP3 és un nou marcador biològic de metaplàsia tubària.
- NTPDasa3 s'expressa de manera selectiva a les arteries espirals de l'endometri, esdevenint un bon marcador d'aquest tipus d'arteries necessàries per al correcte desenvolupament de la circulació uteroplacentària durant l'embaràs.
- CD39 i CD73 s'expressen de forma abundant a l'adenocarcinoma endometrial.
- L'expressió de CD39 es troba significativament incrementada en els tumors d'adenocarcinoma endometrial en comparació amb els corresponents endometris no tumorals, essent l'expressió major en els tumors d'alt grau.
- L'elevada activitat de CD39 en els tumors comporta l'increment dels nivells d'AMP, substrat de CD73, també altament expressada als tumors, que al seu torn incrementa els nivells extracel·lulars d'adenosina immunosupressora.
- Les ecto-nucleotidases CD39 i CD73 són potencials biomarcadors amb utilitat pronòstica i diagnòstica de l'adenocarcinoma endometrial.
- Les línies cel·lulars HEC-1-B i ECC-1 i els cultius primaris de cèl·lules de l'estroma són un model útil per a estudiar la regulació de l'expressió de les ecto-nucleotidases endometrials.
- El tamoxifen afecta l'expressió i l'activitat de les ecto-nucleotidases endometrials.
- El tamoxifen induïx la internalització de CD26 mitjançant l'endocitosi i la seva degradació als lisosomes.
- L'anastrozol no té cap efecte en l'expressió de les ecto-nucleotidases endometrials.

BIBLIOGRAFIA

*"If you would not be forgotten as soon as you are dead,
either write something worth reading or do things worth writing"*

Benjamin Franklin

BIBLIOGRAFIA

- Abal M, Planaguma J, Gil-Moreno A, Monge M, Gonzalez M, Baro T, Garcia A, Castellvi J, Ramon YCS, Xercavins J, Alameda F, Reventós J (2006) Molecular pathology of endometrial carcinoma: transcriptional signature in endometrioid tumors. *Histol Histopathol* 21: 197-204
- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR (2002) Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP. *Mol Reprod Dev* 63: 245-55
- Aerts I, Martin JJ, 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
- Aleu J, Martín-Satué M, Navarro P, Perez de Lara I, Bahima L, Marsal J, Solsona C (2003) Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 547: 209-19
- 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
- Aliagas E, Vidal A, Torrejón-Escribano B, Taco Mdel R, Ponce J, de Aranda IG, Sévigny J, Condom E, Martín-Satué M (2013a) Ecto-nucleotidases distribution in human cyclic and postmenopausal endometrium. *Purinergic Signal* 9: 227-37
- Aliagas E, Villar-Menendez I, Sévigny J, Roca M, Romeu M, Ferrer I, Martín-Satué M, Barrachina M (2013b) Reduced striatal ecto-nucleotidase activity in schizophrenia patients supports the "adenosine hypothesis". *Purinergic Signal* 9: 599-608
- Aliagas E, Vidal A, Texido L, Ponce J, Condom E, Martín-Satué M (2014) High Expression of Ecto-Nucleotidases CD39 and CD73 in Human Endometrial Tumors. *Mediators Inflamm* 2014: 509027
- Allard B, Turcotte M, Stagg J (2012) CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *J Biomed Biotechnol* 2012: 485156
- Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J (2013) Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res* 19: 5626-35
- Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royat I, Stagg J (2014) Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 134: 1466-73

- Allegrucci C, Liguori L, Mezzasoma I, Minelli A (2000) A1 adenosine receptor in human spermatozoa: its role in the fertilization process. *Mol Genet Metab* 71: 381-6
- Al-Rashida M, Iqbal J (2013) Therapeutic Potentials of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase, Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase, Ecto-5'-Nucleotidase, and Alkaline Phosphatase Inhibitors. *Med Res Rev*
- Andersson KE, Chapple CR, Höfner K (2002) Future drugs for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *World J Urol* 19: 436-42
- Arase T, Uchida H, Kajitani T, Ono M, Tamaki K, Oda H, Nishikawa S, Kagami M, Nagashima T, Masuda H, Asada H, Yoshimura Y, Maruyama T (2009) The UDP-glucose receptor P2RY14 triggers innate mucosal immunity in the female reproductive tract by inducing IL-8. *J Immunol* 182: 7074-84
- Arulkumaran N, Unwin RJ, Tam FW (2011) A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 20: 897-915
- Auzanneau C, Norez C, Noel S, Jouglu C, Becq F, Vandebrouck C (2006) Pharmacological profile of inhibition of the chloride channels activated by extracellular acid in cultured rat Sertoli cells. *Reprod Nutr Dev* 46: 241-55
- Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Martins I, Kroemer G, Smyth MJ, Zitvogel L (2010) Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. *Cancer Res* 70: 855-8
- Bahima L, Aleu J, Elias M, Martin-Satué M, Muhaisen A, Blasi J, Marsal J, Solsona C (2006) Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes. *J Cell Physiol* 206: 95-102
- Banks FC, Knight GE, Calvert RC, Thompson CS, Morgan RJ, Burnstock G (2006) The purinergic component of human vas deferens contraction. *Fertil Steril* 85: 932-9
- Banks FC, Calvert RC, Burnstock G (2010) Changing P2X receptor localization on maturing sperm in the epididymides of mice, hamsters, rats, and humans: a preliminary study. *Fertil Steril* 93: 1415-20

- Bansode FW, Chauhan SC, Makker A, Singh MM (1998) Uterine luminal epithelial alkaline phosphatase activity and pinopod development in relation to endometrial sensitivity in the rat. *Contraception* 58: 61-8
- Bardini M, Lee HY, Burnstock G (2000) Distribution of P2X receptor subtypes in the rat female reproductive tract at late pro-oestrus/early oestrus. *Cell Tissue Res* 299: 105-13
- Baricault L, Garcia M, Cibert C, Sapin C, Geraud G, Codogno P, Trugnan G (1993) Forskolin blocks the apical expression of dipeptidyl peptidase IV in Caco-2 cells and induces its retention in lamp-1-containing vesicles. *Exp Cell Res* 209: 277-87
- Baricault L, Fransen JA, Garcia M, Sapin C, Codogno P, Ginsel LA, Trugnan G (1995) Rapid sequestration of DPP IV/CD26 and other cell surface proteins in an autophagic-like compartment in Caco-2 cells treated with forskolin. *J Cell Sci* 108: 2109-2121
- Barrera NP, Morales B, Villalon 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: C1114-24
- Barrera NP, Morales B, Villalon M (2007) ATP and adenosine trigger the interaction of plasma membrane IP3 receptors with protein kinase A in oviductal ciliated cells. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 815-21
- Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A (2013) ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* 32: 1743-51
- Benarroch EE (2008) Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 70: 231-6
- Bergamin LS, Braganhol E, Zanin RF, Edelweiss MI, Battastini AM (2012) Ectonucleotidases in tumor cells and tumor-associated immune cells: an overview. *J Biomed Biotechnol* 2012: 959848
- Bersinger NA, Wunder DM, Birkhauser MH, Mueller MD (2008) Gene expression in cultured endometrium from women with different outcomes following IVF. *Mol Hum Reprod* 14: 475-84
- 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

- Blackburn MR, Wubah JA, Chunn JL, Thompson LF, Knudsen TB (1999) Transitory expression of the A2b adenosine receptor during implantation chamber development. *Dev Dyn* 216: 127-36
- Blay J, White TD, Hoskin DW (1997) The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* 57: 2602-5
- Bodas E, Aleu J, Pujol G, Martin-Satué M, Marsal J, Solsona C (2000) ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in xenopus oocytes. *J Biol Chem* 275: 20268-73
- Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B (2005) Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost* 31: 139-49
- Bokhman JV (1983) Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 15: 10-7
- Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 112: 358-404
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppés D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM (2009) Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *Cancer Sci* 100: 1434-42
- Braganhol E, Zanin RF, Bernardi A, Bergamin LS, Cappellari AR, Campesato LF, Morrone FB, Campos MM, Calixto JB, Edelweiss MI, Wink MR, Sévigny J, Robson SC, Battastini AM (2012) Overexpression of NTPDase2 in gliomas promotes systemic inflammation and pulmonary injury. *Purinergic Signal* 8: 235-43
- 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
- Bucci M, Murphy CR (1999) Differential alterations in the distribution of three phosphatase enzymes during the plasma membrane transformation of uterine epithelial cells in the rat. *Cell Biol Int* 23: 21-30
- Buchet R, Millán JL, Magne D (2013) Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Methods Mol Biol* 1053: 27-51

- Bültmann R, Klebroff W, Starke K (1999) A contraction-mediating receptor for UTP, presumably P2Y2, in rat vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360: 196-201
- Burns JK (1987) Relation between elevated serum 5-nucleotidase in late human pregnancy and duration of labour. *Proc Physiol Soc Suppl*:57P
- Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-81
- Burnstock G (2006) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58: 58-86
- Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-83
- Burnstock G (2009) Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 42: 3-8
- Burnstock G, Di Virgilio F (2013) Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal* 9: 491-540
- Burnstock G (2014) Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. *Purinergic Signal* 10: 157-87
- Burton LD, Housley GD, Salih SG, Jarlebark L, Christie DL, Greenwood D (2000) P2X2 receptor expression by interstitial cells of Cajal in vas deferens implicated in semen emission. *Auton Neurosci* 84: 147-61
- Chen L, He HY, Li HM, Zheng J, Heng WJ, You JF, Fang WG (2004) ERK1/2 and p38 pathways are required for P2Y receptor-mediated prostate cancer invasion. *Cancer Lett* 215: 239-47
- Chernogorova P, Zeiser R (2012) Ectonucleotidases in solid organ and allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Biomed Biotechnol* 2012: 208204
- Cohen I (2004) Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol* 94: 256-66
- Colgan SP, Eltzhig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2: 351-60
- Davies JO, Howe K, Stirrat GM, Sunderland CA (1985) Placental alkaline phosphatase in benign and malignant endometrium. *Histochem J* 17: 605-12
- Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, 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

- Di Virgilio F (2012) Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res* 72: 5441-7
- do Carmo Araujo M, Rocha JB, Morsch A, Zanin R, Bauchspiess R, Morsch VM, Schetinger MR (2005) Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. *Biochim Biophys Acta* 1740: 421-6
- Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, Colas E, Llauradó M, Alazzouzi H, Planaguma J, Lohmann MA, Garcia J, Castellvi S, Ramon y Cajal J, Gil-Moreno A, Xercavins J, Alameda F, Reventós J (2008) Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108: 221-9
- 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
- Dzhandzhugazyan KN, Kirkin AF, Straten P, Zeuthen J (1998) Ecto-ATP diphosphohydrolase/CD39 is overexpressed in differentiated human melanomas. *FEBS Lett* 430: 227-30
- Edwards SE, Buffone MG, Knee GR, Rossato M, Bonanni G, Masiero S, Ferasin S, Gerton GL, Moss SB, Williams CJ (2007) Effects of extracellular adenosine 5'-triphosphate on human sperm motility. *Reprod Sci* 14: 655-66
- Elia A, Charalambous F, Georgiades P (2011) New phenotypic aspects of the decidual spiral artery wall during early post-implantation mouse pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun* 416: 211-6
- Eltzschig HK (2009) Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology* 111: 904-15
- Emadi SM, Salehnia M (2004) Localization and activity of mouse endometrial alkaline phosphatase after hyperstimulation and progesterone injection at the implantation time. *Iran Biomed J* 8(3):6
- Faria M, Magalhaes-Cardoso T, Lafuente-de-Carvalho JM, Correia-de Sa P (2008) Decreased ecto-NTPDase1/CD39 activity leads to desensitization of P2 purinoceptors regulating tonus of corpora cavernosa in impotent men with endothelial dysfunction. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 27: 761-8
- Fausther M, Lecka J, Kukulski F, Lévesque SA, Pelletier J, Zimmermann H, Dranoff JA, Sévigny J (2007) Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G785-95

- Feng L, Sun X, Csizmadia E, Han L, Bian S, Murakami T, Wang X, Robson SC, Wu Y (2011) Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. *Neoplasia* 13: 206-16
- Fénichel P, Gharib A, Emiliozzi C, Donzeau M, Menezo Y (1996) Stimulation of human sperm during capacitation in vitro by an adenosine agonist with specificity for A2 receptors. *Biol Reprod* 54: 1405-11
- Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, Barer F, Ochaion A, Erlanger A, Madi L (2004) An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B. *Oncogene* 23: 2465-71
- Foresta C, Rossato M, Di Virgilio F (1992) Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Biol Chem* 267: 19443-7
- Foresta C, Rossato M, Chiozzi P, Di Virgilio F (1996) Mechanism of human sperm activation by extracellular ATP. *Am J Physiol* 270: C1709-14
- Forte G, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Adcock IM, Maiolino P, Arra C, Cicala C, Pinto A, Morello S (2013) Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma. *J Immunol* 189: 2226-33
- Fourie MH, du Toit D, Bornman MS, van der Merwe MP, du Plessis DJ (1991) alpha-Glucosidase, sperm ATP concentrations, and epididymal function. *Arch Androl* 26: 139-41
- Fraser LR (2008) The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology* 70: 1356-9
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-52
- Fu W, McCormick T, Qi X, Luo L, Zhou L, Li X, Wang BC, Gibbons HE, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI (2009) Activation of P2X(7)-mediated apoptosis inhibits DMBA/TPA-induced formation of skin papillomas and cancer in mice. *BMC Cancer* 9: 114
- Gelain DP, de Souza LF, Bernard EA (2003) Extracellular purines from cells of seminiferous tubules. *Mol Cell Biochem* 245: 1-9
- Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rebe C (2012) Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *J Biomed Biotechnol* 2012: 473712

- Gillman TA, Pennefather JN (1998) Evidence for the presence of both P1 and P2 purinoceptors in the rat myometrium. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25: 592-9
- 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
- Goding JW (2000) Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J Leukoc Biol* 67: 285-311
- Goding JW, Grobбен B, Slegers H (2003) Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638: 1-19
- Goepfert C, Sundberg C, Sévigny J, Enjyoji K, Hoshi T, Csizmadia E, Robson S (2001) Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice. *Circulation* 104: 3109-15
- Gorodeski GI (2002a) Regulation of transcervical permeability by two distinct P2 purinergic receptor mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C75-83
- Gorodeski GI (2002b) Expression, regulation, and function of P2X(4) purinergic receptor in human cervical epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C84-93
- Gorodeski GI (2008) Regulation of paracellular permeability in low-resistance human vaginal-cervical epithelia. In: Ehrhardt C, Kim KJ (eds) *Biotechnology, pharmaceutical aspects, drug absorption studies in situ, in vitro, and in silico Models*. Springer, Berlin, pp 339-367
- Gorodeski GI (2009) P2X7-mediated chemoprevention of epithelial cancers. *Expert Opin Ther Targets* 13: 1313-32
- Gorodeski GI (2012) P2X7 receptors and epithelial cancers: focus article. *WIREs Membr Transp Signal* 1:349-371
- Haskó G, Cronstein BN (2004) Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25: 33-9
- Häusler SF, Montalban del Barrio I, Strohschein J, Anoop Chandran P, Engel JB, Honig A, Ossadnik M, Horn E, Fischer B, Krockenberger M, Heuer S, Seida AA, Junker M, Kneitz H, Kloor D, Klotz KN, 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

- Häusler SF, Del Barrio IM, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Honig A, Dietl J, Wischhusen J (2014) Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am J Transl Res* 6: 129-39
- Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurbide E (1986) Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line). *Cancer Res* 46: 2771-4
- Horn LC, Meinel A, Handzel R, Einkenkel J (2007) Histopathology of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma: an update. *Ann Diagn Pathol* 11: 297-311
- Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J (2008) Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *Int J Oncol* 32: 527-35
- Huidobro-Toro JP, Briones R, Buvinic S, Valdecantos P, Germain A (2002) Nucleotide receptor subtype regulate flow in the human placenta. *Vascular Neuroeffector Mechanisms*, Lake Tahoe, July 12-15, 2002
- Hupertan V, Neuzillet Y, Stucker O, Pons C, Leammel E, Lebret T (2012) Effects of nucleotides adenosine monophosphate and adenosine triphosphate in combination with L-arginine on male rabbit corpus cavernosum tissue. *Int J Androl* 35: 860-6
- 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
- Jackson SW, Hoshi T, Wu Y, Sun X, Enyoji K, Cszimadia E, Sundberg C, Robson SC (2007) Disordered purinergic signaling inhibits pathological angiogenesis in cd39/Entpd1-null mice. *Am J Pathol* 171: 1395-404
- Jeulin C, Soufir JC (1992) Reversible intracellular ATP changes in intact rat spermatozoa and effects on flagellar sperm movement. *Cell Motil Cytoskeleton* 21: 210-22
- Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, Shin T, Curiel TJ, Zhang B (2010) CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res* 70: 2245-55

- Katzur AC, Koshimizu T, Tomic 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
- Keating N, Quinlan LR (2008) Effect of basolateral adenosine triphosphate on chloride secretion by bovine oviductal epithelium. *Biol Reprod* 78: 1119-26
- Khanam T, Burnstock G (2007) Changes in expression of P2X1 receptors and connexin 43 in the rat myometrium during pregnancy. *Fertil Steril* 88: 1174-9
- Khoo HE, Ho CL, Chhatwal VJ, Chan ST, Ngoi SS, Moochhala SM (1996) Differential expression of adenosine A1 receptors in colorectal cancer and related mucosa. *Cancer Lett* 106: 17-21
- Kiss DS, Zsarnovszky A, Horvath K, Gyorffy A, Bartha T, Hazai D, Sotonyi P, Somogyi V, Frenyo LV, Diano S (2009) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in the ventral and lateral hypothalamic area of female rats: morphological characterization and functional implications. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 31
- Klimberg VS, Westbrook KC, Korourian S (1998) Use of touch preps for diagnosis and evaluation of surgical margins in breast cancer. *Ann Surg Oncol* 5: 220-6
- Konrad L, Schiemann P, Renneberg H, Wennemuth G, Fini C, Aumuller G (1998) Expression and enzymic activity of ecto 5'-nucleotidase in the human male genital tract. *Biol Reprod* 59: 190-6
- Konstantinos K, Marios S, Anna M, Nikolaos K, Efstratios P, Paulina A (2013) Expression of p53 in imprint smears of endometrial carcinoma. *Diagn Cytopathol*
- Koshi R, Coutinho-Silva R, Cascabulho CM, Henrique-Pons A, Knight GE, Loesch A, Burnstock G (2005) Presence of the P2X(7) purinergic receptor on immune cells that invade the rat endometrium during oestrus. *J Reprod Immunol* 66: 127-40
- Krüger KH, Thompson LF, Kaufmann M, Moller P (1991) Expression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in normal mammary gland and in breast carcinoma. *Br J Cancer* 63: 114-8
- Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1: 193-204

- Kukulski F, Lévesque SA, Sévigny J (2011) Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol* 61: 263-99
- Kumar V, Sharma A (2009) Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol* 616: 7-15
- Kumar V (2013) Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal* 9: 145-65
- Kuo CC, Liu JF, Shiah HS, Ma LC, Chang JY (2007) Tamoxifen accelerates proteasomal degradation of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer cells. *Int J Cancer* 121: 2293-300
- Kwan CY, Ramlal T (1985) 5'-Nucleotidase activity in smooth muscle membranes of rat vas deferens. *Mol Physiol* 8:277-292
- Lallès JP (2014) Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutr Rev* 72: 82-94
- 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
- Lazarowski ER, Sesma JI, Seminario-Vidal L, Kreda SM (2011) Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. *Adv Pharmacol* 61: 221-61
- Lee HY, Bardini M, Burnstock G (2000) P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. *Cell Tissue Res* 300: 321-30
- Lee SY, Palmer ML, Maniak PJ, Jang SH, Ryu PD, O'Grady SM (2007) P2Y receptor regulation of sodium transport in human mammary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1472-80
- Lenoir B, Wagner DR, Blacher S, Sala-Newby GB, Newby AC, Noel A, Devaux Y (2014) Effects of adenosine on lymphangiogenesis. *PLoS One* 9: e92715
- León D, Albasanz JL, Ruiz MA, Martín M (2005) Chronic caffeine or theophylline intake during pregnancy inhibits A1 receptor function in the rat brain. *Neuroscience* 131: 481-9
- Levin RM, Hypolite JA, Broderick GA (1995) Metabolic responses of rabbit corpus cavernosum tissue to various forms of stimulation. *Int J Impot Res* 7:181-94

- Levine RF, Derks R, Beaman K (2005) Regeneration and tolerance factor. A vacuolar ATPase with consequences. *Chem Immunol Allergy* 89: 126-34
- Li X, Zhou L, Feng YH, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI (2006) The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 1906-13
- 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
- Li X, Qi X, Zhou L, Fu W, Abdul-Karim FW, Maclennan G, Gorodeski GI (2009) P2X(7) receptor expression is decreased in epithelial cancer cells of ectodermal, uro-genital sinus, and distal paramesonephric duct origin. *Purinergic Signal* 5: 351-68
- Liu DY, Jennings MG, Baker HW (1987) Correlation between defective motility (asthenospermia) and ATP reactivation of demembrated human spermatozoa. *J Androl* 8: 349-53
- Llauradó M, Ruíz A, Majem B, Ertekin T, Colas E, Pedrola N, Devis L, Rigau M, Sequeiros T, Montes M, Garcia M, Cabrera S, Gil-Moreno A, Xercavins J, Castellvi J, Garcia A, Ramon y Cajal S, Moreno G, Alameda F, Vazquez-Levin M, Palacios J, Prat J, Doll A, Matias-Guiu X, Abal M, Reventós J (2012) Molecular bases of endometrial cancer: new roles for new actors in the diagnosis and the therapy of the disease. *Mol Cell Endocrinol* 358: 244-55
- 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
- Loir M (2001) Adenosine receptor-adenylate cyclase system in the trout testis: involvement in the regulation of germ cell proliferation. *Mol Reprod Dev* 58: 307-17
- Lukashev D, Sitkovsky M, Ohta A (2007) From "Hellstrom Paradox" to anti-adenosinergic cancer immunotherapy. *Purinergic Signal* 3: 129-34
- Luria A, Rubinstein S, Lax Y, Breitbart H (2002) Extracellular adenosine triphosphate stimulates acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa via P2 purinoceptor. *Biol Reprod* 66: 429-37
- Manders EM, Stap J, Brakenhoff GJ, van Driel R, Aten JA (1992) Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* 103: 857-862

- Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, Senovilla L, Seror C, Metivier D, Perfettini JL, Zitvogel L, Kroemer G (2009) Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* 8: 3723-8
- Martín-Satué M, Lavoie EG, 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: 615-28
- Martín-Satué M, Lavoie EG, Fausther M, Lecka J, Aliagas E, Kukulski F, Sévigny J (2010) High expression and activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the male murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* 133: 659-68
- Marzo L, Marijanovic Z, Browman D, Chamoun Z, Caputo A, Zurzolo C (2013) 4-hydroxytamoxifen leads to PrPSc clearance by conveying both PrPC and PrPSc to lysosomes independently of autophagy. *J Cell Sci* 126: 1345-54
- Matsuoka I, Ohkubo S, Kimura J, Uezono Y (2002) Adenine nucleotide-induced activation of adenosine A(2B) receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes: involvement of a rapid and localized adenosine formation by ectonucleotidases. *Mol Pharmacol* 61: 606-13
- Maybin JA, Critchley HO, Jabbour HN (2011) Inflammatory pathways in endometrial disorders. *Mol Cell Endocrinol* 335: 42-51
- Mazurek S, Michel A, Eigenbrodt E (1997) Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *J Biol Chem* 272: 4941-52
- Mehta N, Kaur M, Singh M, Chand S, Vyas B, Silakari P, Bahia MS, Silakari O (2014) Purinergic receptor P2X(7): a novel target for anti-inflammatory therapy. *Bioorg Med Chem* 22: 54-88
- Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz KN, Leung E, Baraldi PG, Borea PA (2002) Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 119: 923-33
- Merighi S, Mirandola P, Varani K, Gessi S, Leung E, Baraldi PG, Tabrizi MA, Borea PA (2003) A glance at adenosine receptors: novel target for antitumor therapy. *Pharmacol Ther* 100: 31-48
- Mi T, Abbasi S, Zhang H, Uray K, Chunn JL, Xia LW, Molina JG, Weisbrodt NW, Kellems RE, Blackburn MR, Xia Y (2008) Excess adenosine in murine penile erectile tissues contributes to priapism via A2B adenosine receptor signaling. *J Clin Invest* 118: 1491-501

- Mihaylova-Todorova ST, Todorov LD, Westfall DP (2002) Enzyme kinetics and pharmacological characterization of nucleotidases released from the guinea pig isolated vas deferens during nerve stimulation: evidence for a soluble ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-like ATPase and a soluble ecto-5'-nucleotidase-like AMPase. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 992-1001
- Millán JL (2006) Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal* 2: 335-41
- Milosevic M, Petrovic S, Velickovic N, Grkovic I, Ignjatovic M, Horvat A (2012) ATP and ADP hydrolysis in cell membranes from rat myometrium. *Mol Cell Biochem* 371: 199-208
- Minelli A, Allegrucci C, Piomboni P, Mannucci R, Lluís C, Franco R (2000) Immunolocalization of A1 adenosine receptors in mammalian spermatozoa. *J Histochem Cytochem* 48: 1163-71
- 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
- Minelli A, Bellezza I, Collodel G, Fredholm BB (2008) Promiscuous coupling and involvement of protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the adenosine A1 receptor signalling in mammalian spermatozoa. *Biochem Pharmacol* 75: 931-41
- 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
- Miyoshi H, Yamaoka K, Urabe S, Kodama M, Kudo Y (2010) Functional expression of purinergic P2X7 receptors in pregnant rat myometrium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R1117-24
- Miyoshi H, Yamaoka K, Urabe S, Kudo Y (2012) ATP-induced currents carried through P2X7 receptor in rat myometrial cells. *Reprod Sci* 19: 1285-91
- Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M (2009) Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol* 7: 426-34
- Monks NJ, Fraser LR (1988a) Inhibition of adenosine-metabolizing enzymes modulates mouse sperm fertilizing ability: a changing role for endogenously generated adenosine during capacitation. *Gamete Res* 21: 267-76

- Monks NJ, Fraser LR (1988b) Enzymes of adenosine metabolism in mouse sperm suspensions. *J Reprod Fertil* 83: 389-99
- Montesinos MC, Shaw JP, Yee H, Shamamian P, Cronstein BN (2004) Adenosine A_{2A} receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol* 164: 1887-92
- Montiel-Herrera M, Zaske AM, Garcia-Colunga J, Martinez-Torres A, Miledi R (2011) Ion currents induced by ATP and angiotensin II in cultured follicular cells of *Xenopus laevis*. *Mol Cells* 32: 397-404
- Mulryan K, Gitterman DP, Lewis CJ, Vial C, Leckie BJ, Cobb AL, Brown JE, Conley EC, Buell G, Pritchard CA, Evans RJ (2000) Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors. *Nature* 403: 86-9
- Natori Y, Moriguchi M, Fujiwara S, Takeshita I, Fukui M, Iwaki T, Kanaide H (1992) Effects of L-NMMA and L-NNA on the selective ATP-induced enhancement of intratumoral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 120-7
- Ning C, Qi L, Wen J, Zhang Y, Zhang W, Wang W, Blackburn M, Kellems R, Xia Y (2012) Excessive penile norepinephrine level underlies impaired erectile function in adenosine A₁ receptor deficient mice. *J Sex Med* 9: 2552-61
- Nualart-Martí A, del Molino EM, Grandes X, Bahima L, Martín-Satué M, Puchal R, Fasciani I, González-Nieto D, Ziganshin B, Llobet A, Barrio LC, Solsona C (2013) Role of connexin 32 hemichannels in the release of ATP from peripheral nerves. *Glia* 61: 1976-89
- Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M (2006) A_{2A} adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13132-7
- Orinska Z, Hein M, Petersen F, Bulfone-Paus S, Thon L, Adam D (2011) Retraction: Extracellular ATP induces cytokine expression and apoptosis through P2X₇ receptor in murine mast cells. *J Immunol* 186: 2683
- Palmer ML, Peitzman ER, Maniak PJ, Sieck GC, Prakash YS, O'Grady SM (2011) K(Ca)_{3.1} channels facilitate K⁺ secretion or Na⁺ absorption depending on apical or basolateral P2Y receptor stimulation. *J Physiol* 589: 3483-94

- Park DW, Cho T, Kim MR, Kim YA, Min CK, Hwang KJ (2003) ATP-induced apoptosis of human granulosa luteal cells cultured in vitro. *Fertil Steril* 80: 993-1002
- 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
- Rapaport E, Fishman RF, Gercel C (1983) Growth inhibition of human tumor cells in soft-agar cultures by treatment with low levels of adenosine 5'-triphosphate. *Cancer Res* 43: 4402-6
- Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H (2013) CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol* 171: 1-7
- Reigada D, Diez-Perez I, Gorostiza P, Verdaguer A, Gomez de Aranda I, Pineda O, Vilarrasa J, Marsal J, Blasi J, Aleu J, Solsona C (2003) Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3485-90
- Rivkees SA (1994) Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology* 135: 2307-13
- 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
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409-30
- Rockenbach L, Braganhol E, Dietrich F, Figueiro F, Pugliese M, Edelweiss MI, Morrone FB, Sévigny J, Battastini AM (2014) NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase/CD73 are differentially expressed during mouse bladder cancer progression. *Purinergic Signal*
- Roger S, Pelegrin P (2011) P2X7 receptor antagonism in the treatment of cancers. *Expert Opin Investig Drugs* 20: 875-80
- Romac P, Zanic Grubisic T, Jezek D, Vucic M, Culic O (2008) Hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by human spermatozoa: regulatory role of ectonucleotidases in sperm function. *Croat Chem Acta* 81:169-176

- Rossato M, La Sala GB, Balasini M, Taricco F, Galeazzi C, Ferlin A, Foresta C (1999) Sperm treatment with extracellular ATP increases fertilization rates in in-vitro fertilization for male factor infertility. *Hum Reprod* 14: 694-7
- Ruan YC, Shum WW, Belleannee C, Da Silva N, Breton S (2012) ATP secretion in the male reproductive tract: essential role of CFTR. *J Physiol* 590: 4209-22
- Saldaña C, Vázquez-Cuevas F, Garay E, Arellano RO (2005) Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle-enclosed Xenopus oocytes. *J Cell Physiol* 202: 814-21
- Sawa R, Asakura H, Power GG (1991) Changes in plasma adenosine during simulated birth of fetal sheep. *J Appl Physiol* (1985) 70: 1524-8
- Schmelzle M, Duhme C, Junger W, Salhanick SD, Chen Y, Wu Y, Toxavidis V, Csizmadia E, Han L, Bian S, Furst G, Nowak M, Karp SJ, Knoefel WT, Schulte Esch J, Robson SC (2013) CD39 modulates hematopoietic stem cell recruitment and promotes liver regeneration in mice and humans after partial hepatectomy. *Ann Surg* 257: 693-701
- Schuh SM, Hille B, Babcock DF (2007) Adenosine and catecholamine agonists speed the flagellar beat of mammalian sperm by a non-receptor-mediated mechanism. *Biol Reprod* 77: 960-9
- Shabbir M, Ryten M, Thompson C, Mikhailidis D, Burnstock G (2008) Characterization of calcium-independent purinergic receptor-mediated apoptosis in hormone-refractory prostate cancer. *Int* 101: 352-9
- Shai A, Segev Y, Narod SA (2014) Genetics of endometrial cancer. *Fam Cancer*
- Shang Y (2006) Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 6: 360-8
- Shariatmadari R, Sipila P, Vierula M, Tornquist K, Huhtaniemi I, Poutanen M (2003) Adenosine triphosphate induces Ca²⁺ signal in epithelial cells of the mouse caput epididymis through activation of P2X and P2Y purinergic receptors. *Biol Reprod* 68: 1185-92
- Shimomura Y, Ando H, Furugori K, Kajiyama H, Suzuki M, Iwase A, Mizutani S, Kikkawa F (2006) Possible involvement of crosstalk cell-adhesion mechanism by endometrial CD26/dipeptidyl peptidase IV and embryonal fibronectin in human blastocyst implantation. *Mol Hum Reprod* 12: 491-5
- Shirley DG, Vekaria RM, Sévigny J (2009) Ectonucleotidases in the kidney. *Purinergic Signal* 5: 501-11

- Sitkovsky MV, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A (2008) Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res* 14: 5947-52
- Slater M, Barden JA, Murphy CR (2000a) Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X 1-7) in uterine epithelial cells during early pregnancy. *Histochem J* 32: 365-72
- Slater M, Barden JA, Murphy CR (2000b) The purinergic calcium channels P2X1,2,5,7 are down-regulated while P2X3,4,6 are up-regulated during apoptosis in the ageing rat prostate. *Histochem J* 32: 571-80
- Slater M, Murphy CR, Barden JA (2002) Purinergic receptor expression in the apical plasma membrane of rat uterine epithelial cells during implantation. *Cell Calcium* 31: 201-7
- 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
- Slater M, Danieletto S, Barden JA (2005) Expression of the apoptotic calcium channel P2X7 in the glandular epithelium. *J Mol Histol* 36: 159-65
- Smith LL, Brown K, Carthew P, Lim CK, Martin EA, Styles J, White IN (2000) Chemoprevention of breast cancer by tamoxifen: risks and opportunities. *Crit Rev Toxicol* 30: 571-94
- 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
- Sobiesiak M, Sivasubramaniyan K, Hermann C, Tan C, Orgel M, Trembl S, Cerabona F, de Zwart P, Ochs U, Muller CA, Gargett CE, Kalbacher H, Buhring HJ (2010) The mesenchymal stem cell antigen MSCA-1 is identical to tissue non-specific alkaline phosphatase. *Stem Cells Dev* 19: 669-77
- Spychala J (2000) Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther* 87: 161-73
- Stagg J, Smyth MJ (2010) Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29: 5346-58
- Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, Dwyer KM, Smyth MJ (2010) Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1547-52

- Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, Smyth MJ (2011) CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res* 71: 2892-900
- Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Moller A, Darcy PK, Smyth MJ (2012) CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res* 72: 2190-6
- Stefan C, Jansen S, Bollen M (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30: 542-50
- Stefan C, Jansen S, Bollen M (2006) Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases. *Purinergic Signal* 2: 361-70
- Sträter N (2006) Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal* 2: 343-50
- Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, Schnermann J (2001) Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9983-8
- Sun X, Wu Y, Gao W, Enjoji K, Csizmadia E, Muller CE, Murakami T, Robson SC (2010) CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology* 139: 1030-40
- Surprenant A, North RA (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 71: 333-59
- 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
- Tai CJ, Chang SJ, Chien LY, Leung PC, Tzeng CR (2005) Adenosine triphosphate induces activation of caspase-3 in apoptosis of human granulosa-luteal cells. *Endocr J* 52: 327-35
- Takayama T, Matsubara S, Shibahara H, Minakami H, Takizawa T, Sato I (2000) Ultracytochemical localization of 5'-nucleotidase activity in human ejaculated spermatozoa. *Int J Androl* 23: 106-8
- Tanaka CI, Gebrim LH, de Lima GR, Simoes Mde D (1997) Study of the action of tamoxifen on the mammary gland epithelium of premenopausal patients by lysosome quantification. *Sao Paulo Med J* 115(2):1390-1394.

- Terp MG, Olesen KA, Arnspang EC, Lund RR, Lagerholm BC, Ditzel HJ, Leth-Larsen R (2013) Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *J Immunol* 191: 4165-73
- Tong YC, Broderick G, Hypolite J, Levin RM (1992) Correlations of purinergic, cholinergic and adrenergic functions in rabbit corporal cavernosal tissue. *Pharmacology* 45: 241-9
- Turbiner J, Moreno-Bueno G, Dahiya S, Sánchez-Estévez C, Hardisson D, Prat J, Oliva E, Palacios J (2008) Clinicopathological and molecular analysis of endometrial carcinoma associated with tamoxifen. *Mod Pathol* 21(8):925-936.
- Urabe S, Miyoshi H, Fujiwara H, Yamaoka K, Kudo Y (2009) Enhanced expression of P2X4 and P2X7 purinergic receptors in the myometrium of pregnant rats in preterm delivery models. *Reprod Sci* 16: 1186-92
- Valenzuela MA, Collados L, Kettlun AM, Mancilla M, Lara H, Puente J, Aranda E, Chayet L, Álvarez A, Traverso-Cori A (1992) Changes in apyrase activity in uterus and mammary gland during the lactogenic cycle. *Comp Biochem Physiol B* 103: 113-8
- Vasudevan K, Szein JM (2011) Treatment of sperm with extracellular adenosine 5'-triphosphate improves the in vitro fertility rate of inbred and genetically modified mice with low fertility. *Theriogenology* 76: 729-36
- Vázquez-Cuevas FG, Cruz-Rico A, Garay E, García-Carranca A, Pérez-Montiel D, Juárez B, Arellano RO (2013) Differential expression of the P2X7 receptor in ovarian surface epithelium during the oestrous cycle in the mouse. *Reprod Fertil Dev* 25: 971-84
- Volonte C, D'Ambrosi N (2009) Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *FEBS J* 276: 318-29
- von Kügelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther* 110: 415-32
- 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: 365-72

- Weitlauf H (1994) Biology of implantation. In: Knobil E, Neil JD (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp 391-440
- Wen X, Perrett D, Jones N, Tozer AJ, Docherty SM, Iles RK (2010) High follicular fluid adenosine levels may be pivotal in the metabolism and recycling of adenosine nucleotides in the human follicle. *Metabolism* 59: 1145-55
- Wen J, Dai Y, Zhang Y, Zhang W, Kellems RE, Xia Y (2011) Impaired erectile function in CD73-deficient mice with reduced endogenous penile adenosine production. *J Sex Med* 8: 2172-80
- Wen J, Xia Y (2012) Adenosine signaling: good or bad in erectile function? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 845-50
- Westwood FR (2008) The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol* 36: 375-84
- White N, Burnstock G (2006) P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 27: 211-7
- Whitley GS, Cartwright JE (2010) Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* 31: 465-74
- Wilhelm K, Ganesan J, Muller T, Durr C, Grimm M, Beilhack A, Krempl CD, Sorichter S, Gerlach UV, Juttner E, Zerweck A, Gartner F, Pellegatti P, Di Virgilio F, Ferrari D, Kambham N, Fisch P, Finke J, Idzko M, Zeiser R (2010) Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med* 16: 1434-8
- Wong PY (1988) Control of anion and fluid secretion by apical P2-purinoceptors in the rat epididymis. *Br J Pharmacol* 95: 1315-21
- 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
- Wu XR, He XS, Chen YF, Yuan RX, Zeng Y, Lian L, Zou YF, Lan N, Wu XJ, Lan P (2012) High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J Surg Oncol* 106: 130-7
- Xu S, Shao QQ, Sun JT, Yang N, Xie Q, Wang DH, Huang QB, Huang B, Wang XY, Li XG, Qu X (2013) Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro Oncol* 15: 1160-72
- Yang Q, Du J, Zu L (2013) Overexpression of CD73 in prostate cancer is associated with lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res* 19: 811-4

- Yasue A, Hasegawa K, Udagawa Y (2011) Effects of tamoxifen on the endometrium and its mechanism of carcinogenicity. *Hum Cell* 24: 65-73
- Yegutkin GG (2008) Nucleotide-and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-94
- Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemela J, Laurila JP, Elima K, Jalkanen S, Salmi M (2011) Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol* 41: 1231-41
- Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, Catusus L, Abal M, Colas E, Reventós J, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X (2013) Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene* 32: 403-13
- Yoneyama Y, Suzuki S, Sawa R, Otsubo Y, Power GG, Araki T (2000) Plasma adenosine levels increase in women with normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 182: 1200-3
- Zhang B (2010) CD73: a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res* 70: 6407-11
- Zhang B (2012) CD73 promotes tumor growth and metastasis. *Oncoimmunology* 1: 67-70
- Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, Yin L (2007) RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clin Exp Metastasis* 24: 439-48
- Zhou L, Qi X, Potashkin JA, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI (2008) MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *J Biol Chem* 283: 28274-86
- Ziganshin AU, Zaitsev AP, Shamsutdinov AF (2002) Pharmacological characteristics of P2 receptors in human uterus. *Bull Exp Biol Med* 133: 255-7
- Zimmermann H (2000) Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309
- Zimmermann, H (2001). "Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature." *Drug Dev Res* 52, 44-56
- Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8: 437-502

Zimon A, Erat A, Von Wald T, Bissell B, Koulova A, Choi CH, Bachvarov D, Reindollar RH, Usheva A
(2006) Genes invoked in the ovarian transition to menopause. *Nucleic Acids Res* 34: 3279-87

ANNEX

“You cannot create experience. You must undergo it”

Albert Camus

ANNEX 1

High expression and activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the male murine reproductive tract

Martín-Satué M, Lavoie E.G, Fausther M, Lecka J,
Aliagas E, Kukulski F, Sévigny J.

Histochemistry and Cell Biology

2010;133(6):659-68.

High expression and activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the male murine reproductive tract

Mireia Martín-Satué · Elise G. Lavoie ·
Michel Fausther · Joanna Lecka · Elisabet Aliagas ·
Filip Kukulski · Jean Sévigny

Accepted: 25 April 2010 / Published online: 11 May 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Extracellular ATP and its hydrolysis product adenosine modulate various reproductive functions such as those requiring contraction, steroidogenesis, and maintenance of fluid composition. Interestingly, adenosine might act as a key capacitative effector for mammalian spermatozoa to acquire the capacity for fertilisation. Extracellular nucleotide levels are affected by cell surface ectonucleotidases, amongst which the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family regroups the most abundant and effective enzymes to hydrolyse ATP and ADP to AMP in physiological conditions. In the male reproductive tract three members of this family have been indentified: NTPDase1, NTPDase2 and NTPDase3 (Martín-Satué et al. in *Histochem Cell Biol* 131:615–628, 2009). The purpose of the present study was to characterize in the male reproductive tract the expression profile of the main enzyme responsible for the generation of adenosine

from AMP, namely the ecto-5'-nucleotidase (CD73). The enzyme was identified by immunological techniques and by in situ enzymatic assays, including inhibition experiments with α,β -methylene-ADP, a specific CD73 inhibitor. High levels of ecto-5'-nucleotidase were detected in testes in association with both germinal and somatic cells, in smooth muscle cells throughout the tract, in secretory epithelia from exocrine glands, and remarkably, in principal cells of epididymis, where co-localization with NTPDase3 was found. The relevance of this co-expression on nucleotide hydrolysis in these cells directly involved in the control of sperm fluid composition was addressed biochemically. This study suggests close regulation of extracellular nucleoside and nucleotide levels in the genital tract by ecto-5'-nucleotidase that, in concurrence with NTPDases, may impact male fertility.

Keywords Ecto-5'-nucleotidase · CD73 · NTPDase · ATP · Adenosine · Epididymis · Sperm · P1 and P2 receptors

M. Martín-Satué and E. G. Lavoie contributed equally to the work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00418-010-0704-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Martín-Satué · E. G. Lavoie · M. Fausther · J. Lecka ·
F. Kukulski · J. Sévigny (✉)
Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre
Hospitalier Universitaire de Québec, Université Laval, 2705
Blvd Laurier, Local T1-49, Québec, QC G1V 4G2, Canada
e-mail: Jean.Sevigny@crchul.ulaval.ca

M. Martín-Satué (✉) · E. Aliagas
Departament Patologia i Terapèutica Experimental,
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona-IDIBELL,
C/Feixa Llarga s/n, Pavelló de Govern 4^a planta, lab. 4145,
08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain
e-mail: martinsatue@ub.edu

Introduction

Extracellular nucleotides (ATP, ADP, UTP and UDP) as well as the nucleoside derivative adenosine are important autocrine and paracrine signalling molecules eliciting a large number of biological effects via receptors collectively named purinoceptors. Nucleotides act on two major widely expressed receptor subfamilies: P2X receptors, which are ligand-gated ions channels, and G-protein-coupled P2Y receptors (reviewed in Boeynaems et al. 2005; Burnstock 2006). Adenosine triggers signal transduction via four G protein-coupled receptors denoted A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ (Benarroch 2008; Fredholm et al. 2001).

Extracellular adenosine plays a variety of roles in male reproduction. It stimulates anion secretion across vas deferens epithelium, influencing luminal environment and thus playing a role in male fertility (Carlin et al. 2003). It also exerts control of vas deferens contractions through regionally differentially expressed adenosine A₂ receptors (Diniz et al. 2003). Moreover, adenosine might also act as a capacitative effector, controlling sperm motility and fertility (Fraser 2008; Minelli et al. 2004; Schuh et al. 2007), and expression of adenosine receptors has been demonstrated in mammalian spermatozoa (Minelli et al. 2000, 2008); interestingly, different adenosine receptor subtypes are active depending on the capacitation state (Adeoya-Osiguwa and Fraser 2002). Although many cell types express adenosine transporters, the main source of extracellular adenosine is via the hydrolysis of extracellular ATP by ectonucleotidases. The fact that ATP also influences male fertility through activation of differentially expressed P₂ receptors (Banks et al. 2009; Burnstock 2007; Rodriguez-Miranda et al. 2008; Zhou et al. 2007) makes the regulation of the concentration of these molecules of crucial importance.

Activation of purinoceptors is influenced by cell surface ectonucleotidases, amongst which, members of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family are dominant, especially the four plasma membrane bound NTPDases: NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3 and NTPDase8 (Robson et al. 2006; Yegutkin 2008; Zimmermann 2001). These enzymes hydrolyze nucleoside triphosphates and diphosphates to monophosphates, mainly differing in the hydrolysis rates for nucleoside diphosphates. Whereas NTPDase1 (CD39) dephosphorylates ATP and ADP at a similar rate, both NTPDase3 and 8 degrade ATP with a preference over ADP, and NTPDase2 is efficient at hydrolysing nucleoside triphosphates but inefficient with diphosphates (Robson et al. 2006). In mammals, these enzymes are differentially expressed and their location and activity in male murine reproductive tract have been recently described (Martín-Satué et al. 2009). Other than the expected expression on vascular endothelial and smooth muscle cells, NTPDase1 was also detected in some somatic cell types in testis and in apical cells of the epididymal epithelium. NTPDase2 was largely expressed by cells in the connective tissue and NTPDase3 in secretory epithelia, including those of accessory glands, and remarkably in epididymis. NTPDase8 was not detected in any of these tissues. AMP, the final product of NTPDases' activity might then be hydrolysed to adenosine by ecto-5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-linked membrane-bound glycoprotein (Colgan et al. 2006; Resta et al. 1993). Previous studies have pointed to the existence of 5'-nucleotidase activity in mouse sperm suspensions (Monks and Fraser 1988) although its

expression along the male murine reproductive tract has not been studied so far.

Due to the relevance of this activity in the generation of extracellular adenosine, a key modulator of male fertility, the aim of the present work was to characterize the presence of an enzymatically active ecto-5'-nucleotidase in the murine male reproductive tract. Results shown here suggest that this enzyme, in combination with the previously identified NTPDases, is of importance in male fertility.

Materials and methods

Animals

This study was carried out in accordance with the guidelines of the Institutional Ethical Committee for Experimental Animals. Mature 8- to 10-week-old C57BL/6 male mice were killed and the tissues biopsied.

Antibodies

Primary antibodies used in this study have been previously characterized and validated: rabbit polyclonal rNu-9_L to rat CD73 (Koszalka et al. 2004), guinea pig polyclonal mN1-2_c to mouse NTPDase1 and guinea pig polyclonal mN3-3_c to mouse NTPDase3 (Martín-Satué et al. 2009), and rat monoclonal antibody to F4/80 (a macrophage marker; clone A3-1, Serotec Ltd, Oxford, UK). Secondary antibodies used were: biotin-conjugated goat anti-rabbit, goat anti-guinea pig (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), goat anti-rat (Vector Laboratories Inc., Burlington, ON, Canada); horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson Immuno Research Laboratories Inc.); Alexa Fluor 488-goat anti-rabbit; Alexa Fluor 594-goat anti-guinea pig and Alexa Fluor 594-goat anti-rat (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

Cell transfection and ectonucleotidase activity assays

COS-7 cells were cultured and transiently transfected with plasmids expressing either rat ecto-5'-nucleotidase or NTPDase3, as described previously (Kukulski et al. 2005). For the ectonucleotidase assay at high ATP concentration (500 μM), cell lysates equivalent to 24 nmol/min of ATPase (for NTPDase3) or AMPase (for ecto-5'-nucleotidase) activities, as determined by the Malachite Green procedure according to Baykov et al. (1988) were used. The enzymatic reactions were performed at 37°C for 150 min in a Ringer buffer (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2.5 mM MgCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM dextrose, 80 mM Tris-HCl, pH 7.4) and

the products of ATP hydrolysis were determined by reverse phase HPLC, as previously described (Kukulski et al. 2005). Controls using protein extracts of untransfected COS-7 cells as well as extracts of NTPDase3 or ecto-5'-nucleotidase-transfected cells alone were performed.

For the assay at low ATP concentration (1 μ M), cell lysates were added to obtain an activity (NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase) that hydrolysed 40% of substrate (ATP and AMP, respectively) in 5 min of reaction time, as determined by HPLC. The enzymatic reactions were performed at 37°C for 30 min in the following incubation medium: modified Krebs buffer (114 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.16 mM MgSO₄, 20 mM HEPES, 2.5 mM CaCl₂, 2.5 mM MgCl₂, 25.5 mM NaHCO₃, pH 7.4). Modified Krebs buffer is more suitable than Ringer buffer for the method employed to estimate the low concentrations of adenylated species, as it does not produce autofluorescence. Briefly, 150- μ l aliquots of reaction mixture were collected at different time points and transferred to an equal volume of ice-cold 5% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) for deproteinization. The samples were centrifuged for 3 min at 10,000g at 4°C and the supernatants were subjected to TCA and lipids extraction with diethyl ether (3:1, v/v; 5 times). The resulting samples were subsequently transformed to etheno(ϵ)-derivatives, according to a modified derivatization protocol by Levitt et al. (Lazarowski et al. 2004; Levitt et al. 1984). This additional step allows the determination of about 50-fold lower concentration of adenylated species, when using a fluorescent detector. In a representative derivatization assay, 200- μ l aliquots of the extracted samples were incubated for 60 min at 70°C in the presence of 1 M ClCH₂CHO and 25 mM Na₂HPO₄ (pH 4.0) in a final volume of 250 μ l. The resulting fluorescent 1, N6-etheno-adenine derivatives (ϵ -ATP, ϵ -ADP, ϵ -AMP and ϵ -adenosine) were separated by reverse phase HPLC using the following mobile phases: 25 mM TBA, 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.0 and 10% methanol (v/v). All experiments were performed in triplicate, with controls in which the cell lysates were added after the reaction had been stopped. Separation and detection of ethenylated derivatives were performed with an automated Waters and Beckman HPLC system equipped with a RF-10A_{XL} Shimadzu Fluorescence Detector at an excitation and emission wavelengths of 307 and 410 nm, respectively. Identification and quantification of the fluorescent adenyl purine derivatives was done by comparison with the retention times and peak areas of corresponding ϵ -purine standards.

Western blot assays

Protein homogenates from COS-7 cells transfected with rat ecto-5'-nucleotidase (Koszalka et al. 2004) and tissue

particulate fractions, obtained by further centrifuging the tissue homogenates at 100,000g for 45 min, were resuspended in NuPAGE lithium dodecyl sulfate sample buffer (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Particulate protein fraction corresponding to 100 μ g of protein homogenates or 5 μ g of protein from lysates of transfected cells, were added per lane, separated on NuPAGE 4–12% Bis–Tris gels (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) under nonreducing conditions, according to Laemmli (1970), and transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) by electroblotting according to the manufacturer's recommendation. Membranes were then blocked with 2.5% nonfat milk, 1% BSA in PBS containing 0.15% Tween[®]20 (pH 7.4) overnight at 4°C and subsequently probed by incubation with rabbit rNu-9_L primary antibody for 90 min at 25°C. Anti-rabbit secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody was used, and the membranes developed with the Western Lightning[™] Plus-ECL system (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, CT, USA).

Sperm suspensions were obtained by extruding the contents of two cauda epididymides into 100 μ l of PBS. The suspensions were centrifuged 5 min at 700g and the supernatant and the pellet were loaded separately into a gel. Also sperm suspensions were homogenized and quantified and 10 μ g were loaded into a gel and run under nonreducing conditions.

Immunohistochemistry, immunofluorescence and enzyme histochemistry

For histochemical studies, freshly dissected tissues were embedded in OCT compound (Optimal Cutting Temperature; Tissue-Tek[®], Sakura Finetek, USA) and snap-frozen in isopentane in dry ice and stored at –80°C until required. Sections of 6 μ m were prepared and fixed in 10% phosphate-buffered formalin mixed with cold acetone (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Alternatively, the testes were excised, fixed with 4% paraformaldehyde and immersed in sucrose before being included in OCT compound. Sperm suspensions were directly smeared onto a slide and in situ fixed by flushing with 95% ethanol. Immunohistochemistry (peroxidase-based activity) and immunofluorescence experiments were performed as previously described (Fausther et al. 2007; Martín-Satué et al. 2009). Briefly, tissue sections or sperm smears were incubated overnight at 4°C with the indicated primary antibodies and then with the appropriate secondary antibodies. Preimmune sera (for rNu-9_L, mN1-2_C and mN3-3_C antibodies), and secondary antibodies alone were routinely included as controls for the immunolabelling experiment.

Localization of ectonucleotidase activities was determined using the Wachstein/Meisel lead phosphate method

(Braun et al. 2003). Fixed slices were preincubated for 30 min at RT in 50 mM Tris–maleate buffer, pH 7.4, containing 2 mM CaCl_2 , 250 mM sucrose and 2.5 mM levamisole, as an inhibitor of alkaline phosphatase. Enzymatic reaction was performed for 1 h at 37°C in the same buffer supplemented with 5 mM MnCl_2 , 2 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 3% Dextran T-250 and in the presence of 200 μM AMP as substrate. For control experiments the substrate was omitted. The reaction was revealed by incubation with 1% $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ (v/v) for exactly 1 min. For CD73 inhibition experiments, 200 μM α,β -methylene-ADP (α,β -meADP) was added to both preincubation and enzymatic reaction buffers.

Samples were counterstained with aqueous haematoxylin or DAPI, mounted with Mowiol mounting medium, analysed and photographed under a BX51 Olympus® or Nikon Eclipse E-800 microscopes. For confocal experiments, nuclei were stained with To-Pro®-3 (Invitrogen) and photographed under a Leica TCS-SL spectral confocal microscope.

Results

Ecto-5'-nucleotidase protein expression by Western blot

All the tissues analysed expressed ecto-5'-nucleotidase (Fig. 1) as revealed by the specific 66-kDa band also detected in CD73-transfected COS-7 cells used as control. The protein was also detected in sperm suspensions obtained from cauda epididymides in association with the soluble fraction but not with spermatozoa, a fact that was

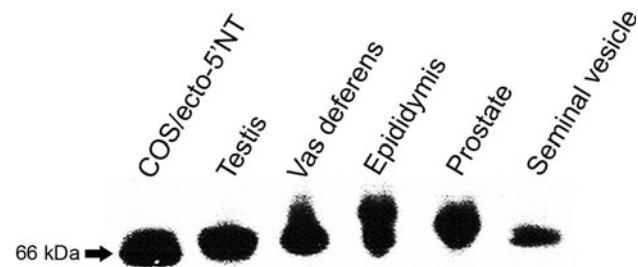


Fig. 1 Western blot of ecto-5'-nucleotidase in membrane fractions from mouse male tissues. Particulate membrane protein fractions corresponding to 100 μg of proteins from tissue homogenates, or 5 μg of proteins from ecto-5'-nucleotidase-transfected COS-7 cell lysates (*Cos/ecto-5'NT*), used as a positive control, were added per lane and the membrane was probed with the antibody rNU-9₁ against ecto-5'-nucleotidase. A specific band was detected in all samples analysed

confirmed by immunofluorescence experiments performed on isolated spermatozoa (Supplementary Fig. 1).

Ecto-5'-nucleotidase immunolocalization and enzymatic histochemistry

Testes

Ecto-5'-nucleotidase was immunolocalized in testes, in association with germinal cells along all stages of spermatogenesis, but not in spermatozoa. The protein was also detected in somatic cells: Sertoli cells, peritubular and interstitial cells. Immunofluorescence experiments with the antibody F4/80 for macrophage staining were performed, demonstrating that both macrophages and Leydig cells were stained at the interstitial tissue. AMPase activity was detected in all these cells and was not displayed in the presence of α,β -methylene-ADP (α,β -meADP), a specific ecto-5'-nucleotidase inhibitor (Fig. 2).

Excurrent ducts

Epididymis Ecto-5'-nucleotidase was detected in smooth muscle cell layers surrounding the duct and also at the apical side of cauda epithelium, as a near continuous labelling lining the lumen, coinciding with the distribution of epididymal principal cells. AMPase activity confirmed that the immunodetected protein was enzymatically active and the inhibitor α,β -meADP markedly diminished this activity (Fig. 3). Equivalent results were found in the three regions of epididymis (caput, corpus and cauda), and although no quantitative analysis was carried out, cauda consistently displayed the strongest labelling and AMPase activity (Supplementary Fig. 2).

Immunofluorescence experiments showed co-localization of ecto-5'-nucleotidase with NTPDase3 at the epithelium, both enzymes being expressed by principal cells (shown for cauda in Fig. 4). On the contrary, NTPDase1, expressed by epididymal apical cells, showed no co-localization with ecto-5'-nucleotidase. We have already previously demonstrated this differential localisation for NTPDase1 and NTPDase3. Note the red dotted labelling at the basal side of epithelia for NTPDase3 labelling that is not specific, as also previously demonstrated for this structure using the same antibody (Martín-Satué et al. 2009).

Vas deferens Ecto-5'-nucleotidase was immunodetected in the thick muscle cell layers surrounding the duct, coinciding with a strong AMPase activity, across the plasma membrane of smooth muscle cells (Fig. 3). Neither labelling nor activity was present in the epithelium, except in

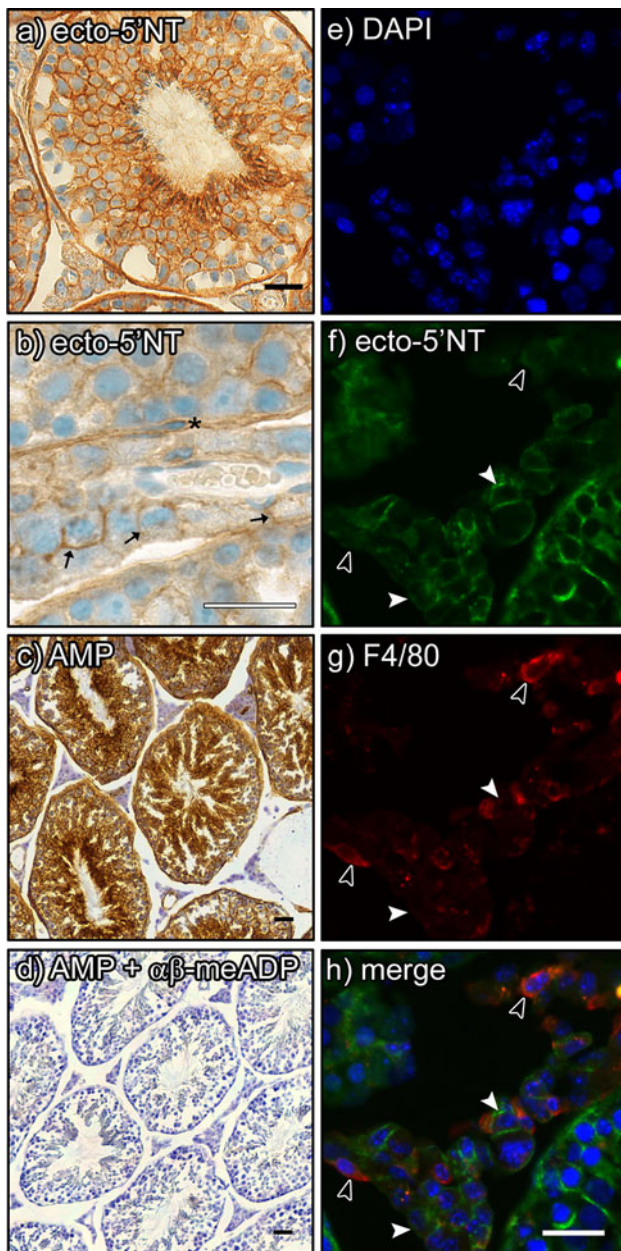


Fig. 2 Localization of ecto-5'-nucleotidase in mouse testes. Immunolocalization (**a**, **b**, **e–h**) and in situ activity (**c**, **d**) of ecto-5'-nucleotidase in testes. Ecto-5'-nucleotidase was immunodetected in both germinal and somatic cells [Sertoli cells, peritubular cells (*asterisk*) and interstitial cells (*arrows*)], as shown in images **a** and **b**. Immunofluorescence experiments (**e–h**) showed that ecto-5'-nucleotidase-positive cells (*green* in **f** and **h**) at the interstitial tissue are both Leydig cells (*filled arrowheads*) and macrophages (*open arrowheads*). DAPI was used for nuclei staining (**e**) and F4/80 antibody for interstitial macrophage immunodetection (**g**). Ecto-5'-nucleotidase enzyme activity with AMP as a substrate (**c**) is eliminated in the presence of its specific inhibitor α,β -meADP (**d**). Scale bar black 25 μm and white 10 μm

the epididymal portion of vas deferens (not shown). AMPase activity was barely detectable in the presence of α,β -meADP.

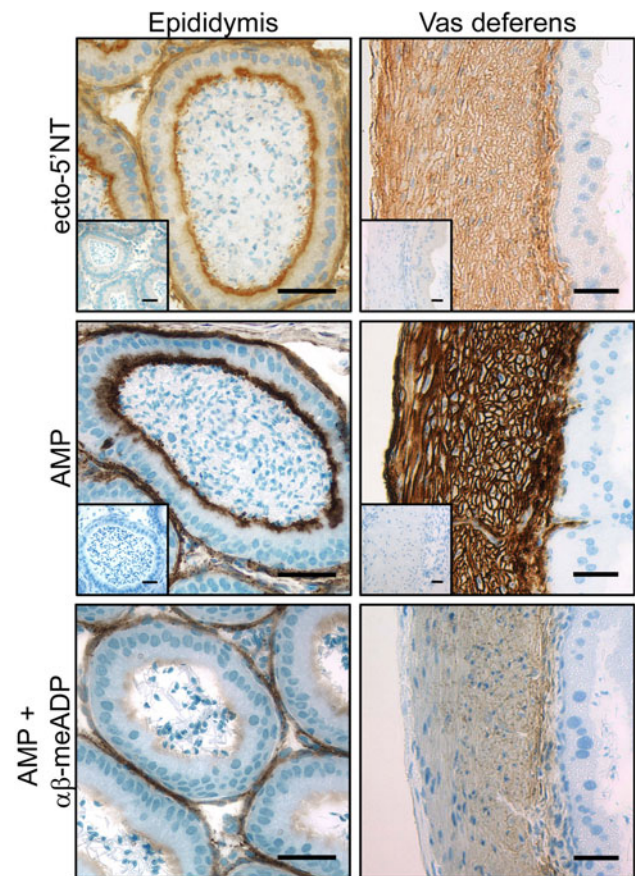


Fig. 3 Immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase and enzyme histochemistry in mouse excurrent ducts. In the epididymis (*left column*), ecto-5'-nucleotidase (*ecto-5'NT*) is immunodetected in the thin smooth muscle layer surrounding the duct and at the luminal surface of principal cells from the epithelium. In the vas deferens (*right column*), ecto-5'-nucleotidase is immunolocalized at the smooth muscle of tunica muscularis (*top image*). The localization of the AMPase activity (*AMP*) mirrors the immunolocalization (*middle images*) and the inhibitor α,β -meADP strongly diminishes brown precipitates (*AMP + α,β -meADP*). *Insets* in the *top images* correspond to the controls with the preimmune sera, and *insets* in the *middle images* are controls for the enzyme histochemistry performed in the absence of AMP. Scale bar 50 μm

Accessory glands

Seminal vesicles Ecto-5'-nucleotidase was predominantly immunolocalized to smooth muscle cells and also at the luminal side of epithelial cells, coinciding with the localization of AMPase activity (Fig. 5). Activity was markedly diminished by α,β -meADP.

Prostate Ecto-5'-nucleotidase was detected in smooth muscle cells of the prostate parenchyma coinciding with an intense AMPase activity that strongly diminished in the presence of α,β -meADP in the reaction buffer. Ecto-5'-nucleotidase was also immunolocalized at the apical pole

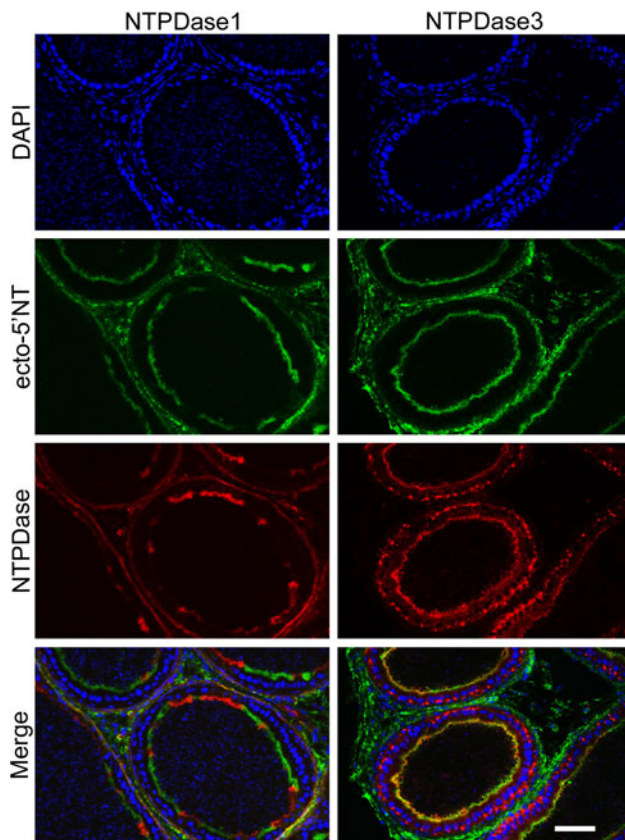


Fig. 4 Double immunofluorescence of ecto-5'-nucleotidase with either NTPDase1 or NTPDase3 in mouse epididymis. Fluorescence merge images (*bottom*) show that ecto-5'-nucleotidase (*ecto-5'NT*; *green*) colocalizes with NTPDase3 (*red*) on the apical side of epididymal epithelial principal cells (*right column*), and that it is expressed on distinct cells than NTPDase1 (*red*; *left column*). Nuclei are stained with DAPI (*top images*; *blue*). *Red dotted* labelling at the basal side of epithelia for NTPDase3 labelling is not specific, as previously demonstrated for this structure using the same antibody (Martín-Satué et al. 2009). *Scale bar* 50 μ m

of epithelial cells lining the lumen of the secretory portion of the glands, where AMPase activity was sparse, being completely inhibited by α,β -MeADP (Fig. 5).

Bulbourethral glands Ecto-5'-nucleotidase was immunodetected in cells surrounding the secretory acini, coinciding with the localization of myoepithelial cells in these glands. AMPase activity was strongly detected in these cells and was depleted in the presence of α,β -meADP, again confirming that ecto-5'-nucleotidase is the main enzyme responsible for this activity (Fig. 5).

NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase activities in presence of different ATP concentrations

From this and our previous work we have demonstrated that both ecto-5'-nucleotidase and NTPDase3 are expressed in several epithelia, such as that of epididymis, prostate and

seminal vesicles. We then wanted to address biochemically the relevance of this co-expression, in terms of rate of ATP hydrolysis (and AMP generation) by NTPDase3, and adenosine generation by ecto-5'-nucleotidase. For this purpose, recombinantly expressed NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase were combined and incubated in the presence of different ATP concentrations, and the resulting hydrolysis products (ADP, AMP and adenosine) quantified.

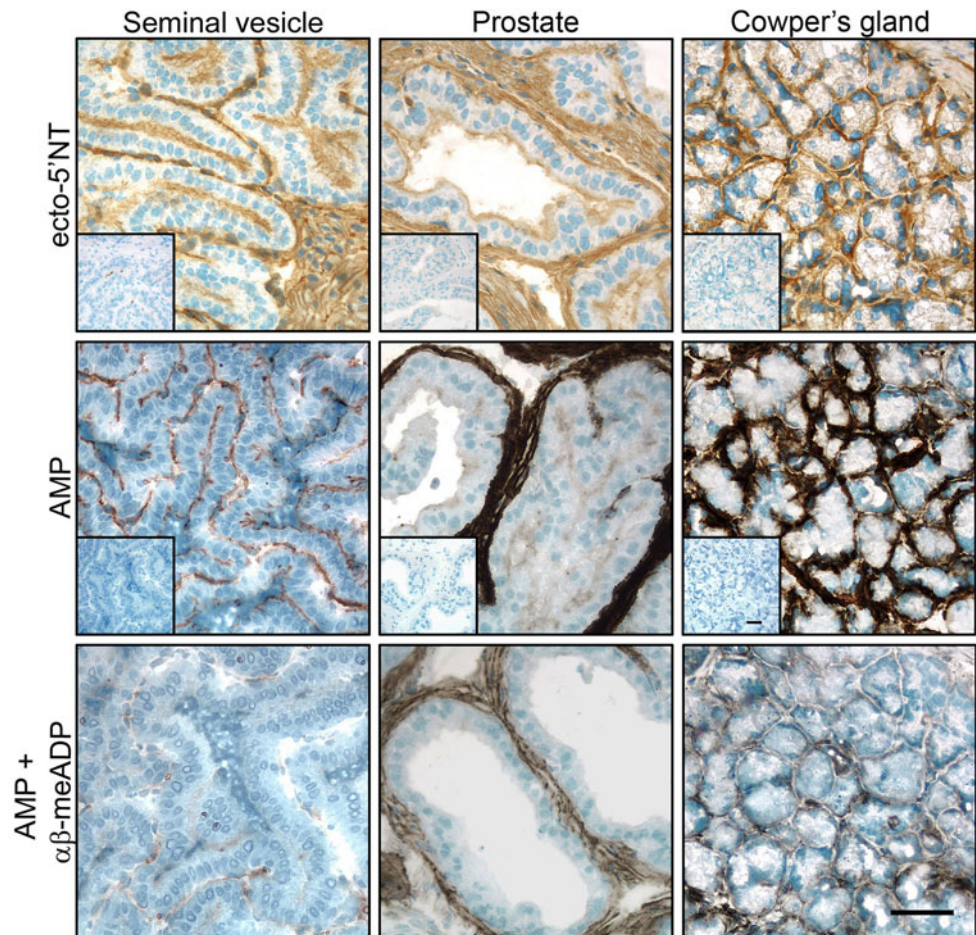
At high substrate concentration (500 μ M ATP), the final hydrolysis products in the presence of NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase were adenosine and AMP. After 10 min of reaction, more than 50% of ATP was already converted to ADP (Fig. 6a). Then, as NTPDase3 ATPase activity is greater than its ADPase activity, ADP level transiently increased in the medium and remained higher than 200 μ M for about an hour. As ATP, and especially ADP, are potent inhibitors of ecto-5'-nucleotidase, AMP accumulated linearly until ADP concentration was lower than 200 μ M and did not exert a complete inhibition of ecto-5'-nucleotidase. Only then, the production level of adenosine from ecto-5'-nucleotidase increased rapidly. This profile of ATP hydrolysis is different from those obtained for the individual protein extracts of NTPDase3- and ecto-5'-nucleotidase-transfected cells. NTPDase3-transfected extracts rapidly hydrolyzed ATP to AMP without adenosine formation (Kukulski et al. 2005), while insignificant ATPase activity was detected for ecto-5'-nucleotidase protein extracts that corresponded to the low intrinsic ATPase activity of untransfected COS-7 cells (\sim 5% of the activity of ATPase activity of NTPDase3-transfected cells; data not shown). Moreover, the protein extracts of neither ecto-5'-nucleotidase-transfected nor untransfected COS-7 cells exhibited any detectable ADPase and AMPase activities (data not shown).

At low substrate concentration (1 μ M ATP), ADP accumulated following ATP hydrolysis, reaching a plateau after 10 min and then remained constant (Fig. 6b). These results show that ADP was poorly hydrolysed to AMP, supplying therefore a low amount of substrate for ecto-5'-nucleotidase. The little amount of AMP synthesized was quickly converted to adenosine by ecto-5'-nucleotidase, and AMP did not accumulate at all. Therefore, under these conditions (low ATP concentration), the ability of NTPDase3 to hydrolyze ADP and generate AMP appeared as the rate-limiting factor of adenosine generation.

Discussion

Extracellular ATP and its hydrolysis product adenosine modulate various reproductive functions. Besides regulating smooth muscle contraction and anion secretion in excurrent ducts, adenosine can regulate capacitation in

Fig. 5 Immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase and enzyme histochemistry in accessory glands. In the seminal vesicles (*left column*), ecto-5'-nucleotidase (*ecto-5'NT*) is immunodetected at the luminal surface of the epithelium lining the vesicle lumen and in the smooth muscle layer (*top image*). A similar labelling was found in the prostate (*middle column*). In the Cowper's glands (*right column*) ecto-5'-nucleotidase localizes to myoepithelial cells. AMPase activity (*AMP*) is seen on all the above ecto-5'-nucleotidase-positive structures and is clearly diminished in the presence of the inhibitor α,β -meADP (*AMP + α,β -meADP*). *Insets in top images* correspond to the controls with the preimmune sera and *insets in middle images* are controls for the enzyme histochemistry in the absence of AMP. *Scale bar* 50 μ m



vitro. The study of its benefits in artificial insemination, helping spermatozoa maintain fertilizing potential, is of remarkable interest (reviewed in Fraser 2008). Thus, modulation of extracellular ATP and adenosine levels appears crucial in the regulation of male fertility. The present work shows the precise localization and activity in the mouse male reproductive system of ecto-5'-nucleotidase, the main enzyme responsible for adenosine generation from AMP, and demonstrates that it is abundantly and differentially expressed along the tract. Its presence in combination with membrane expressed NTPDases, the enzymes hydrolysing ATP and ADP to AMP, is further discussed in this section.

The expression of adenosine receptors in testes has been described (Rivkees 1994), playing a role in regulating germ cell proliferation (Loir 2001). Ecto-5'-nucleotidase was abundantly immunodetected in both germinal and somatic cell types of testes (Fig. 2), pointing to a possible role of the generated adenosine in spermatogenesis. NTPDase1 and 2 were immunolocalized in Sertoli cells, which are also able to release ATP that might act in an autocrine manner. The presence of ecto-5'-nucleotidase in interstitial cells was detected in both macrophages, which also express

NTPDase1, and Leydig cells. Although the P2 receptor pattern in mouse Leydig cells (Antonio et al. 2009; Glass et al. 2001) and extracellular ATP stimulation of testosterone secretion (Foresta et al. 1996) have been well-defined, adenosine receptors have not yet been identified at interstitial cells and would be an interesting issue to address.

Sperm transport and excretion require contraction of the excurrent ducts, especially the vas deferens, where the influence of both extracellular ATP and adenosine, acting through differentially expressed purinergic receptors, is well documented (Diniz et al. 2003; Queiroz et al. 2003a, b; Zhou et al. 2007). The high ecto-5'-nucleotidase expression and activity levels in the smooth muscle layers shown here, together with the already reported expression of NTPDase1 and 2 (Martín-Satué et al. 2009), point to the implication of these enzymes in the control of smooth muscle contraction by the regulation of extracellular ATP and adenosine levels. Consistent with this, NTPDase1 has recently been demonstrated to regulate smooth muscle cell contraction in mouse aorta (Kauffenstein et al. 2010).

Moreover, in excurrent ducts, ATP and adenosine stimulate anion secretion across the epithelium (Carlin

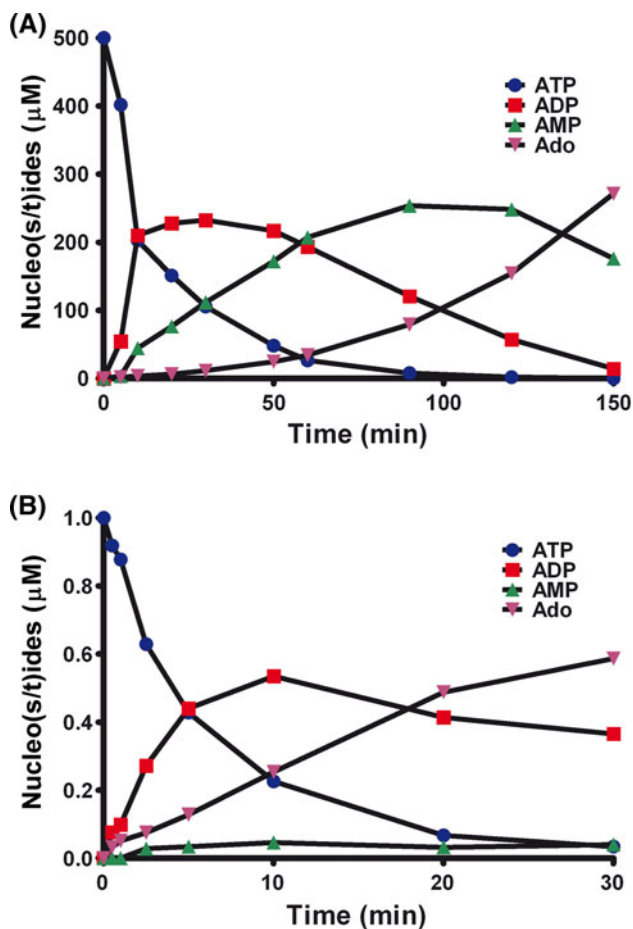


Fig. 6 ATP hydrolysis profiles in the presence of ecto-5'-nucleotidase and NTPDase3. Hydrolysis products at high (500 μM ; panel **a**) and low (1 μM ; panel **b**) ATP concentrations were analysed over time. At high substrate concentration, ATP was converted to AMP and adenosine (*Ado*), with a transient accumulation of ADP. At low substrate concentration, ATP was dephosphorylated to ADP, which accumulated in the reaction medium. Generated AMP did not accumulate and was immediately processed to adenosine

et al. 2003; Zhou et al. 2007) and adenosine (P1) and ATP (P2) receptors have been recently identified in rat epithelial epididymal cells (Belleannee et al. 2009). The presence of both NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase in principal epididymal cells suggests that these are the main enzymes responsible for modulating luminal ATP and adenosine concentrations, thus greatly influencing fluid composition. The activity of these enzymes might also, in turn, be affected by luminal nucleotide concentration, as suggested by the biochemical experiments shown here (Fig. 6). Thus, at higher ATP concentration, ecto-5'-nucleotidase was transiently inhibited due to the rapid hydrolysis of ATP by NTPDase3 and accumulation of the ADP, a potent CD73 inhibitor, as observed with the concomitant AMP accumulation and slow adenosine production. In epididymis, the rapid hydrolysis of ATP under these conditions might be crucial in avoiding unsuitable activation of sperm,

which is known to occur at ATP concentrations from 50 μM to 5 mM (Foresta et al. 1992). Interestingly, at low ATP concentration, the most likely physiological condition, the rate-limiting enzyme appeared to be NTPDase3 that could hardly hydrolyse ADP to the ecto-5'-nucleotidase substrate. Immunolabelling and histochemical data reported here support the hypothesis that ecto-5'-nucleotidase is the main enzyme responsible for the accumulation of adenosine in sperm fluid, which would be of importance for epididymal function in sperm maturation and maintenance of fluid composition.

Previous reports have demonstrated the presence of 5'-nucleotidase activity in mouse sperm suspensions (Monks and Fraser 1988). We have not detected ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in spermatozoa either isolated from cauda epididymides or in tissue slices. However, western blot analysis revealed the presence of the protein in the soluble fraction of the sperm (not in isolated spermatozoa), suggesting the presence of the enzyme in its soluble form. A possible role of the soluble enzyme is to contribute to adenosine generation that favors capacitation once the sperm has been ejaculated. Besides this possible source of adenosine, we have recently characterized the ecto-5'-nucleotidase activity in murine endometrium and showed that the enzyme reaches the maximum activity at the estrus phase of the cycle, when females are sexually receptive. Thus, it can be inferred that the increase in extracellular adenosine generated thereby contributes to sperm capacitation (Aliagas et al. 2010).

In accessory glands, ecto-5'-nucleotidase was expressed in muscle cells, where NTPDase1 and 2 were also identified. Prostate and seminal vesicles also expressed ecto-5'-nucleotidase at the luminal side of secretory epithelial cells, coinciding with the already reported NTPDase3 localization (Martín-Satué et al. 2009), again suggesting that both enzymes play a role in the regulation of glandular exocrine secretion and also contribute to semen composition.

In summary, we have demonstrated by means of different techniques that ecto-5'-nucleotidase protein is highly expressed and active along the mouse male reproductive tract. Our results suggest that ecto-5'-nucleotidase is the main enzyme responsible for the generation of adenosine from AMP in this system. The presence of ecto-5'-nucleotidase in testis suggests a role of the enzyme in spermatogenesis and steroidogenesis. Ecto-5'-nucleotidase was found in combination with NTPDase1 and 2 in tissues involved in functions requiring contraction, such as the excurrent ducts. It also co-localized with NTPDase3 in secretory epithelia of accessory glands and epididymis, pointing to the relevance of these enzymes in the control of sperm fluid composition. By regulating ATP and adenosine levels, this ecto-enzyme, in combination with NTPDases, would influence male fertility.

Acknowledgements This work was supported by grants to J. Sévigny from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and to M. Martín-Satué from the University of Barcelona (*ACESB09*). M. Martín-Satué was recipient of a fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science (*MEC-Programa José Castillejo*), E.G. Lavoie of a scholarship from the *Fonds de Recherche en Santé du Québec* (FRSQ) and J. Sévigny of a New Investigator award from the CIHR and of a Junior 2 scholarship from the FRSQ. Authors thank Benjamín Torrejón-Escribano from the Microscopy Unit of *Serveis Científicotècnics* of the University of Barcelona (Bellvitge Campus) for his technical assistance. MF was a recipient of a scholarship from the government of Gabon.

References

- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR (2002) Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP. *Mol Reprod Dev* 63(2):245–255
- 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)* Feb 5. doi: [10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x) (Epub ahead of print)
- Antonio LS, Costa RR, Gomes MD, Varanda WA (2009) Mouse Leydig cells express multiple P2X receptor subunits. *Purinergic Signal* 3:277–287
- Banks FC, Calvert RC, Burnstock G (2009) Changing P2X receptor localization on maturing sperm in the epididymides of mice, hamsters, rats, and humans: a preliminary study. *Fertil and Steril*. doi: [10.1016/j.fertnstert.2009.02.061](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.061)
- Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM (1988) A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem* 171:266–270
- Belleannee C, Da Silva N, Shum W, Breton S (2009) Role of luminal ATP and adenosine in V-ATPase activation. *Biol Reprod* 81:21
- Benarroch EE (2008) Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 70:231–236
- Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B (2005) Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost* 31:139–149
- 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* 17:1355–1364
- Burnstock G (2006) Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* 147(Suppl 1):S172–S181
- Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659–797
- Carlin RW, Lee JH, Marcus DC, Schultz BD (2003) Adenosine stimulates anion secretion across cultured and native adult human vas deferens epithelia. *Biol Reprod* 68:1027–1034
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF (2006) Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* 2(2):351–360
- Diniz C, Leal S, Goncalves J (2003) Regional differences in the adenosine A(2) receptor-mediated modulation of contractions in rat vas deferens. *Eur J Pharmacol* 460:191–199
- Fausther M, Lecka J, Kukulski F, Lévesque SA, Pelletier J, Zimmermann H, Dranoff JA, Sévigny J (2007) Cloning, purification, and identification of the liver canalicular ecto-ATPase as NTPDase8. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G785–G795
- Foresta C, Rossato M, Di Virgilio F (1992) Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Biol Chem* 267(27):19443–19447
- Foresta C, Rossato M, Nogara A, Gottardello F, Bordon P, Di Virgilio F (1996) Role of P2-purinergic receptors in rat Leydig cell steroidogenesis. *Biochem J* 320:499–504
- Fraser LR (2008) The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology* 70:1356–1359
- Fredholm BB, Jzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology XXV nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527–552
- 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(4):377–387
- Kauffmanstein G, Drouin A, Thorin-Trescases N, Bachelard H, Robaye B, D'Orléans-Juste P, Marceau F, Thorin E, Sévigny J (2010) NTPDase1 (CD39) controls nucleotide-dependent vasoconstriction in mouse. *Cardiovasc Res* 1;85(1):204–213
- Koszalka P, Ozüyan B, Huo Y, Zernecke A, Flögel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sévigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Gödecke A, Schrader J (2004) Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 95(8):814–821
- Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J (2005) Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1:193–204
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lazarowski ER, Tarran R, Grubb BR, van Heusden CA, Okada S, Boucher RC (2004) Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis. *J Biol Chem* 279(35):36855–36864
- Levitt B, Head RJ, Westfall DP (1984) High-pressure liquid chromatographic-fluorometric detection of adenosine and adenine nucleotides: application to endogenous content and electrically induced release of adenylyl purines in guinea pig vas deferens. *Anal Biochem* 137(1):93–100
- Loir M (2001) Adenosine receptor-adenylyl cyclase system in the trout testis: involvement in the regulation of germ cell proliferation. *Mol Reprod Dev* 58(3):307–317
- Martín-Satué M, Lavoie EG, 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
- Minelli A, Allegrucci C, Piomboni P, Mannucci R, Lluís C, Franco R (2000) Immunolocalization of A1 adenosine receptors in mammalian spermatozoa. *J Histochem Cytochem* 48:1163–1171
- 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* 25:286–292
- Minelli A, Bellezza I, Collodel G, Fredholm BB (2008) Promiscuous coupling and involvement of protein kinase C and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the adenosine A1 receptor signalling in mammalian spermatozoa. *Biochem Pharmacol* 75:931–941
- Monks NJ, Fraser LR (1988) Enzymes of adenosine metabolism in mouse sperm suspensions. *J Reprod Fertil* 83:389–399
- Queiroz G, Talaia C, Goncalves J (2003a) ATP modulates noradrenaline release by activation of inhibitory P2Y receptors and facilitatory P2X receptors in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 307:809–815
- Queiroz G, Talaia C, Goncalves J (2003b) Adenosine A2A receptor-mediated facilitation of noradrenaline release involves protein kinase C activation and attenuation of presynaptic inhibitory

- receptor-mediated effects in the rat vas deferens. *J Neurochem* 85(3):740–748
- Resta R, Hooker SW, Hansen KR, Laurent AB, Park JL, Blackburn MR, Knudsen TB, Thompson LF (1993) Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* 133(2):171–177
- Rivkees SA (1994) Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology* 135:2307–2313
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–430
- Rodriguez-Miranda E, Buffone MG, Edwards SE, Ord TS, Lin K, Sammel MD, Gerton GL, Moss SB, Williams CJ (2008) Extracellular adenosine 5'-triphosphate alters motility and improves the fertilizing capability of mouse sperm. *Biol Reprod* 79:164–171
- Schuh SM, Hille B, Babcock DF (2007) Adenosine and catecholamine agonists speed the flagellar beat of mammalian sperm by a non-receptor-mediated mechanism. *Biol Reprod* 77:960–969
- Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783:673–694
- Zhou WL, Zuo WL, Ruan YC, Wang Z, Du JY, Xiong Y, Chan HC (2007) The role of extracellular ATP in the male reproductive tract. *Sheng Li Xue Bao* 59:487–494
- Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52:44–56

ANNEX 2

Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization

Lavoie E.G, Gulbransen B.D, Martín-Satué M,
Aliagas E, Sharkey K.A, F, Sévigny J.

**American Journal of Physiology:
Gastrointestinal and Liver Physiology
2011;300(4):G608-20.**

Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization

Elise G. Lavoie,^{1*} Brian D. Gulbransen,^{2*} Mireia Martín-Satué,³ Elisabet Aliagas,³ Keith A. Sharkey,² and Jean Sévigny¹

¹Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, and Département de Microbiologie-Infectiologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Quebec; ²Hotchkiss Brain Institute and Snyder Institute of Infection, Immunity, and Inflammation, Department of Physiology and Pharmacology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada; and ³Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Barcelona, Spain

Submitted 3 May 2010; accepted in final form 12 January 2011

Lavoie EG, Gulbransen BD, Martín-Satué M, Aliagas E, Sharkey KA, Sévigny J. Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G608–G620, 2011. First published January 13, 2011; doi:10.1152/ajpgi.00207.2010.—Extracellular nucleotides and adenosine are biologically active molecules that bind members of the P2 and P1 receptor families, respectively. In the digestive system, these receptors modulate various functions, including salivary, gastric, and intestinal epithelial secretion and enteric neurotransmission. The availability of P1 and P2 ligands is modulated by ectonucleotidases, enzymes that hydrolyze extracellular nucleotides into nucleosides. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and ecto-5'-nucleotidase are the dominant ectonucleotidases at physiological pH. While there is some information about the localization of ecto-5'-nucleotidase and NTPDase1 and -2, the distribution of NTPDase3 in the digestive system is unknown. We examined the localization of these ectonucleotidases, with a focus on NTPDase3, in the gastrointestinal tract and salivary glands. NTPDase1, -2, and -3 are responsible for ecto-ATPase activity in these tissues. Semiquantitative RT-PCR, immunohistochemistry, and in situ enzyme activity revealed the presence of NTPDase3 in some epithelial cells in serous acini of salivary glands and mucous acini and duct cells of sublingual salivary glands, in cells from the stratified esophageal and forestomach epithelia, and in some enteroendocrine cells of the gastric antrum. Interestingly, NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase are coexpressed with NTPDase3 in salivary gland cells and stratified epithelia. In the colon, neurons express NTPDase3 and glial cells express NTPDase2. Ca²⁺ imaging experiments demonstrate that NTPDases regulate P2 receptor ligand availability in the enteric nervous system. In summary, the specific localization of NTPDase3 in the digestive system suggests functional roles of the enzyme, in association with NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase, in epithelial functions such as secretion and in enteric neurotransmission.

nucleoside triphosphate diphosphohydrolases; ecto-5'-nucleotidase/CD73; P2 receptors; enteric nervous system

EXTRACELLULAR NUCLEOTIDES and nucleosides are involved in a number of biological functions, such as neurotransmission, platelet aggregation, muscular contraction, and epithelial secretion (9). These functions are mediated by extracellular nucleotides that are activating members of the P2 receptor family (ionotropic P2X receptors and metabotropic P2Y receptors) and extracellular adenosine acting on P1 receptors (8). Membrane-bound enzymes known as ectonucleotidases hydro-

lyze extracellular nucleotides into nucleosides, thereby controlling the concentration of P2 and P1 agonists (54). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase)-1, -2, -3, and -8 are the major ectonucleotidases implicated in the hydrolysis of tri- and diphosphonucleosides at physiological pH (41). These plasma membrane-located NTPDases differ slightly in their catalytic properties. For instance, NTPDase1 hydrolyzes ATP as well as ADP, NTPDase2 acts mostly as an ATPase, and NTPDase3 and -8 display intermediate hydrolysis profiles (29). AMP, the final product of NTPDase action, is further hydrolyzed to adenosine by ecto-5'-nucleotidase.

In the digestive system, extracellular nucleotides and nucleosides regulate several functions, including salivary secretion (18, 25, 38), intestinal epithelial secretion (13, 40, 53), gastrointestinal motility (5), and enteric neurotransmission (7, 22). By controlling P2 and P1 receptor agonist levels, ectonucleotidases such as NTPDases and ecto-5'-nucleotidase act as regulators of these functions. Indeed, there is evidence that several cell types express functional ectonucleotidases in the digestive system. Macrophages of the intestinal submucosa (39), pancreatic acinar cells, and mucous acini and myoepithelial cells of the submandibular salivary glands (SMG) express NTPDase1 (26). Myoepithelial cells (26) and enteric glia (6) express NTPDase2, while blood vessels express NTPDase1 and -2 (44) and ecto-5'-nucleotidase (28). Functionally, vascular expression of NTPDase1 and ecto-5'-nucleotidase protects against intestinal ischemia-reperfusion injuries (20, 23). Chadwick and Frischauf (10) reported the presence of NTPDase3 mRNA in the digestive tract and pancreas, but the cellular expression of NTPDase3 in the digestive system remains to be determined. Since some NTPDase-like activity, for example, in the serous acini of salivary glands (14) and the gastric epithelium (42), cannot be accounted for by the localization of NTPDase1 and -2, we hypothesize that NTPDase3 is responsible for this activity. The aim of the present work was to localize NTPDase3 in the digestive system. The localization of NTPDase1 and -2 and ecto-5'-nucleotidase was also examined in the tissues expressing NTPDase3 to obtain a more complete and detailed localization for the major ectonucleotidases in the gastrointestinal tract.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care, and protocols were approved by the Animal Care Committees of Université Laval and the University of Calgary and the Institutional Animal Ethics Committee

* E. G. Lavoie and B. D. Gulbransen contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: J. Sévigny, Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CHUQ), 2705 Blvd. Laurier, Rm. T1-49, Québec, QC, Canada G1V 4G2 (e-mail: Jean.Sevigny@crchul.ulaval.ca).

of the University of Barcelona. Adult C57BL/6 mice (Charles River, Pointe-Claire, QC, Canada) were used for all histological studies. Male albino guinea pigs (225–300 g; Charles River) were used for Ca²⁺ imaging and immunohistochemistry.

Materials

Levamisole, nucleotides, (NH₄)₂S, and paraformaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada); aqueous hematoxylin from Accurate Chemical and Scientific (Westbury, NY); dextran (200,000–300,000 mol wt) from MP Biomedicals (Solon, OH); and Mowiol 4-88 from Calbiochem (VWR CANLAB, Mississauga, ON, Canada). Sodium metatungstate (POM1) was purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO).

Semiquantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from various digestive tract tissues in the mouse [parotid, SMG, sublingual salivary glands (SLG), esophagus, stomach, small intestine (duodenum, jejunum, and ileum), and colon] using TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Total RNA was quantified using the Qubit quantification platform (Invitrogen). For removal of any contaminating genomic DNA, a DNaseI (New England Biolabs, Pickering, ON, Canada) digestion step was performed before the RT reaction on 1 µg of total RNA with the Superscript III (Invitrogen) using oligo(dT)₂₀ as primer, according to the manufacturer's instructions. One microliter of the 20-µl RT reactions was used for the amplification reaction using a *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs). Primer sequences used for semiquantitative RT-PCR experiments are indicated in Table 1.

Antibodies

Unless indicated otherwise, all the primary antibodies used in this study have been previously characterized and validated: rabbit C9F (15, 24) and guinea pig mN1-2_c (36) to mouse NTPDase1; rabbit mN2-36_L (2) to mouse NTPDase2; guinea pig mN3-3_c (36) to mouse NTPDase3; rabbit rN3-3_L (48) to rat NTPDase3, which cross-reacts with guinea pig NTPDase3 (see data presented in this study); and rabbit rNU-9_L (28) to rat ecto-5'-nucleotidase, which cross-reacts with mouse ecto-5'-nucleotidase; as well as commercially available rabbit anti-aquaporin-5, mouse anti-S100 (Millipore, Temecula, CA), rabbit anti-protein gene product 9.5 (PGP9.5; Neuromics, Edina, MN), and rabbit anti-gastrin (catalog no. ab53085, Abcam, Cambridge, UK). Secondary antibodies were biotinylated goat anti-guinea pig and goat anti-rabbit, Cy3 donkey anti-guinea pig, and Cy5 donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit and goat anti-mouse and Alexa Fluor 594 goat anti-guinea pig (Invitrogen).

Immunohistochemistry, Immunofluorescence, and Enzyme Histochemistry

Tissue processing. For immunohistochemistry and enzyme histochemistry, freshly dissected esophagus, stomach, and colon were embedded in optimal cutting temperature (OCT) freezing medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA), snap-frozen in isopentane in dry ice, and stored at -80°C. Sections (6 µm) were prepared

and routinely fixed in 10% phosphate-buffered formalin mixed with cold acetone (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) before further processing. For staining of salivary glands and stomach, mice were perfused with 4% paraformaldehyde following standard protocol, then tissue samples were excised, immersed in sucrose, and included in OCT freezing medium, sectioned, and processed for staining. Sections were counterstained with aqueous hematoxylin, mounted in Mowiol mounting medium, and photographed under a microscope (model BX51, Olympus) or with the spinning-disk confocal system (WaveFX, Quorum Technologie). Immunofluorescence of whole mounts was imaged on a confocal microscope (FluoView FV1000, Olympus America, Melville, NY) using a ×60 (PlanApo N, 1.42 numerical aperture) oil-immersion lens. Optical sections (1 µm) were acquired through each field of view.

Enzyme histochemistry. Ectonucleotidase activities in digestive tissue sections were localized using the Wachstein-Meisel lead phosphate precipitation method, as described elsewhere (36). Briefly, fixed tissue sections were preincubated for 30 min at 25°C in Tris-maleate buffer (2 mM CaCl₂, 250 mM sucrose, 50 mM Tris-maleate, pH 7.4) supplemented with 2.5 mM levamisole as an alkaline phosphatase inhibitor. Enzymatic reaction for the hydrolysis of 200 µM or 1 mM nucleotides was performed for 1 or 2 h at 37°C in the same buffer supplemented with 5 mM MnCl₂, 2 mM Pb(NO₃)₂, and 3% dextran T250 (wt/vol). For control experiments, substrate was omitted. Reaction products were revealed by incubation of tissue sections with 1% (NH₄)₂S (vol/vol) for 1 min.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry (peroxidase-based activity) experiments were performed as previously described (36). Briefly, tissue sections were incubated at 4°C for 18 h with the indicated primary antibodies and then at 25°C for 1 h with the appropriate biotinylated secondary antibodies. Preimmune sera were routinely included as controls for the antibodies produced by us.

Double-staining immunofluorescence. Double-staining experiments were performed as previously described (36). Briefly, tissue sections were processed for staining of the first antigen as follows: the first primary antibody was incubated at 4°C for 18 h, then the secondary antibody was added for 1 h at 25°C. Staining of the second antigen was performed under similar conditions, except the second primary antibody was incubated at 25°C for 1.5 h.

Whole-Mount Preparation and Immunohistochemical Labeling

Mice were killed by cervical dislocation [whereas guinea pigs were anesthetized with halothane (5% in O₂; Benson Medical Industries, Minneapolis, MN)], and the distal colon was removed and placed in a Sylgard-coated petri dish containing PBS with 3 µM nifedipine. The colon was opened along the mesenteric border, pinned flat (mucosa-side-up), and treated with Zamboni's fixative overnight at 4°C. After extensive rinsing with PBS, the mucosa, submucosa, and circular muscle were removed by microdissection, leaving only the myenteric plexus with adherent longitudinal muscle. These longitudinal muscle-myenteric plexus (LMMP) whole-mount preparations were processed for immunofluorescence as described by Gulbransen and Sharkey (22).

Table 1. Primers used for semiquantitative RT-PCR

Gene	Product, bp	Primer (5'–3')	
		Forward	Reverse
<i>entpd1</i>	190	ACAGCAAGCAGACAGCAA	TCAGTCCCACAGCAATCAA
<i>entpd2</i>	132	TTCTGGGATGTCAGGTCTC	GTCTCTGGTGCTTGCCTTTC
<i>entpd3</i>	183	ACCTGTCCCGTGCTTAAATG	AGACAGAGTGAAGCCCTGA
<i>nt5e</i>	128	CAGGAAATCCACCTTCCAAA	AACCTTCAGGTAGCCAGGT
<i>actβ</i>	228	AGCCATGTACGTAGCACTCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

Ca²⁺ Imaging

Ca²⁺ imaging was carried out as described by Gulbransen et al. (21). Briefly, colons were excised from male albino guinea pigs, and LMMP whole-mount preparations were dissected in ice-cold oxygenated physiological saline solution consisting of (in mM) 135 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 glucose, 10 HEPES, 5 sodium bicarbonate, and 1 sodium pyruvate. LMMPs were enzymatically treated [mixture of collagenase type II (Invitrogen) and dispase II (Roche, Laval, QC, Canada)] for 15 min at room temperature, rinsed, and loaded with 4 μM fluo 4-AM (Invitrogen) in a dark, oxygenated environment at 37°C for 45 min. Then LMMPs were rinsed and left at room temperature for 20 min to allow for fluo 4-AM deesterification before imaging.

Images were acquired at 2 Hz through the ×20 water-immersion objective (UMPlanFl, 0.5 numerical aperture) of an upright motorized fixed-stage microscope (model BX61WI, Olympus) using Imaging Workbench 6 software (INDEC BioSystems, Santa Clara, CA) and a charge-coupled device digital camera (ORCA-ER, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). LMMPs were maintained at ~34°C, and stimuli were applied using a gravity-flow perfusion system (Automate Scientific, Berkeley, CA) at a rate of ~2–3 ml/min.

The change in fluorescence over time was calculated as described by Gulbransen et al. (21), and traces [generated using Prism 4 (Graphpad Software)] represent means ± SE of all glial regions of interest within a myenteric ganglion. Statistical differences were determined by ANOVA; *P* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

We first evaluated NTPDase distribution in the digestive system using semiquantitative RT-PCR on mouse digestive tissues to assess the expression of NTPDase1, -2, and -3 and ecto-5'-nucleotidase. All mouse tissues tested were found to express mRNA for these enzymes with variable levels of expression (Fig. 1). Higher levels of NTPDase3 mRNA were detected in the salivary glands, esophagus, and colon than in the stomach and small intestine, whereas ecto-5'-nucleotidase expression was higher in the gastrointestinal tract than in salivary glands.

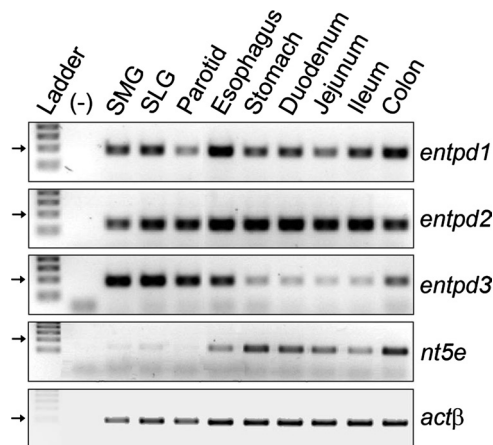


Fig. 1. Distribution of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase)-1, -2, and -3 and ecto-5'-nucleotidase mRNA by semiquantitative RT-PCR in the gastrointestinal tract and salivary glands. PCR products of NTPDase1 (*entpd1*), -2 (*entpd2*), and -3 (*entpd3*) and ecto-5'-nucleotidase (*nt5e*), obtained after amplification of total RNA with specific primers (see Table 1), were electrophoresed on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV light. β -Actin (*ACTβ*) is shown as control. Arrows indicate 200-bp band of the ladder.

Next, we used immunolabeling to analyze NTPDase3 protein expression in salivary glands and the digestive tract. NTPDase1 and -2 and ecto-5'-nucleotidase expression were also analyzed on NTPDase3-expressing structures and cells. NTPDase8 expression was not analyzed because of the unavailability of specific antibodies against the mouse isoform.

Salivary Glands

ATPase activity, as determined by enzyme histochemistry, was localized at the periphery of the acini, coinciding with the localization of connective tissue. Serosus acinar cells of parotid glands and SMG, as well as mucous acinar cells of SLG, also displayed ATPase activity (Fig. 2, ATP). The combined immunohistochemical localization of NTPDase1, -2, and -3 largely correlated with ATPase activity. NTPDase3 protein was found to localize in serous acini of the parotid and SMG, as well as in mucous acini of the SLG (Fig. 2, NTPDase3). Interestingly, NTPDase3-expressing acinar cells in all salivary glands were immunoreactive for NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase. NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase were also coexpressed in sublingual duct epithelial cells (Fig. 2, NTPDase3 and ecto-5'-NT). Nevertheless, ATPase activity in these cells was barely detectable. NTPDase2 immunoreactivity was also located in the myoepithelial cells surrounding the acini and at the blood vessel periphery, as reported by Kittel et al. (26). NTPDase1 localization corresponded to the ATPase activity unaccounted for by the expression of NTPDase2 and -3, whereas ecto-5'-nucleotidase localization corresponded to the AMPase activity (data not shown).

To confirm the NTPDase3 localization observed by immunohistochemistry and verify the plasma membrane subcellular localization of this enzyme in salivary gland acini, double-immunofluorescence staining was performed with an antibody to aquaporin-5, a plasma membrane marker of serous acinar cells of the parotid gland and SMG, as well as mucous acinar cells of the SLG (27). As shown in Fig. 3, the basolateral and apical regions of the plasma membrane expressing aquaporin-5 were immunoreactive for NTPDase3.

Esophageal and Gastric Epithelia

Immunoreactivity for NTPDase3 was located in the mucosal squamous stratified epithelium of the esophagus and forestomach (Fig. 4, NTPDase3). While all cell layers of the esophagus express NTPDase3, NTPDase3 localization in the forestomach was limited to the basal cell layer. NTPDase2 was expressed along with NTPDase3 in esophageal and forestomach epithelia, in keeping with the ATPase activity data (Fig. 4, ATP). Interestingly, ecto-5'-nucleotidase was also expressed in these epithelia, but with some distinctions. In the esophagus, ecto-5'-nucleotidase was seen in the epithelial cells expressing NTPDase3 and -2, with slightly more staining in differentiated cells than in basal cells (Fig. 4A, ecto-5'-NT). In the forestomach, there was a clear distinction between the expression of ecto-5'-nucleotidase and the expression of either of the two NTPDases, as the ecto-5'-nucleotidase was clearly located in the upper differentiated epithelial cells (Fig. 4B, ecto-5'-NT). AMPase activity correlated with the immunolocalization of ecto-5'-nucleotidase (Fig. 4, AMP). In addition, immunoreactivity for NTPDase2 and -3 and ecto-5'-nucleotidase was also detected in the apical epithelial layer in contact with the lumen

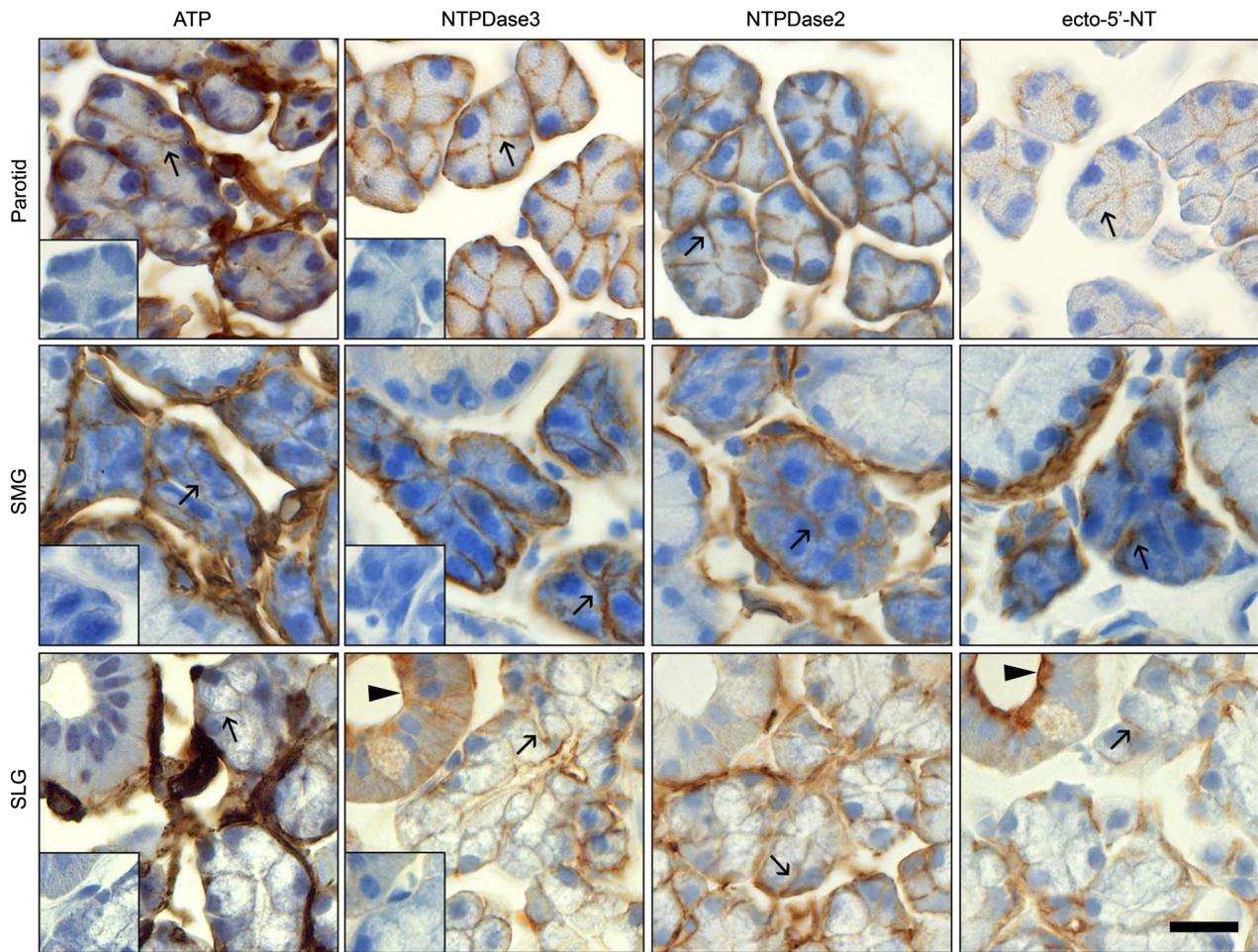


Fig. 2. NTPDase3 is expressed with NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT) in mouse salivary glands. Enzyme histochemistry and immunohistochemical assays performed on serial tissue sections of parotid and submandibular and sublingual salivary glands (SMG and SLG) show ATPase activity and ectonucleotidase immunoreactivity. ATPase activity [ATP (200 μ M)] is detected in serous acinar cells of parotid glands and SMG, as well as in mucous acini of SLG; connective tissues also display ATPase activity. Serous acini of parotid, SMG, and mucous acini of SLG display NTPDase3 immunoreactivity. NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase are expressed with NTPDase3 on acini. NTPDase3 and ecto-5'-NT are detected in duct cells of the SLG, where no ATPase activity is detected. Arrows indicate positively labeled plasma membranes of acini; arrowheads indicate positive duct cells. Nuclei were counterstained with aqueous hematoxylin. *Insets* correspond to control without substrate and preimmune serum staining, respectively. Scale bar, 20 μ m.

of the esophagus (Fig. 4A); however, neither ATPase nor AMPase activity could be detected in that structure (Fig. 4A, ATP and AMP).

NTPDase3 immunoreactivity was also present in the glandular portion of the mouse gastric epithelia (Fig. 5A). This staining was limited to a specific cell type in the antral region of the stomach that was similar in abundance and distribution to enteroendocrine cells. As gastrin-secreting G cells are the major enteroendocrine cell type in that region of the stomach, a double-immunofluorescence assay for NTPDase3 and gastrin expression was performed. The data presented in Fig. 5B show that some gastrin-expressing cells were NTPDase3-positive. However, not all NTPDase3-expressing cells were positive for gastrin (data not shown), suggesting that other types of enteroendocrine cells express NTPDase3. Lack of somatostatin immunoreactivity would thereby appear to exclude D cells (data not shown). In the lamina propria, in addition to nerve terminals expressing NTPDase3, other cell types, such as blood vessels and immune cells, exhibit ATPase activity, which corresponds to the immunolocalization of NTPDase1 and -2

(data not shown). Some enteroendocrine gastric cells, as well as the luminal side of the gastric pits, expressed ecto-5'-nucleotidase, as determined by immunohistochemistry and AMPase activity (Fig. 5A).

Enteric Nervous System

The enteric nervous system innervates the digestive tract from the esophagus to the anal sphincter. Enzyme histochemistry and immunohistochemistry experiments performed on serial sections of the mouse gastrointestinal tract showed ATPase activity throughout the entire length of the enteric nervous system. Representative histochemical images of ATPase activity in mouse stomach and colon are shown in Fig. 6, A and B, respectively. In addition to the nervous structures, smooth muscle cells and blood vessels also exhibited ATPase activity. NTPDase3 and -2 were coexpressed within the myenteric and submucosal plexuses, as well as in the nerve terminals of the smooth muscle layer and mucosa (Fig. 6). AMPase activity and ecto-5'-nucleotidase immunore-

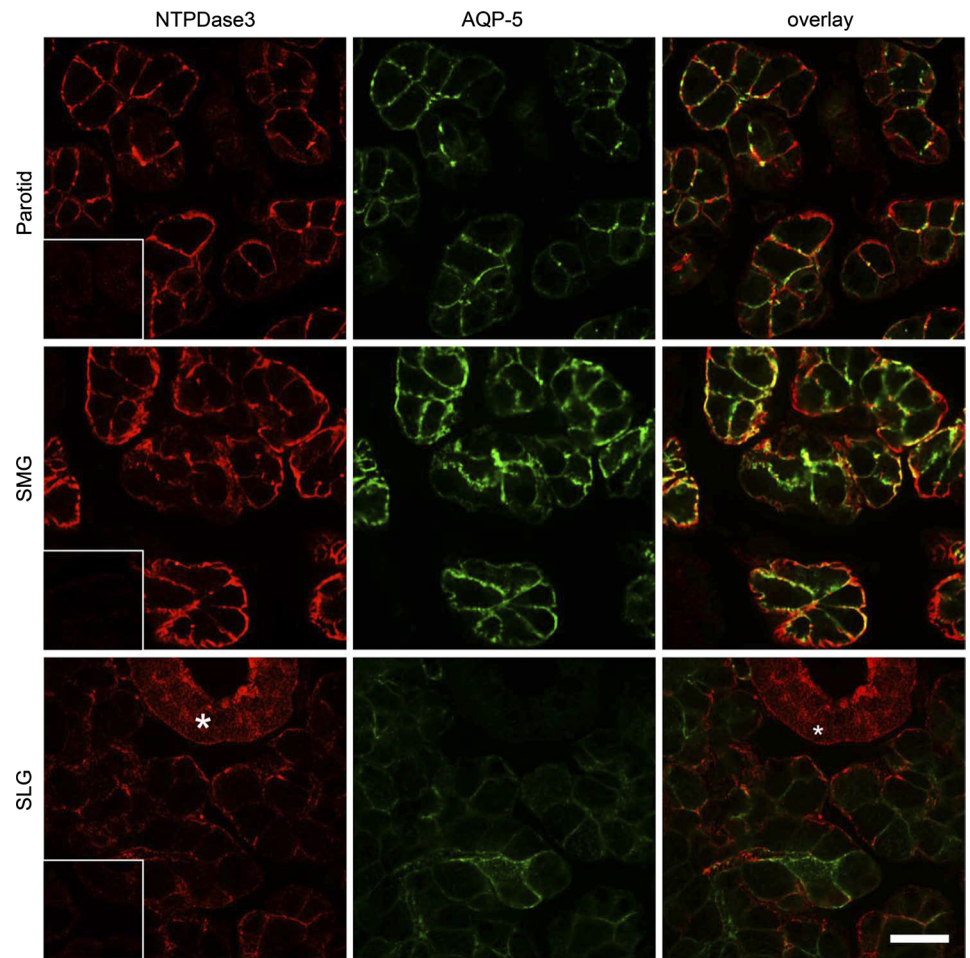


Fig. 3. Confocal analysis of NTPDase3 and aquaporin-5 (AQP-5) double staining in mouse salivary glands. Aquaporin-5 (green) is a plasma membrane marker of serous acinar cells of parotid glands and SMG as well as of mucous acini of SLG. NTPDase3 (red) is present, together with aquaporin-5 (overlay) in apical and basolateral membranes of these cells. NTPDase3 is also expressed in duct cells of the SLG (*). *Insets* correspond to preimmune serum. Scale bar, 20 μ m.

activity were not detected in enteric nervous structures (data not shown). ATPase activity unaccounted for by the detection of NTPDase2 and -3 coincided with the immunolocalization of NTPDase1 (data not shown). Immunohistochemistry on tissue sections demonstrated that NTPDase3 is expressed within the enteric nervous system. However, tissue sections did not allow identification of the cellular constituents of the enteric nervous system expressing NTPDase3. Therefore, we stained whole-mount preparations of mouse colonic myenteric plexus to determine the cellular localization of NTPDase3. Myenteric ganglia were highly immunoreactive for NTPDase3, which outlined the cellular constituents of the myenteric plexus, namely, the enteric neurons and glia (Fig. 7A). NTPDase3 immunoreactivity was primarily localized to the membranes of PGP9.5-immunoreactive enteric neurons, with punctate NTPDase3 staining throughout the cytoplasm in the vast majority (989 of 1,000) of enteric neurons (Fig. 7A). Given the close proximity of enteric neurons and glia, we could not completely rule out the possibility that enteric glia also express NTPDase3, but we found a lack of NTPDase3 staining in the cytoplasm of enteric glia. Intense NTPDase2 immunoreactivity was also present in the myenteric plexus. Dual labeling with NTPDase2 and -3 demonstrated that NTPDase3 is primarily expressed by enteric neurons, while enteric glia mainly express NTPDase2 (Fig. 7B).

Functional NTPDases Within the Enteric Nervous System

To determine whether NTPDases expressed within the myenteric plexus are functionally involved in controlling the availability of P2 receptor agonists, we inhibited NTPDase activity with POM1 (50 μ M) and used Ca^{2+} imaging to assay the activation of P2 receptors in enteric glial cells. We chose to perform Ca^{2+} imaging experiments in the guinea pig because of the ease of dissection, its well-characterized enteric physiology, and our previous experience with P2 receptor activation imaging in guinea pig enteric glial cells in the colon (21). Before proceeding with such experiments, we used specific markers for enteric glia (S100) and neurons to verify the immunohistochemical localization of NTPDase2 and -3 in the guinea pig myenteric plexus (PGP9.5; Fig. 8). In agreement with our findings in the mouse (cf. Fig. 7), we found that guinea pig myenteric glia express NTPDase2, whereas myenteric neurons express NTPDase3. Furthermore, additional experiments showed that the cellular localization of NTPDase2 and -3 in the guinea pig submucosal plexus is similar to the NTPDase2 and -3 localization in the myenteric plexus (data not shown).

Having confirmed that NTPDase2 and -3 are the primary ecto-ATPases expressed within the myenteric plexus, we tested the ability of ATP to activate P2 receptors in enteric glia under control conditions or upon the attenuation of NTPDase activity

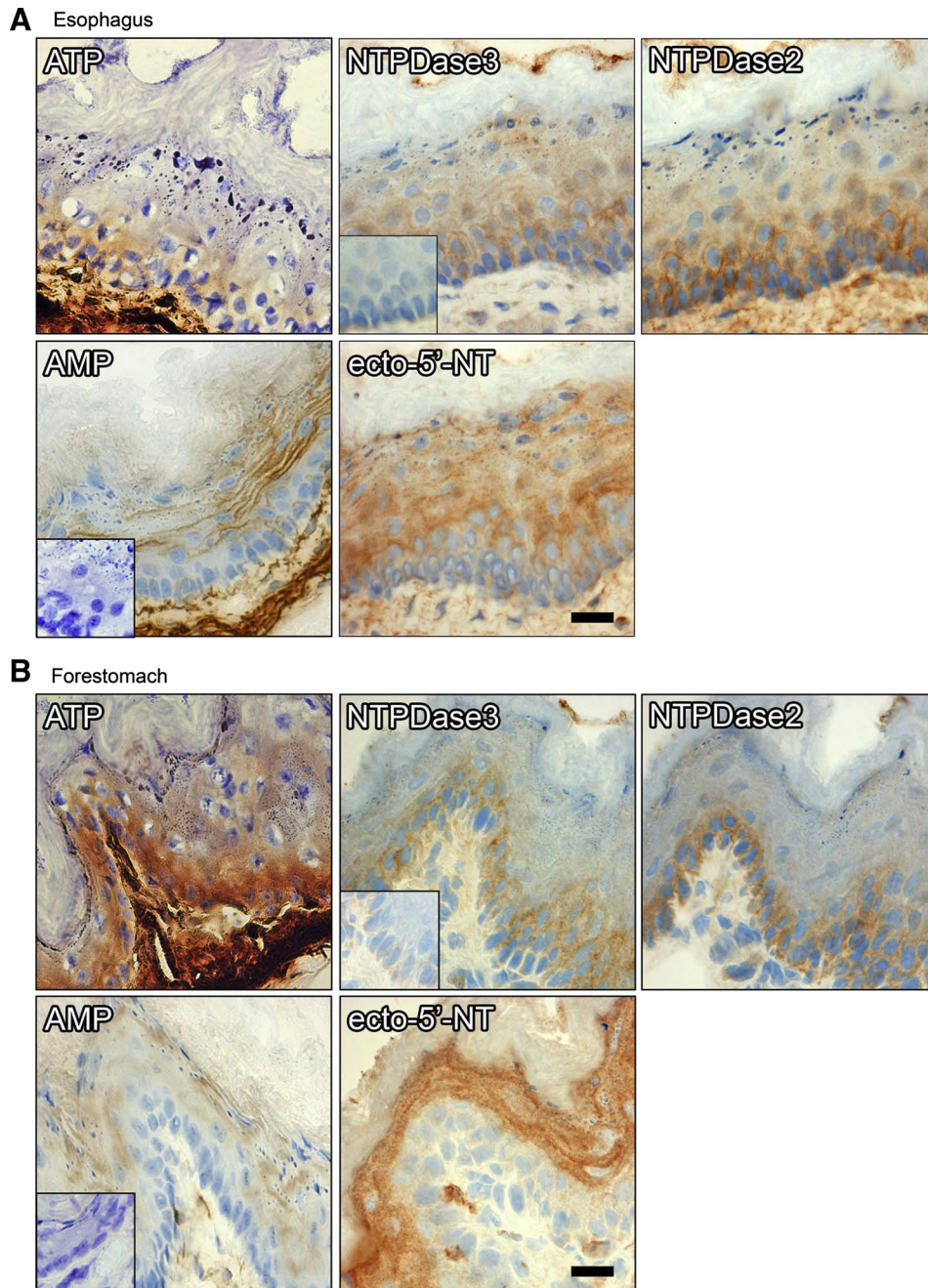


Fig. 4. NTPDase3 is coexpressed with NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase in esophagus (A) and forestomach (B). Sections of mouse esophagus and forestomach show NTPDase3 immunoreactivity in epithelial cells. In esophagus, NTPDase3 staining is detected in all cell layers; in forestomach, NTPDase3 immunoreactivity is exclusively detected in basal cell layer. Immunoreactivity for NTPDase2 and -3 is confined to cells within the same epithelial layer, and these cells display ATPase activity (ATP, 1 mM). Ecto-5'-nucleotidase expression is localized to a different cell layer in both tissues. AMPase activity (AMP, 200 μ M) correlates with ecto-5'-nucleotidase staining. In addition, NTPDase3 and -2 and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity are observed in the apical surface in contact with the lumen of the esophagus. Nuclei were counterstained with aqueous hematoxylin. *Insets* correspond to control without substrate and preimmune serum staining, respectively. Scale bar, 20 μ m.

using POM1 (50 μ M; Fig. 9) as an inhibitor. Under both conditions, a 30-s application of 100 μ M ATP elicited a robust increase in free cytosolic Ca^{2+} in enteric glial cells (Fig. 9A). Under control conditions, glial Ca^{2+} levels typically returned to baseline within 60 s. However, upon NTPDase inhibition, glial Ca^{2+} responses were significantly extended and persisted beyond 60 s (Fig. 9, A and B). To quantitate the lengthening of response, we analyzed the area under the curve (AUC) of sequential responses to 100 μ M ATP and found that the mean glial Ca^{2+} response to ATP was significantly larger in the presence of an NTPDase inhibitor [AUC(Δ F/F)s, where F is fluorescence and s is time in seconds]: for the first ATP response, AUC = 39 ± 5 for control and 108 ± 18 for POM1-treated cells ($P < 0.001$); for the second ATP response,

AUC = 30 ± 6 for control and 84 ± 13 for POM1-treated cells ($P < 0.01$); for the third ATP response, AUC = 21 ± 3 for control and 71 ± 10 for POM1-treated cells ($P < 0.01$); for the fourth ATP response, AUC = 25 ± 8 for control and 56 ± 11 for POM1-treated cells [$P > 0.05$ ($n = 6$ ganglia for each group)], as determined by ANOVA], suggesting that NTPDases limit the bioavailability of P2 ligands in the enteric nervous system (Fig. 9C).

DISCUSSION

In this work, we used immunolabeling and in situ enzymatic assays to present a detailed analysis of the expression and specific localization of NTPDase3 along the digestive system.

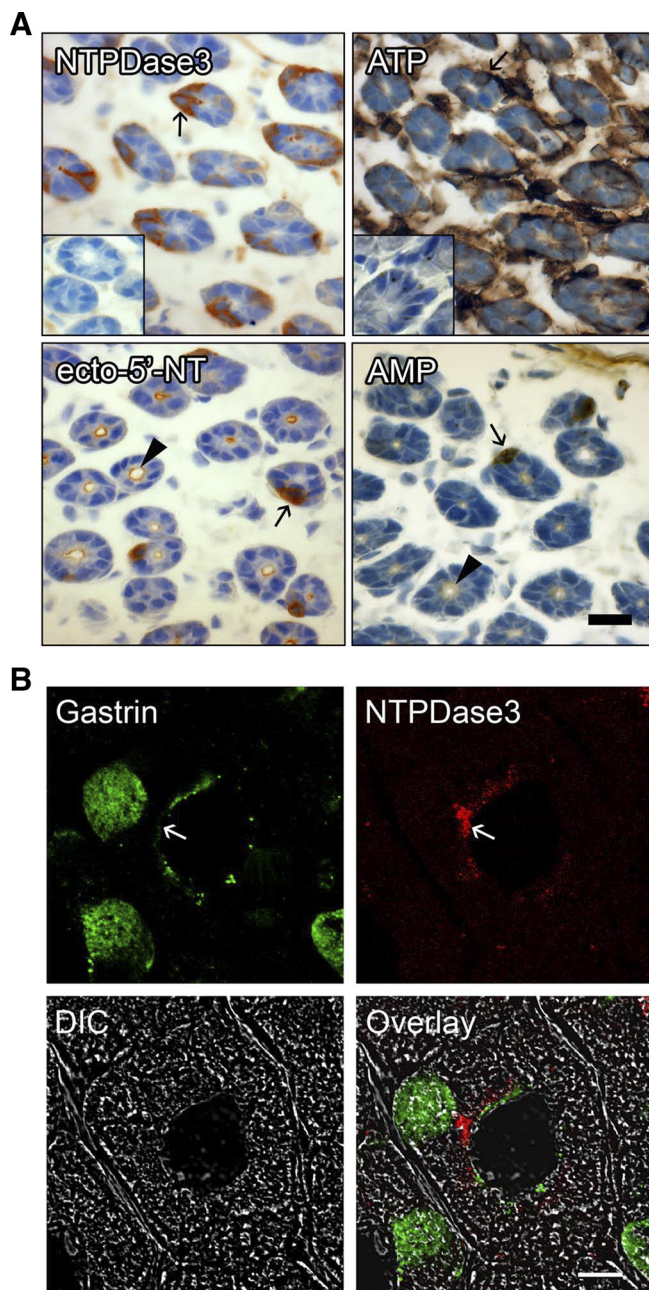


Fig. 5. Ectonucleotidase localization in enteroendocrine cells of mouse stomach. **A:** NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in enteroendocrine cells of mouse stomach. Serial sections of perfused mouse stomach demonstrate ATPase activity, as well as NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivities, in antral glandular mucosa. ATPase activity [ATP (200 μ M)] is localized to lamina propria, blood vessels, nerves, and epithelial cells. Arrows indicate enteroendocrine cells, which present a higher ATPase activity than other epithelial cells. NTPDase3 and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity reveal that few enteroendocrine cells in the antrum region express these enzymes (arrows). Ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity is observed in the apical membrane in the gastric pits (arrowheads). AMPase activity [AMP (200 μ M)] corroborated ecto-5'-nucleotidase localization. Nuclei were counterstained with aqueous hematoxylin. *Insets* correspond to controls without substrate and preimmune serum staining, respectively. Scale bar, 20 μ m. **B:** confocal images of a stomach gland showing a cell coexpressing gastrin (green) and NTPDase3 (red) at the apical pole (arrows). DIC, differential interference contrast image. Scale bar, 10 μ m.

We demonstrate that enteric neurons and certain epithelial cells indeed express NTPDase3. More specifically, NTPDase3 immunoreactivity was detected in the epithelia of salivary glands, i.e., in serous acini of the parotid glands and SMG and in mucous acini and ducts of the SLG. In addition, epithelial cells of the esophagus and forestomach and some enteroendocrine cells of the gastric antrum express NTPDase3. We also report the localization of NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase in NTPDase3-expressing structures. Our NTPDase1 staining confirms its localization as reported in blood vessels (44), in immune cells of the gastrointestinal lamina propria (39), and in SMG mucous acini and myoepithelial cells (26). As no NTPDase1 immunoreactivity was detected in NTPDase3-expressing cells, no NTPDase1 staining was shown in the present work. Nevertheless, it is noteworthy that the residual ATPase activity that cannot be attributed to NTPDase2 or -3 coincides with the immunolocalization of NTPDase1 (data not shown), suggesting that NTPDase1, -2, and -3 are together responsible for the major part of membrane-located ATPase activity detected in the tissues analyzed here. Interestingly, on the basis of previous observations (30; unpublished data), the ADPase, UTPase, and UDPase activities of NTPDase3 were consistently detected in the same cells in which ATPase activity was detected, in agreement with the known biochemical properties of NTPDase3 (29, 31). The ability to hydrolyze all these nucleotides (i.e., ATP, ADP, UTP, and UDP) is obviously an important action of NTPDase3, as there are various P2Y receptors that respond to these ligands, which play important functions in the digestive tract.

The NTPDase3-immunoreactive cells in the digestive system were of the same types as those previously reported in other systems. NTPDase3 was located in a subclass of neurons in the rat brain (3) and in epithelial cells of the human pulmonary (17) and murine reproductive systems (36). In the reproductive system, NTPDase3 expression is limited to epithelial cells of the seminal vesicle, epididymis (principal cells), oviduct, and secretory epithelia of the prostate and Cowper's gland (36). NTPDase3 is also expressed in the islets of Langerhans and appears to modulate endocrine pancreatic secretion (30). The coexpression of NTPDase3 with NTPDase2 in the epithelia lining the salivary gland, esophagus, and forestomach is a rather singular observation, since examples of cells expressing multiple NTPDases are rare. Two such cell types are Leydig cells (36) and myoepithelial cells of the SMG (26), where NTPDase1 and -2 expression was reported. Coexpression of NTPDases in the same cells raises the possibility of physical-functional interactions between different NTPDases at the cell surface. Indeed, since NTPDases form oligomers (16, 19, 49), NTPDase2 and -3 might conceivably heterodimerize in the epithelial cells mentioned above. Further studies are necessary to address this point.

Salivary Glands

ATPase, ADPase, and AMPase activities were first reported in rat parotid acinar cells by Dowd et al. (14), but the enzymes involved were not determined. The present immunohistochemical data show the expression of two NTPDases, namely, NTPDase3 and -2, as well as of the ecto-5'-nucleotidase, in mouse parotid acini, and these enzymes are likely responsible for the activity described in the rat by Dowd et al.

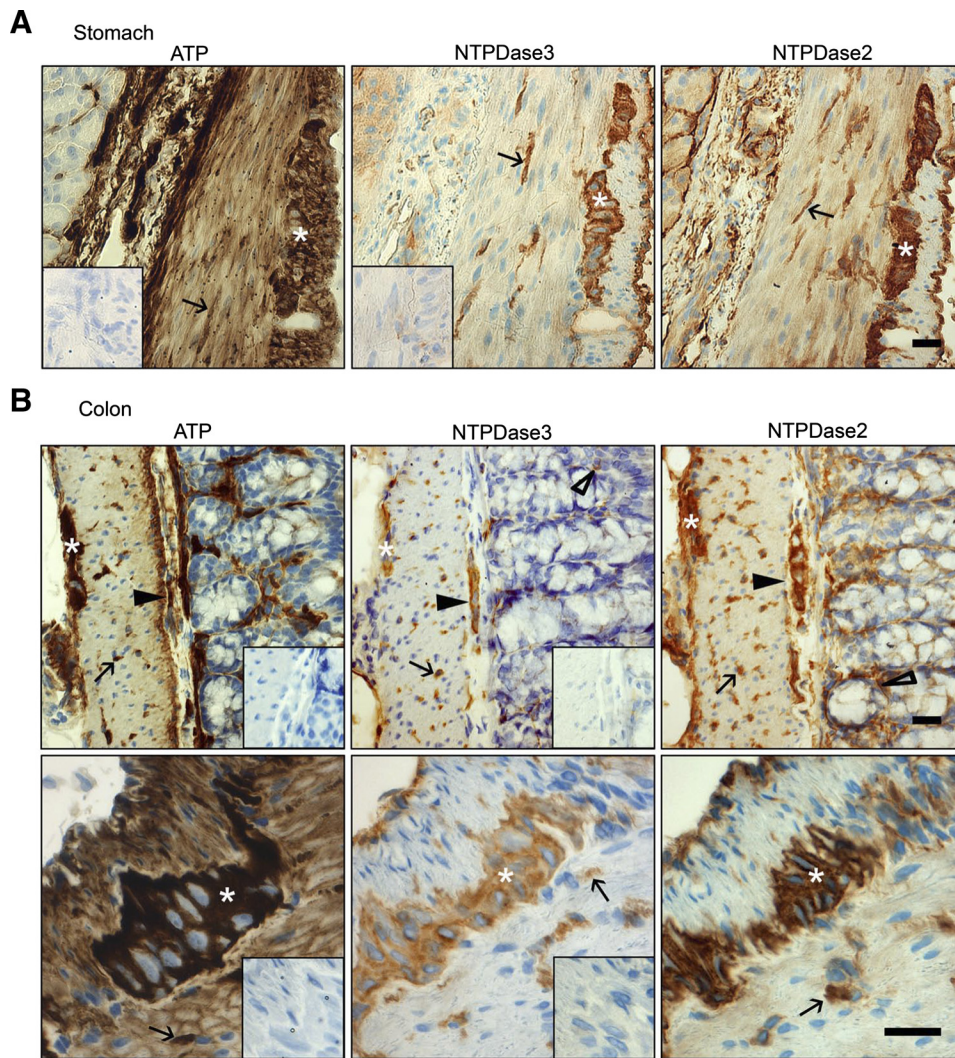


Fig. 6. Expression of NTPDase2 and -3 in mouse enteric nervous system. **A:** serial sections of mouse stomach ATPase activity and NTPDase immunoreactivity. ATPase activity was detected in smooth muscle layers and in myenteric plexus, as well as in blood vessels and connective tissue of mucosa and submucosa. NTPDase3 is coexpressed with NTPDase2 in myenteric plexus and nerve terminals in the smooth muscle layer. NTPDase2 is localized to connective tissue areas of the submucosa. *, Myenteric plexus; arrows, nerve terminals of a smooth muscle layer. Nuclei were counterstained with aqueous hematoxylin. *Insets* correspond to control without substrate and preimmune serum staining, respectively. Scale bar, 25 μ m. **B:** serial transverse sections of mouse colon. ATPase activity is localized in enteric nervous system and in muscle layers, as well as in blood vessels and connective tissues of the lamina propria. NTPDase3 immunoreactivity is detected in myenteric and submucosal plexus, as well as in nerve terminals of the muscle layers and mucosa. NTPDase2 is expressed in enteric nervous structures similar to those noted for NTPDase3. NTPDase2 is localized to connective tissue areas of the submucosa and the mucosa. *, Myenteric plexus; filled arrowheads, submucosal plexus; arrows, terminals in the smooth muscle layer; open arrowheads, nerve terminals in the mucosa. Nuclei were counterstained with aqueous hematoxylin. *Insets* correspond to controls without substrate and preimmune serum staining, respectively. Scale bar, 25 μ m.

A major role of NTPDases is the control of P2 receptor activation. Acinar or duct epithelial salivary gland cells express numerous P2 receptors, including P2X4 (46), P2X7 (33), P2Y₁ (1), and P2Y₂ (47). P2X7 receptors have been the most extensively characterized and play a role in saliva secretion by acinar cells (38). Lévesque et al. (34) demonstrated that NTPDase1 can modulate macrophage P2X7 function. Similarly, NTPDase3 and -2 may be involved in the modulation of P2X7 receptor activation on serous acinar cells. NTPDase1 expressed by pancreatic acini is released within the pancreatic juice (45). This may also occur in salivary glands as saliva, and pancreatic secretions are similar processes. The results of Ishibashi et al. (25) support this hypothesis by demonstrating that the amount of ATP collected from rat SMG ducts following pilocarpine stimulation is underestimated because of its hydrolysis.

In agreement with previous findings, aquaporin-5 was localized to the apical regions of parotid, submandibular, and sublingual acinar epithelia (27). In addition, we detected basolateral aquaporin-5 expression (cf. Fig. 3). C57BL/6 mice were used in the present study, while Konttinen et al. (27) performed localization on Balb/C mice. It is possible that strain variations account for the differential subcellular localization.

The physiological significance of aquaporin-5 coexpression with the ectonucleotidases NTPDase3 and -2 and ecto-5'-nucleotidase is unknown, but since P2 receptor activation regulates aquaporin expression, ectonucleotidases may indirectly participate in this regulation (32, 51). Acinar P2 receptors are presumably regulated by NTPDases, which may, in turn, modulate aquaporin-5 expression in salivary gland acinar cells.

NTPDase3 expression in SLG epithelial duct cells did not correlate with enzymatic activity, as no ATPase activity was detected in SLG duct cells under our experimental conditions. Another ATP diphosphohydrolase has been immunolocalized in pig parotid duct cells (43). Unfortunately, the identity of this protein could not be clearly established, as the antibody used in that study recognized the fourth apyrase-conserved region of porcine NTPDase1. Therefore, any of the seven other members of the E-NTPDase family could have contributed to the observed immunoreactivity. The relevance of duct NTPDase expression needs to be further explored.

Esophagus and Forestomach

The esophageal epithelium expresses NTPDase2 and -3 and ecto-5'-nucleotidase, an expression profile that could lead to an

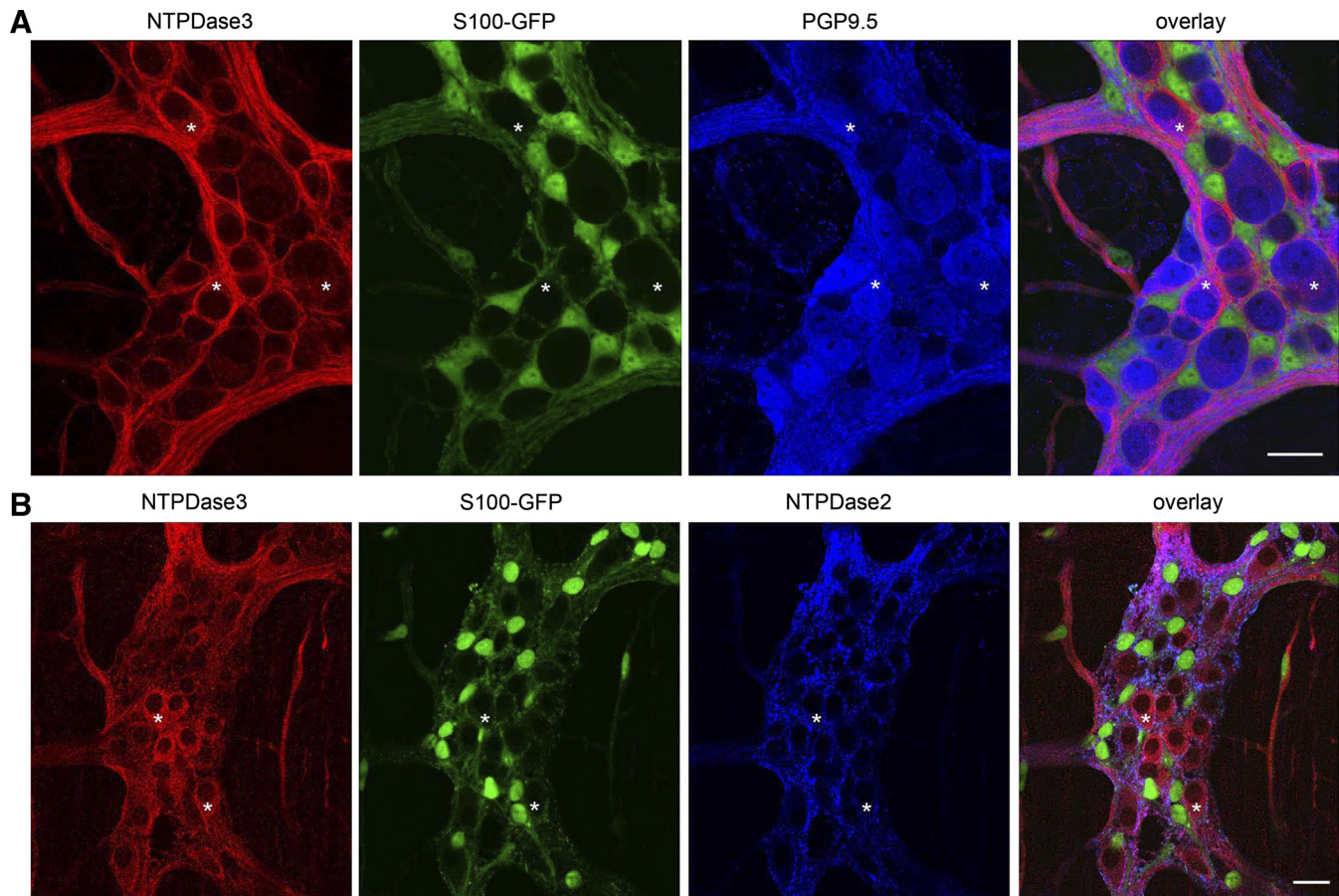


Fig. 7. NTPDase3 immunoreactivity in mouse myenteric neurons. Single optical sections of myenteric ganglia from the distal colon of a transgenic mouse, where green fluorescent protein (GFP) expression is driven by the S100 promoter (S100-GFP), making all glial cells green. **A:** intense NTPDase3 immunoreactivity (red) outlines S100-GFP-positive enteric glial cells (green) and protein gene product 9.5 (PGP9.5)-immunoreactive enteric neurons (blue). Punctate NTPDase3 immunoreactivity is also present in the cytoplasm of neurons (*). **B:** NTPDase3 immunoreactivity (red) is primarily localized to neurons, while NTPDase2 immunoreactivity (blue) is mainly glial (green). *, Punctate NTPDase3 immunoreactivity in neuronal cytoplasm. Scale bars, 20 μm .

in vivo accumulation of adenosine in this region. NTPDase3 and -2 expression are more pronounced in the cells in the vicinity of the basal portion of these stratified epithelia, while ecto-5'-nucleotidase is mainly localized in the luminal section of the epithelia. This segmented expression is more pronounced in the forestomach epithelium, where no NTPDase immunoreactivity was detected in the luminal portion, and no ecto-5'-nucleotidase was present in the basal region. Extracellular ATP regulates the ciliary beat frequency of human nasal epithelial cells (37) and frog esophagus epithelial cells (35, 50). As NTPDase2 and -3 and ecto-5'-nucleotidase regulate the availability of extracellular ATP (and adenosine), the expression of these enzymes in the mouse esophagus could regulate ciliary beat frequency.

Enteroendocrine Cells

NTPDase3 is expressed by dispersed enteroendocrine cells of the gastric glandular epithelium. These cells are located in the antral region of the stomach, near the pylorus. Our experiments suggest that a subpopulation of G cells express NTPDase3. However, at least one additional enteroendocrine cell type appears to express NTPDase3, as not all NTPDase3-positive cells were positive for gastrin. Fur-

ther analysis is necessary to determine the other cell types expressing NTPDase3. In addition, ATP is further hydrolyzed to adenosine by the ecto-5'-nucleotidase expressed by the same, or adjacent, cells, as shown in Fig. 5A. A functional consequence of adenosine formation at the surface of these cells might be the modulation of gastrin secretion by the activation of A₁ receptors (55).

Enteric Nervous System

NTPDase3 is expressed by mouse and guinea pig enteric neurons of myenteric and submucosal plexuses, in the muscular layer and mucosal nerve terminals (Figs. 6–8). Since NTPDase3 was detected throughout the plexus, it is possible that NTPDase3 is expressed by all enteric neuron subtypes. Indeed, our data suggest that most, if not all, PGP9.5-immunoreactive myenteric neurons express NTPDase3. The expression of NTPDase2 in mouse and guinea pig enteric glial cells (Figs. 7B and 8C) is in agreement with observations reported by Braun et al. (6) in the rat colon. Purinergic signaling is an important aspect of enteric neurotransmission in sensory and motor neurons, as well as interneurons (4, 5, 11), and its importance is emphasized here by the observation that two members of the NTPDase enzyme family (NTPDase3 in neu-

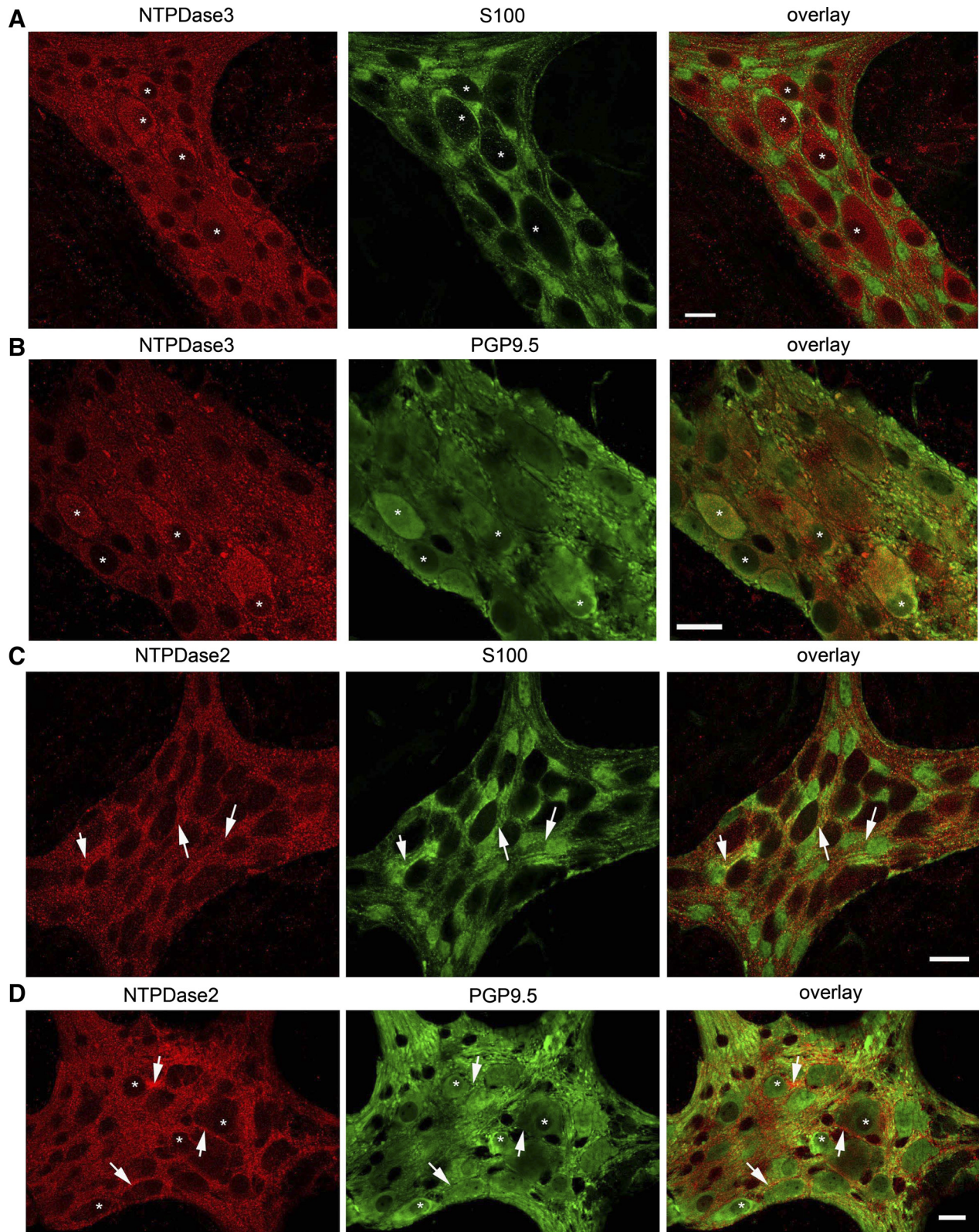


Fig. 8. NTPDase2 and -3 immunoreactivity in guinea pig myenteric plexus. Images are single optical sections through myenteric ganglia from the distal colon. *A*: NTPDase3 immunoreactivity (red) is primarily confined to enteric neurons and poorly correlates with glia immunoreactive for S100 (green). * are placed within the nuclei of several NTPDase3-immunoreactive neurons. *B*: neuronal localization is confirmed by colocalization of NTPDase3 (red) with the pan-neuronal marker PGP9.5 (green). *, PGP9.5-immunoreactive neurons colabeled with NTPDase3. *C*: NTPDase2 immunoreactivity (red) colocalizes with the glial marker S100 (green). Arrows, several areas of colocalization. *D*: NTPDase2 immunoreactivity (red, arrows) surrounds PGP9.5-immunoreactive neurons (green, *). Scale bars, 20 μ m.

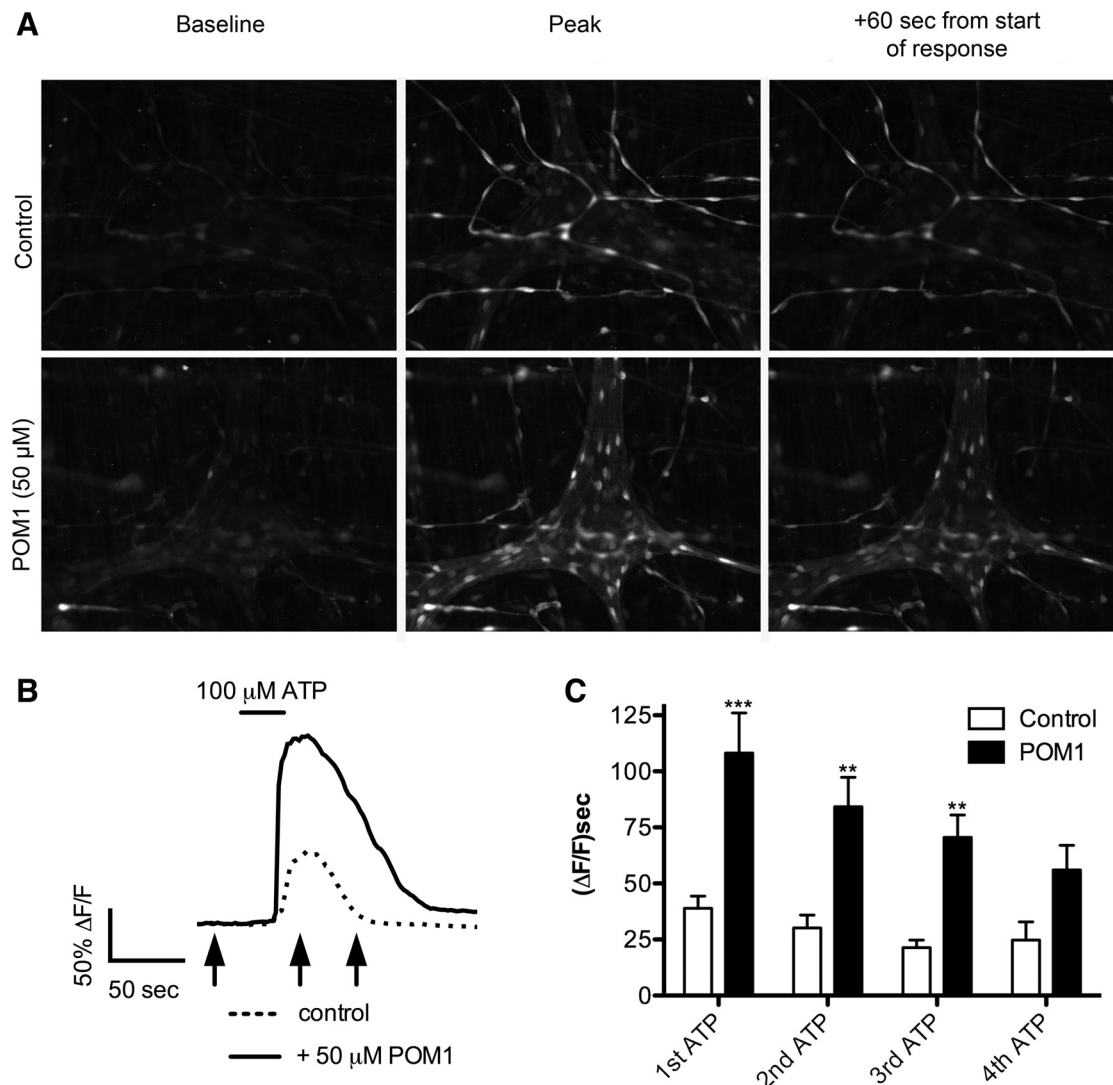


Fig. 9. NTPDase activity within the myenteric plexus of guinea pig distal colon controls ATP bioavailability and Ca^{2+} responses in glial cells. **A**: single frames from Ca^{2+} imaging experiments, where myenteric ganglia were challenged with 100 μM ATP under control conditions or in the presence of 50 μM sodium metatungstate (POM1), an NTPDase inhibitor. **B**: averaged glial intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) responses for the 2 ganglia presented in **A**. Arrows indicate times where single frames presented in **A** were taken. Basal fluo 4 fluorescence (F) in enteric glia (baseline, 1st arrow) in either condition is low, increasing dramatically on application of ATP (100 μM , 30-s application; peak, 2nd arrow). Under control conditions, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ levels return to baseline within 60 s. However, in the presence of the NTPDase inhibitor POM1, glial $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses are significantly prolonged. **C**: area under the curve analysis of ATP responses in ganglia under control conditions ($n = 6$) or in the presence of POM1 ($n = 6$) indicates that glial responses to ATP are significantly prolonged when NTPDase activity is inhibited. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$ (by 2-way ANOVA).

rons and NTPDase2 in glia) are expressed in cells intimately contacting one another. ATP released by neurons can therefore be rapidly broken down to ADP by NTPDase2 and -3. ADP is the agonist of P2Y_1 , P2Y_{12} and P2Y_{13} , and the expression and functional implication of P2Y_1 in the enteric nervous system are well documented (52). P2Y_1 activation should be under the control of the NTPDases expressed by the enteric nervous system. In addition, nucleotides released by neurons activate P2Y_4 receptors expressed by glial cells (22), and this paracrine communication between neurons and glia would also be under the control of NTPDase2 and -3. In support of this hypothesis, we show that inhibition of NTPDase activity extends nucleotide activation of glial P2 receptors (Fig. 9). Interestingly, neither ecto-5'-nucleotidase expression nor AMPase activity was detected in the enteric nervous system (data not shown).

These results are in accordance with the fact that the main source of extracellular adenosine acting on the presynaptic region of neurons is provided via an equilibrative adenosine transporter (12), and not via ATP hydrolysis.

Summary

NTPDase3 is expressed by neurons in the enteric nervous system and by certain epithelial cells of the digestive system. In salivary glands, secretory epithelia of serous and mucous acini (SLG only) express NTPDase3. NTPDase3 is also expressed by the epithelial cells of the upper digestive tract and by some G cells and other yet unidentified subtypes of gastric enteroendocrine cells. In addition, NTPDase3 is often expressed with NTPDase2 and/or ecto-5'-nucleotidase

in the tissues analyzed. Future studies will aim to address the significance of NTPDase3, in association with NTPDase2 and ecto-5'-nucleotidase, in the functions of the digestive system.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Inmaculada Gómez de Aranda and Benjamín Torrejón [Microscopy Unit, Serveis Científicotècnics, University of Barcelona (Bellvitge Campus)] for excellent technical assistance and Dr. Isidro Ferrer Abizanda (Institute of Neuropathology of Barcelona) for kindly providing the anti-gastrin antibody. We also thank Dr. Richard Poulin (Scientific Proofreading and Writing Service, Centre Hospitalier Universitaire de Québec) for editing the manuscript.

GRANTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, to J. Sévigny and K. A. Sharkey) and University of Barcelona Grant ACESB0 (to M. Martín-Satué). E. G. Lavoie was the recipient of a scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). B. D. Gulbransen held fellowships from the Canadian Association of Gastroenterology/CIHR/Crohn's and Colitis Foundation of Canada (CCFC) and the Alberta Heritage Foundation for Medical Research (AHFMR). K. A. Sharkey is an AHFMR Medical Scientist and holds the CCFC Chair in Inflammatory Bowel Disease Research at the University of Calgary. J. Sévigny is a recipient of a New Investigator Award from the CIHR and of a Junior 2 Scholarship from the FRSQ.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

REFERENCES

- Baker OJ, Camden JM, Ratchford AM, Seye CI, Erb L, Weisman GA. Differential coupling of the P2Y₁ receptor to G α ₁₄ and G α _{q/11} proteins during the development of the rat salivary gland. *Arch Oral Biol* 51: 359–370, 2006.
- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sévigny J, Finger TE. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol* 497: 1–12, 2006.
- Belcher SM, Zsarnovszky A, Crawford PA, Hemani H, Spurling L, Kirley TL. 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: 1331–1346, 2006.
- Bertrand PP. ATP and sensory transduction in the enteric nervous system. *Neuroscientist* 9: 243–260, 2003.
- Bornstein JC. Purinergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility. *Purinergic Signal* 4: 197–212, 2008.
- Braun N, Sévigny J, Robson SC, Hammer K, Hanani M, Zimmermann H. Association of the ecto-ATPase NTPDase2 with glial cells of the peripheral nervous system. *Glia* 45: 124–132, 2004.
- Burnstock G. The journey to establish purinergic signalling in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 20 Suppl 1: 8–19, 2008.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471–1483, 2007.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240: 31–304, 2004.
- Chadwick BP, Frischauf AM. The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* 50: 357–367, 1998.
- Christofi FL. Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic Signal* 4: 213–236, 2008.
- Correia-de-Sa P, Aadaes S, Timoteo MA, Vieira C, Magalhaes-Cardoso T, Nascimento C, Duarte-Araujo M. Fine-tuning modulation of myenteric motoneurons by endogenous adenosine: on the role of secreted adenosine deaminase. *Auton Neurosci* 126–127: 211–224, 2006.
- Dong X, Smoll EJ, Ko KH, Lee J, Chow JY, Kim HD, Insel PA, Dong H. P2Y receptors mediate Ca²⁺ signaling in duodenocytes and contribute to duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G424–G432, 2009.
- Dowd FJ, Murphy HC, Li L. Metabolism of extracellular ATP by rat parotid cells. *Arch Oral Biol* 41: 855–862, 1996.
- Enjoji K, Sévigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Schulte AM, Esch J 2nd, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Cszimadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD. Targeted disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med* 5: 1010–1017, 1999.
- Failor BU, Aschrafi A, Schmalzing G, Zimmermann H. Determination of native oligomeric state and substrate specificity of rat NTPDase1 and NTPDase2 after heterologous expression in *Xenopus* oocytes. *Eur J Biochem* 270: 1802–1809, 2003.
- Fausther M, Pelletier J, Ribeiro CM, Sévigny J, Picher M. Cystic fibrosis remodels the regulation of purinergic signaling by NTPDase1 (CD39) and NTPDase3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298: L804–L818, 2010.
- Finkelberg A, Busch L, Reina S, Sterin-Borda L, Borda E. Endogenous signalling system involved in parotid gland adenosine A₁ receptor-adenosine release. *Acta Physiol (Oxf)* 186: 29–36, 2006.
- Gaddie KJ, Kirley TL. Conserved polar residues stabilize transmembrane domains and promote oligomerization in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3. *Biochemistry* 48: 9437–9447, 2009.
- Guckelberger O, Sun XF, Sévigny J, Imai M, Kaczmarek E, Enjoji K, Kruskal JB, Robson SC. Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost* 91: 576–586, 2004.
- Gulbransen BD, Bains JS, Sharkey KA. Enteric glia are targets of the sympathetic innervation of the myenteric plexus in the guinea pig distal colon. *J Neurosci* 30: 6801–6809, 2010.
- Gulbransen BD, Sharkey KA. Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system. *Gastroenterology* 136: 1349–1358, 2009.
- Hart ML, Henn M, Kohler D, Kloor D, Mittelbronn M, Gorzolla IC, Stahl GL, Eltzschig HK. Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 22: 2784–2797, 2008.
- Heine P, Braun N, Sévigny J, Robson SC, Servos J, Zimmermann H. The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *Eur J Biochem* 268: 364–373, 2001.
- Ishibashi K, Okamura K, Yamazaki J. Involvement of apical P2Y₂ receptor-regulated CFTR activity in muscarinic stimulation of Cl⁻ reabsorption in rat submandibular gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1729–R1736, 2008.
- Kittel A, Pelletier J, Bigonnesse F, Guckelberger O, Kordas K, Braun N, Robson SC, Sévigny J. Localization of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (NTPDase1) and NTPDase2 in pancreas and salivary gland. *J Histochem Cytochem* 52: 861–871, 2004.
- Kontinen YT, Tensing EK, Laine M, Porola P, Tornwall J, Hukkanen M. Abnormal distribution of aquaporin-5 in salivary glands in the NOD mouse model for Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 32: 1071–1075, 2005.
- Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Flogel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sévigny J, Gear A, Weber AA, Molojavji A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Godecke A, Schrader J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 95: 814–821, 2004.
- Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 1: 193–204, 2005.
- Lavoie EG, Fausther M, Kauffenstein G, Kukulski F, Kunzli BM, Friess H, Sévigny J. 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–E656, 2010.
- Lavoie EG, Kukulski F, Lévesque SA, Lecka J, Sévigny J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol* 67: 1917–1926, 2004.
- Lee M, Lee SJ, Choi HJ, Jung YW, Frokiaer J, Nielsen S, Kwon TH. Regulation of AQP4 protein expression in rat brain astrocytes: role of P2X₇ receptor activation. *Brain Res* 1195: 1–11, 2008.
- Lee MG, Zeng W, Muallem S. Characterization and localization of P2 receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem* 272: 32951–32955, 1997.
- Lévesque SA, Kukulski F, Enjoji K, Robson SC, Sévigny J. NTPDase1 governs P2X₇-dependent functions in murine macrophages. *Eur J Immunol* 40: 1473–1485, 2010.

35. Levin R, Braiman A, Priel Z. Protein kinase C induced calcium influx and sustained enhancement of ciliary beating by extracellular ATP. *Cell Calcium* 21: 103–113, 1997.
36. Martín-Satué M, Lavoie EG, Pelletier J, Fausther M, Csizmadia E, Guckelberger O, Robson SC, Sévigny J. Localization of plasma membrane bound NTPDases in the murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* 131: 615–628, 2009.
37. Morse DM, Smullen JL, Davis CW. Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1485–C1497, 2001.
38. Nakamoto T, Brown DA, Catalan MA, Gonzalez-Begne M, Romanenko VG, Melvin JE. Purinergic P2X₇ receptors mediate ATP-induced saliva secretion by the mouse submandibular gland. *J Biol Chem* 284: 4815–4822, 2009.
39. Neshat S, deVries M, Barajas-Espinosa AR, Skeith L, Chisholm SP, Lomax AE. Loss of purinergic vascular regulation in the colon during colitis is associated with upregulation of CD39. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296: G399–G405, 2009.
40. Robaye B, Ghanem E, Wilkin F, Fokan D, Van Driessche W, Schurmans S, Boeynaems JM, Beauwens R. Loss of nucleotide regulation of epithelial chloride transport in the jejunum of P2Y₄-null mice. *Mol Pharmacol* 63: 777–783, 2003.
41. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure-function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409–430, 2006.
42. Savegnago L, Nogueira CW, Fachinetto R, Rocha JB. Characterization of ATP and ADP hydrolysis activity in rat gastric mucosa. *Cell Biol Int* 29: 559–566, 2005.
43. Sévigny J, Grondin G, Gendron FP, Roy J, Beaudoin AR. Demonstration and immunolocalization of ATP diphosphohydrolase in the pig digestive system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: G473–G482, 1998.
44. Sévigny J, Sundberg C, Braun N, Guckelberger O, Csizmadia E, Qawi I, Imai M, Zimmermann H, Robson SC. Differential catalytic properties and vascular topography of murine nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (NTPDase1) and NTPDase2 have implications for thromboregulation. *Blood* 99: 2801–2809, 2002.
45. Sorensen CE, Amstrup J, Rasmussen HN, Ankorina-Stark I, Novak I. Rat pancreas secretes particulate ecto-nucleotidase CD39. *J Physiol* 551: 881–892, 2003.
46. Tenneti L, Gibbons SJ, Talamo BR. Expression and trans-synaptic regulation of P2X₄ and P2Z receptors for extracellular ATP in parotid acinar cells. Effects of parasympathetic denervation. *J Biol Chem* 273: 26799–26808, 1998.
47. Turner JT, Weisman GA, Camden JM. Upregulation of P2Y₂ nucleotide receptors in rat salivary gland cells during short-term culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C1100–C1107, 1997.
48. Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sévigny J, Braun N. Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal* 1: 259–270, 2005.
49. Wang TF, Ou Y, Guidotti G. The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J Biol Chem* 273: 24814–24821, 1998.
50. Weiss T, Gheber L, Shoshan-Baratz V, Priel Z. Possible mechanism of ciliary stimulation by extracellular ATP: involvement of calcium-dependent potassium channels and exogenous Ca²⁺. *J Membr Biol* 127: 185–193, 1992.
51. Wildman SS, Boone M, Peppiatt-Wildman CM, Contreras-Sanz A, King BF, Shirley DG, Deen PM, Unwin RJ. Nucleotides downregulate aquaporin 2 via activation of apical P2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 20: 1480–1490, 2009.
52. Wood JD. The enteric purinergic P2Y₁ receptor. *Curr Opin Pharmacol* 6: 564–570, 2006.
53. Yang GK, Chen JF, Kieffer TJ, Kwok YN. Regulation of somatostatin release by adenosine in the mouse stomach. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 729–737, 2009.
54. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673–694, 2008.
55. Yip L, Leung HC, Kwok YN. Role of adenosine A₁ receptor in the regulation of gastrin release. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 477–487, 2004.

ANNEX 3

Reduced striatal ecto-nucleotidase activity in schizophrenia patients suports the “adenosine hypothesis”

Aliagas E, Villar-Menéndez I, Sévigny J, Roca M, Romeu M,
Ferrer I, Martín-Satué M, Barrachina M.

Purinergic Signalling

2013;9(4):599-608.

Reduced striatal ecto-nucleotidase activity in schizophrenia patients supports the “adenosine hypothesis”

Elisabet Aliagas · Izaskun Villar-Menéndez · Jean Sévigny · Mercedes Roca · Miriam Romeu · Isidre Ferrer · Mireia Martín-Satué · Marta Barrachina

Received: 8 May 2013 / Accepted: 31 May 2013 / Published online: 16 June 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Schizophrenia (SZ) is a major chronic neuropsychiatric disorder characterized by a hyperdopaminergic state. The hypoadenosinergic hypothesis proposes that reduced extracellular adenosine levels contribute to dopamine D₂ receptor hyperactivity. ATP, through the action of ecto-nucleotidases, constitutes a main source of extracellular adenosine. In the present study, we examined the activity of ecto-nucleotidases (NTPDases, ecto-5'-nucleotidase, and alkaline phosphatase) in the postmortem putamen of SZ patients ($n=13$) compared with aged-matched controls ($n=10$). We firstly demonstrated, by means of artificial postmortem delay experiments, that ecto-nucleotidase activity in human brains was stable up to 24 h, indicating the reliability of this tissue for these enzyme

determinations. Remarkably, NTPDase-attributable activity (both ATPase and ADPase) was found to be reduced in SZ patients, while ecto-5'-nucleotidase and alkaline phosphatase activity remained unchanged. In the present study, we also describe the localization of these ecto-enzymes in human putamen control samples, showing differential expression in blood vessels, neurons, and glial cells. In conclusion, reduced striatal NTPDase activity may contribute to the pathophysiology of SZ, and it represents a potential mechanism of adenosine signalling impairment in this illness.

Keywords Ecto-nucleotidases · Adenosine · CD39 · CD73 · Schizophrenia · Postmortem

Mireia Martín-Satué and Marta Barrachina contributed equally to this work.

E. Aliagas · I. Villar-Menéndez · I. Ferrer · M. Martín-Satué · M. Barrachina
Bellvitge Biomedical Research Institute–IDIBELL,
L'Hospitalet de Llobregat, Spain

E. Aliagas · I. Ferrer · M. Martín-Satué
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental,
Facultat de Medicina, Campus de Bellvitge,
Universitat de Barcelona,
Barcelona, Spain

I. Villar-Menéndez · I. Ferrer · M. Barrachina
Institute of Neuropathology, Bellvitge University Hospital–ICS,
L'Hospitalet de Llobregat, Spain

J. Sévigny
Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie,
Centre Hospitalier Universitaire de Québec
and Département de microbiologie-infectiologie et d'immunologie,
Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada

M. Roca · M. Romeu
Banc de Teixits Neurològics-Parc Sanitari Sant Joan de Déu,
CIBERSAM, Sant Boi de Llobregat, Spain

I. Ferrer · M. Barrachina
Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades
Neurodegenerativas, CIBERNED, Barcelona, Spain

M. Barrachina (✉)
Institute of Neuropathology, [Bellvitge Biomedical Research
Institute–] IDIBELL, Bellvitge University Hospital–ICS,
Avda. Gran Via de l'Hospitalet, 199-203, 08908
L'Hospitalet de Llobregat, Spain
e-mail: mbarrachina@idibell.cat

M. Martín-Satué (✉)
Facultat de Medicina-UB Bellvitge, Pavelló de Govern,
4^a planta, lab. 4145, c/ Feixa Llarga s/n, 08907
L'Hospitalet de Llobregat, Spain
e-mail: martinsatue@ub.edu

Introduction

Schizophrenia (SZ) is a mental disorder with a global prevalence of 1 %. It is characterized by positive, negative, and cognitive symptoms. Its origin is unknown, although positive symptoms are related to hyperdopaminergic activity of the dopamine D₂ receptor (D₂R) [1]. Negative and cognitive symptoms are attributed to reduced glutamatergic activity via *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), which in turn potentiates dopamine release. Indeed, the activation of D₂Rs with amphetamines, as well as the use of NMDAR blockers, promotes psychotic-like behavior in healthy people [2, 3]. Therefore, the normalization of the dopaminergic and glutamatergic systems is a pharmacological goal for the outcome of this neurological disorder. Regarding this, adenosine modulates dopaminergic and glutamatergic signalling pathways and is, therefore, a candidate target in the treatment of SZ [4].

Adenosine is a nucleoside widely distributed in the organism with neuromodulative and neuroprotective activity in the central nervous system. It presents four specific G-protein-coupled receptors (A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃) [5]. A₁Rs and A_{2A}R are the most expressed receptors in the brain. The modulation of A₁Rs inhibits presynaptic glutamate release, while postsynaptic A_{2A}R activation can promote dopamine D₂ receptor signalling inhibition through the heterodimer A_{2A}R–D₂R formation [6, 7]. Interestingly, a hypoadenosinergic state has been proposed in SZ [8]. Therefore it is conceivable that the mechanisms regulating extracellular adenosine levels are impaired. In line with this, increased serum adenosine deaminase (ADA) activity, which converts extracellular adenosine into inosine, as well as low frequency of the low activity ADA allelic variant, has been reported in SZ patients [9, 10]. Moreover, transgenic mice overexpressing adenosine kinase, a cytosolic ribokinase that phosphorylates the re-uptaken adenosine into 5'-adenosine monophosphate (AMP), show attention impairments linked to SZ, while adenosine augmentation exerts antipsychotic-like activity in mice [11]. In fact, several clinical trials have shown the beneficial effects of drugs that modulate adenosine signalling such as allopurinol and dipyridamole, which increase extracellular adenosine levels by inhibiting its degradation and reuptake, respectively [12–17]. Interestingly, caffeine (a non-selective adenosine receptor antagonist) consumption exacerbates psychotic symptoms in SZ patients [18]. All these data support the “adenosine hypothesis” in SZ, and it has been proposed the use of A_{2A}R agonists in combination with antipsychotics, in order to potentiate their inhibitory role over D₂Rs [19].

Although adenosine can be directly released via specialized nucleoside transporters [20], the main source of extracellular adenosine is the hydrolysis of 5'-adenosine triphosphate (ATP) through ecto-nucleotidases [21]. This includes

different families of nucleotide-hydrolyzing enzymes expressed at the cell surface that, alone or acting sequentially, generate adenosine from adenine nucleotides (i.e., ATP, ADP, or AMP): (a) the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase) family includes four plasma membrane-bound members: NTPDase1 (CD39), NTPDase2, NTPDase3, and NTPDase8; these enzymes are differentially expressed and hydrolyze nucleoside triphosphates and diphosphates to their monophosphate derivatives; (b) the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) family has three members (NPP1-3) capable of hydrolyzing nucleoside triphosphates to monophosphates and PPI, such as ATP to AMP and PPI; (c) the 5'-nucleotidase family has several intracellular members but only one member is attached to the plasma membrane with an extracellularly located active site, the ecto-5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl phosphatidylinositol-linked membrane-bound glycoprotein that efficiently hydrolyzes AMP to adenosine; and (d) the alkaline phosphatase (AP) family includes ubiquitous enzymes, such as the tissue nonspecific AP (TNAP), with broad substrate specificity, including adenine nucleotides and pyrophosphate, releasing inorganic phosphate. The distribution of ecto-nucleotidases in brain has been studied in rodents [22], but little is known of their distribution in humans. The main goal of this study was to characterize ecto-nucleotidase activity in brains of SZ patients and controls, in order to determine whether these enzymes may also be considered as potential contributors to the hypoadenosinergia reported in SZ.

Materials and methods

Human brain samples

The putamen samples from SZ patients used in this study were provided by the Sant Joan de Déu Brain Bank (Sant Boi de Llobregat, Barcelona, Spain), and the control samples were obtained from the Brain Bank of the Institute of Neuropathology (HUB-ICO-IDIBELL Brain Bank, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain). The donation and obtaining of samples were regulated by the ethics committee of both institutions. The sample processing followed the rules of the European Consortium of Nervous Tissues: BrainNet Europe II (BNEII). All the samples were protected in terms of individual donor identification following the BNEII laws. Clinical diagnosis of SZ in donor subjects was confirmed premortem with DMS-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th edition) and ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) criteria by clinical examiners. Most donors were hospitalized for more than 40 years and were re-evaluated every 2 years to monitor and update their clinical

Table 1 Summary of the main clinical and neuropathological features of the human samples studied, and drug treatment administrated to each SZ patient

Sample ID no.	Clinical manifestation	Postmortem analysis (AD Braak stages)	Gender	Age (years)	Postmortem delay	TAPs	AAPs	BZD	Others
1	Control	I/A	M	65	5 h 15 min				
2	Control	I/0	M	56	7 h 10 min				
3	Control	I/A	F	64	2 h 15 min				
4	Control	II/A	M	71	5 h 15 min				
5	Control	II/A	F	86	4 h 15 min				
6	Control	III/A	F	77	11 h 30 min				
7	Control	III/B	M	85	4 h 45 min				
8	Control	III/A	F	71	6 h 45 min				
9	Control	IV/C	F	69	8 h 10 min				
10	Control	IV/C	F	81	5 h				
11	Residual SZ	II/A	M	74	7 h	√		√	Antidepressants and anticholinergics
12	Paranoid SZ	II/0	M	69	8 h	√	√	√	Anticholinergics
13	Residual SZ	II/0	M	87	3 h	√	√	√	
14	Residual SZ	I/B	M	76	5 h 15 min	√		√	
15	Residual SZ	I/A	M	89	1 h				
16	Residual SZ	II/A	M	75	6 h	√	√		
17	Residual SZ	III/A	M	80	6 h	√		√	
18	Disorganized SZ	III/0	M	78	7 h	√		√	
19	Residual SZ	III/A	M	90	3 h	√			
20	Residual SZ	IV/C	M	80	4 h 50 min	√	√	√	
21	Paranoid SZ	IV/0	M	81	5 h	√	√	√	
22	Residual SZ	III/A	M	76	8 h	√	√	√	Anticholinergic and antiepileptic
23	Residual SZ	III/C	M	92	2 h		√	√	Antidepressant and antiepileptic

AD Braak stages indicates the stage of neurofibrillary tangles (Roman numerals) and senile plaques (letters) according to Braak and Braak [23] M male, F female, AD Alzheimer's disease, TAPs typical antipsychotics, AAPs atypical antipsychotics, BZD benzodiazepines

progression. Anatomic pathology exploration of all SZ samples was performed at the Hospital of Bellvitge to identify the degree of certain histopathological alterations, as described (Table 1). The neuropathological diagnoses were made according to well-established criteria for Alzheimer's disease (AD) [23]. None of the SZ cases showed substantia nigra neurodegeneration.

The left cerebral and cerebellar hemispheres and alternate sections of the brain stem were fixed in 4 % buffered formalin for 3 weeks. Selected samples were embedded in paraffin and processed for neuropathological study. The other half of the cerebrum and cerebellum was cut on coronal slices and, together with remaining alternate sections of the brain stem, was immediately frozen and stored at -80°C . For histological studies, brain samples were fixed with 4 % buffered formalin, cryopreserved with 30 % sucrose, and stored at -80°C .

Immunohistochemistry experiments

Immunohistochemistry experiments were performed as described previously [24] except for the use of 30- μm -thick

free-floating slices. Slices were incubated overnight at 4°C with the following anti-human-monoclonal antibodies: CD39 (1:500; Ancell, Minnesota, USA), hN3-B3_S for NTPDase3 (1:500; <http://ectonucleotidases-ab.com/>) and CD73 (1:50; Hycult biotechnology, Uden, The Netherlands). Tissue sections were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (EnVisionTM + system, DAKO, Carpinteria, CA, USA) as secondary antibody for 1 h at RT. Secondary antibody alone was routinely included as control for the immunohistochemistry experiments. Samples were counterstained with hematoxylin and mounted with Fluoromount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich). Samples were observed and photographed under a light Leica DMD 108 microscope.

In situ activity experiments

Histochemical localization of ATPase, ADPase, and AMPase activity was carried out using the Wachstein/Meisel lead phosphate method [24–26] in cryostat-obtained (30- μm thick) free-floating slices. Enzymatic reaction was measured

for 30 min (ATPase assay) or for 1 h (ADPase and AMPase assays) at 37 °C in the presence of 2.5 mM levamisole, as an inhibitor of AP activity, and with 200 µM ATP, 1 mM ADP, or 1 mM AMP as a substrate. For NTPDase inhibition experiments, ATPase and ADPase reactions were carried out in the presence of 1 mM suramin (Sigma-Aldrich) or 1 mM NF279 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) [27]. For ecto-5'-nucleotidase inhibition experiments, AMPase reactions were performed in the presence of 1 mM α,β -methylene-ADP (α,β -meADP). The substrates were omitted in control experiments. The reactions were revealed by incubation with 1 % (NH₄)₂S *v/v* for exactly 1 min. Samples were mounted, observed, and photographed as described above.

In situ alkaline phosphatase activity experiments

The histochemical localization of AP was addressed by using the method of Gossrau with some modifications [24, 28]. Briefly, cryostat-obtained (30-µm thick) free-floating slices were washed twice in 0.1 M Tris–HCl buffer pH 7.4, containing 5 mM MgCl₂, and then pre-incubated with the same buffer at pH 9.4 for 15 min at RT. Enzymatic reaction was started by adding 200 µl of revealing reagent BCIP[®]/NBT liquid substrate system (Sigma-Aldrich) for 7 min at RT, and stopped 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. Samples were mounted, observed, and photographed as described above.

Artificial postmortem delay

For this experiment, all the samples were obtained between 3.45 and 4.55 h after death (considered time 0 for the present purpose) and the brains were processed as previously indicated, except for a fresh fragment of the frontal cortex (area 8 of Brodmann) that was cut into small pieces, one of them immediately frozen (time 0) and the rest maintained at room temperature (20 °C) for 3, 6, 12, 24, and 48 h, and then frozen and stored at –80 °C. The cases analyzed are listed in Table 2.

Plasma membranes isolation

Human brain putamen samples (50–100 mg) were used to isolate plasma membranes, as previously described [29].

NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activity assays

NTPDase (ATPase, ADPase) and ecto-5'-nucleotidase (AMPase) activity was determined by measuring the amount of liberated inorganic phosphate (Pi) using a colorimetric

Table 2 Summary of the main clinical and neuropathological features of the samples used for the artificial postmortem delay

Sample ID no.	Postmortem analysis	Gender	Age (years)	Postmortem delay
A0767	Control	M	47	4 h 55 min
A0563	AD V/B	M	68	4 h 45 min
A0816	AD III/A	M	85	3 h 45 min

M male, *AD* Alzheimer's disease, indicating the Braak and Braak stages [23]

assay. The incubation mixture contained 160 mM (Tris)–HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂, 5 mM levamisole, as alkaline phosphatase inhibitor, and 1 mM ATP, ADP, or AMP as substrates in a final volume of 150 µl. The assay was initiated by adding the membrane-enriched samples (1 µg for ATPase and ADPase assay and 10 µg for AMPase assay). After an incubation of 20 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 22.5 µl of 34 % trichloroacetic acid (TCA). Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the enzymatic reaction. The release of inorganic Pi was measured with the malachite green method [30]. KH₂PO₄ was used as a Pi standard. Controls to determine nonenzymatic Pi accumulation were performed by incubating either the membrane-enriched samples in the absence of the substrate, or the substrate alone. All samples were analyzed in triplicate. Enzyme activity was expressed as OD arbitrary units at 620 nm.

Alkaline phosphatase (AP) activity assay

AP activity in membrane-enriched samples was determined as described previously [31]. Briefly, 20 µg of sample was assayed at room temperature in the following reaction mixture: 0.2 M diethanolamine buffer pH 9.8, (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), 1 mM MgCl₂, and 5 mM *p*-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate as substrate (pNPP) (Sigma-Aldrich) in the presence or absence of 5 mM levamisole. Reactions were stopped after 30 min with 0.1 M NaOH. AP activity was determined as the liberated *p*-nitrophenol and was measured at 405 nm. Controls in the presence of levamisole and in the absence of the substrate were performed. All samples were assayed in triplicate.

Statistical analysis

Data are represented as mean ± standard deviation, and the number of experiments and samples are indicated for each experiment. Statistical analysis was performed using Student's *t* test to compare group means since data fit to a normal distribution, with a *p* value <0.05.

Results

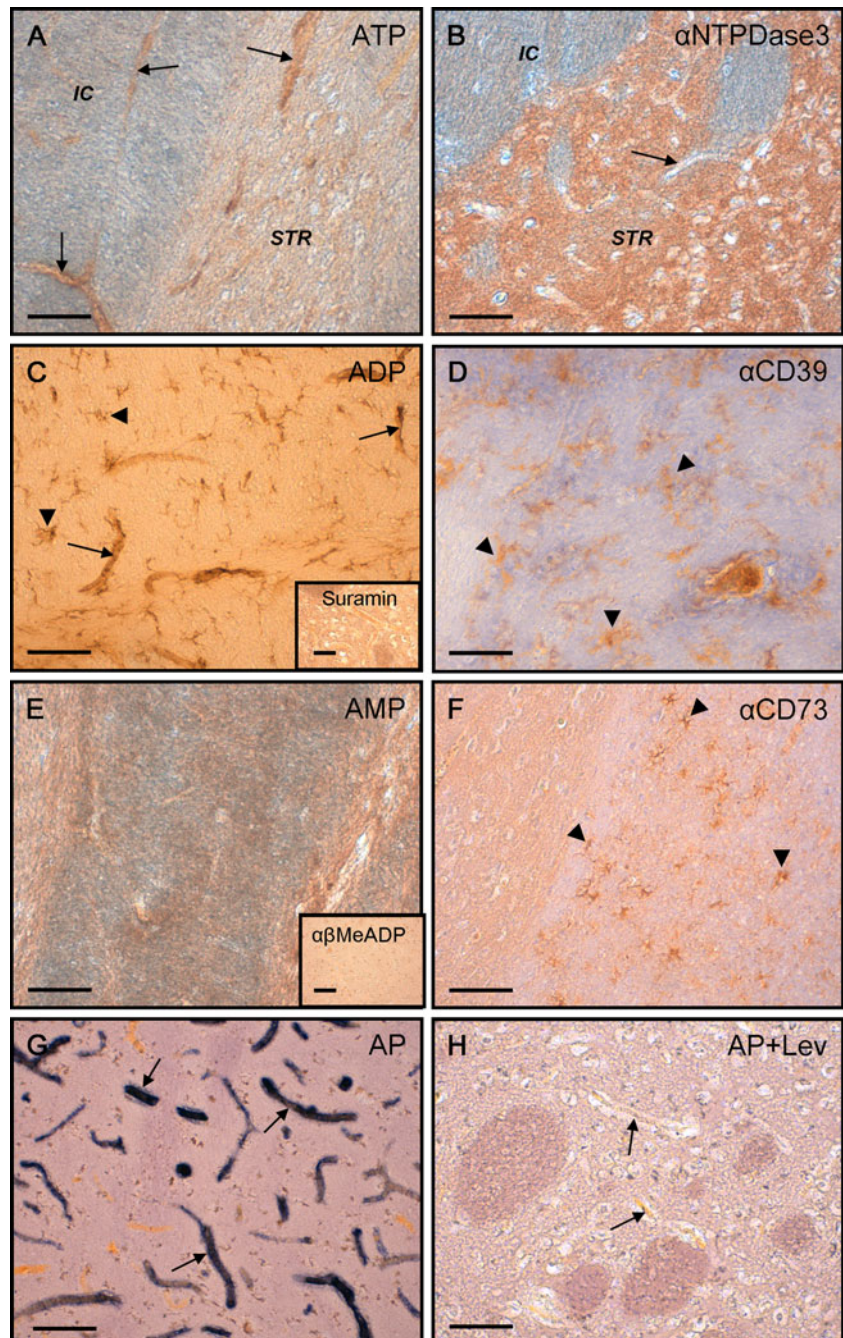
Localization of ecto-nucleotidase activity in control human brain samples

In situ histochemistry experiments in brain control samples revealed substantial ATPase and ADPase catalytic activity (Fig. 1a, c). ADPase activity was clearly localized to endothelial cells and microglia, largely coinciding with the NTPDase1 (CD39) distribution detected by

immunohistochemistry (Fig. 1d). ATPase activity coincided with ADPase localization and was also present in the gray matter of striatum, matching with the anti-NTPDase3 staining (Fig. 1b). ATPase and ADPase activity was inhibited by suramin (Fig. 1c) and NF279 (not shown), suggesting that the in situ activity detected was due to the action of NTPDases.

AMPase activity was present in the brain (Fig. 1e). The activity pattern obtained was, however, diffuse, and the precise localization of the ecto-enzyme was difficult to

Fig. 1 In situ enzyme activity (a, c, e, g, h) and immunolabeling (b, d, f) of ecto-nucleotidases in the putamen control samples. Activity shown is: ATPase (a), ADPase (c), AMPase (e), and alkaline phosphatase (g, h) in the presence of the inhibitor levamisole). *Inset* in c shows the ADPase activity in the presence of the inhibitor suramin, and *inset* in e the AMPase activity in the presence of the inhibitor $\alpha\beta$ MeADP. Immunolabeling was performed for NTPDase3 (b), NTPDase1/CD39 (d), and ecto-5'-nucleotidase/CD73 (f). *IC* internal capsule, *STR* striatum. *Arrows* point to blood vessels, and *black arrowheads* to glial cells. *Scale bars*=100 μ m in a, b, e, f, g, h, and *insets*, and 50 μ m in c and d



establish. The activity was attributable to ecto-5'-nucleotidase (CD73) since the specific inhibitor α,β -meADP abrogated the signal. Using an anti-CD73 antibody, the enzyme was localized to glial cells and also to neuropil (Fig. 1f).

Alkaline phosphatase activity was intense in blood vessels (Fig. 1g). The activity was abrogated in the presence of the alkaline phosphatase inhibitor levamisole, confirming the specificity of the activity detected (Fig. 1h).

Ecto-nucleotidase activity in human brain along an artificial postmortem delay experiment

In order to characterize the behavior of ecto-nucleotidase activity in human postmortem brain homogenates, a progressive artificial postmortem delay was performed, since it is well known that some enzymatic activity is more vulnerable to postmortem delay than other. Our results, compiled in Fig. 2, showed that NTPDase activity (ADPase and ATPase) was very stable throughout the postmortem delay, and that

ecto-5'-nucleotidase activity (AMPase) was more variable from the time point of 12 h with a tendency to decrease. AP activity was invariable until the time point of 12 h and then started to decrease and displayed more heterogeneity between samples.

Ecto-nucleotidase activity in human brains from SZ patients

Ecto-nucleotidase activity in putamen homogenates of SZ patients was compared with age-matched controls (Table 1). All SZ samples were from patients suffering this neurological disorder, although postmortem analysis also revealed the presence of several hallmarks (β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles) typical of Alzheimer's disease (AD) at different Braak and Braak stages. For this reason, the control group used was from human cases with AD I–IV stages of Braak and Braak. However, as the activity of the four ecto-nucleotidases measured showed no significant differences among control samples (samples 1–10, Table 1; data not

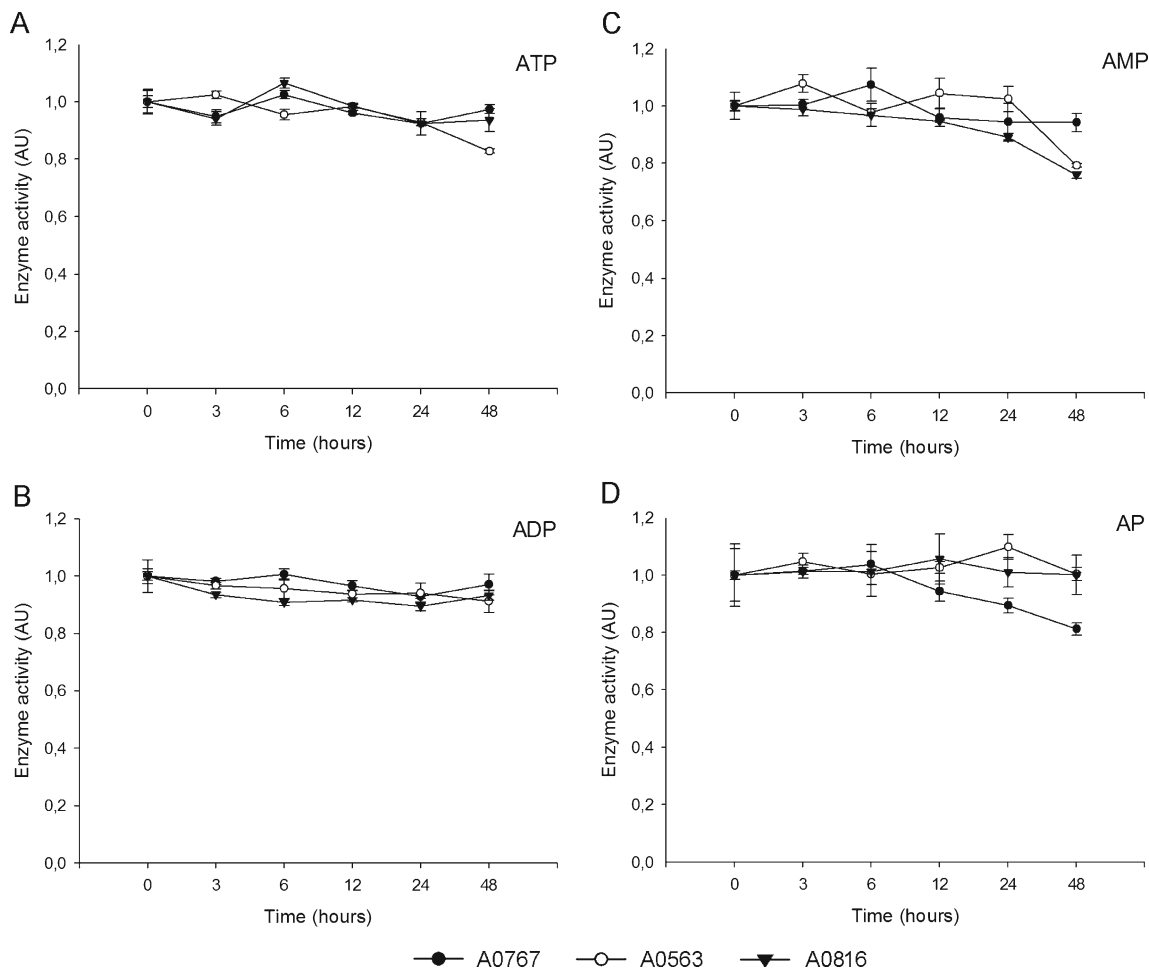


Fig. 2 Enzyme activity in artificial postmortem delay. Three different samples (A0767, black circles; A0563, white circles; A0816, black triangle) from the frontal cortex (area 8 of Brodmann) were analyzed (see the “Material and methods” section). Experiments were performed in triplicate

and the graphs correspond to one representative experiment for each sample ($n=3$). Means and standard deviations of ATPase (a), ADPase (b), AMPase (c), and alkaline phosphatase (d) activity are represented. Values are normalized and activity is represented in arbitrary units (AU)

shown), we carried out the analysis comparing SZ cases (samples 11–23, Table 1) with respect to all control samples. Results obtained are shown in Fig. 3. A significant decrease in ATP and ADP hydrolysis (15 % and 12 %, respectively) was recorded in SZ samples ($p=0.012$ and $p<0.001$, respectively). No significant differences were found for ecto-5'-nucleotidase activity or alkaline phosphatase.

Discussion

Several lines of evidence indicate that hypofunction of adenosine signalling, linked to dopaminergic impairment, may contribute to the pathophysiology of SZ. It has recently been reported in mice that augmentation of adenosine ameliorates psychotic and cognitive symptoms linked to SZ [11]. In consequence, a detailed understanding of metabolic pathways involved in the control of extracellular adenosine levels in brain is needed to promote future therapies. The ATP released from brain cells is the main source of extracellular adenosine through the action of sequentially acting ecto-nucleotidases. The focus of our study was to determine

ecto-nucleotidase activity in human brain samples of patients with SZ compared with age-matched controls.

Here we studied the expression of three different families of ecto-nucleotidases in the postmortem putamen of human control brains. We analyzed this cerebral region as some evidence points to the existence of striatal hyperdopaminergic activity secondary to hypofunction of the prefrontal dopamine system [32, 33], whereas D₂R and A_{2A}R are expressed mainly in medium-sized GABAergic spiny neurons [6]. Interestingly, a recent study showed that, in rodent, ecto-5'-nucleotidase is specifically expressed in this neuronal population, being responsible for most of the extracellular adenosine produced in the striatum [34]. Although the distribution of ecto-nucleotidases in the rodent brain has been deeply examined [22], little information was available on humans.

ATPase and ADPase activity was identified in striatal samples. The activity was attributable to NTPDases since they were abolished by the use of inhibitors. NTPDase1 (CD39) was immunodetected in microglia and blood vessels, coinciding with the localization of ATPase and ADPase activity and in agreement with the previous characterization of this enzyme in mice [35]. Another member of the

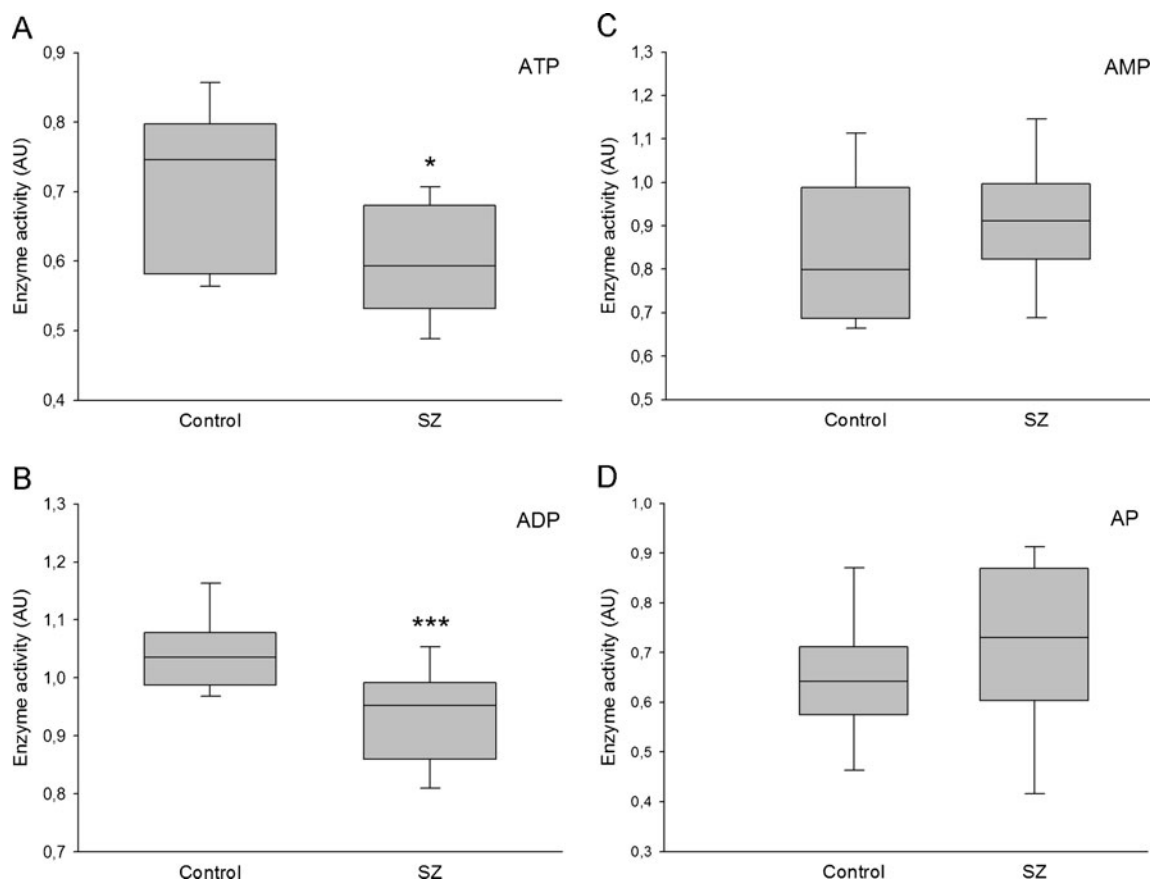


Fig. 3 Enzyme activity in the putamen of schizophrenia (SZ) versus control samples. ATPase (a), ADPase (b), AMPase (c), and alkaline phosphatase (d) activity were determined. Experiments were performed

in triplicate for each sample. Data are represented with *boxplots* in arbitrary units (AU). $n=13$ for SZ and $n=10$ for controls. Significant differences at *** $p<0.001$ and at * $p<0.05$

NTPDase family, NTPDase3, was detected in striatal gray matter, where ATPase activity was also localized. Less ADPase activity was detected in this structure, reinforcing the idea that the above-mentioned ATPase activity in gray matter is attributable to NTPDase3, with a hydrolysis ratio of ATP:ADP of 5:1. The presence of NTPDase3 was already confirmed in rat brain by western blot [36]. In the present study we did not look at the other two membrane-associated members of the NTPDase family, NTPDase2, and NTPDase8. It is known that in rodents, NTPDase2 is expressed in neural stem cells in the subventricular zone of the lateral ventricles [37], and no *ntpdase8* mRNA could be detected by PCR in mouse brain [38].

Ecto-5'-nucleotidase (CD73) was expressed and notably active in the putamen samples studied. Although the activity pattern was diffuse and difficult to assign to a particular structure, as already reported in other mammalian brains [22], the specificity of the reaction was proven by the use of α,β -meADP.

As expected, alkaline phosphatase activity was detected in blood vessels. This activity was intense and completely abrogated with the AP inhibitor levamisole. Previous reports have demonstrated that AP activity in human brain is attributable to TNAP expression [39, 40].

In summary, our results indicate that NTPDases and ecto-5'-nucleotidase are, in physiological extracellular pH, the dominant ecto-nucleotidases, as already reported in brains of other mammals [22]. These results support the role of both neurons and glial cells in the extracellular adenosine metabolism in brain.

The human postmortem brain is a very useful tissue to unravel the molecular pathways that play a role in human neurological diseases [41]. However, special care must be taken as there are several technical limitations for molecular studies, such as time after death and storage temperature [42]. For these reasons, we aimed to assess the effect of postmortem delay on ecto-nucleotidase activity. We demonstrated that ATPase and ADPase activity is stable throughout the artificial postmortem delay (i.e. for 48 h). A similar result was found for AMPase (CD73) activity, although in this case there is more variability at longer times and we suggest not exceeding 24 h postmortem in performing experiments involving this enzyme. In the case of AP activity, fluctuations were recorded after 12 h postmortem, pointing up the importance of studying samples obtained before this time after death. SZ and control samples used in this study were taken between 2 and 11.5 h after death (most of them before 8 h), at which time point activity was well preserved. In fact, these findings are not exclusive to ecto-nucleotidases, as the preservation of other enzymatic activity has been reported in this type of tissue [43–47]. The data presented here are of relevance for this and future study of ecto-nucleotidases in human brains.

In the present report, most of the samples, both SZ and control cases, showed an AD-related pathology, which was asymptomatic. This postmortem finding is consistent with previously reported postmortem analyses showing that 70–80 % of individuals over 65 years of age present AD-related pathology at the neuropathological level, but most of them have not developed AD [48]. Therefore, we performed a comparative study at the neuropathological level, but the final results may be considered as control vs SZ patients from a clinical point of view.

Although ecto-nucleotidases, and TNAP in particular, have been studied in Alzheimer disease [31, 49], no data were available on human ecto-nucleotidase expression in mental disorders such as SZ. By analyzing brain membranes, we have shown that NTPDase activity (both ATPase and ADPase) is significantly reduced in the putamen of SZ patients when compared with control samples. Although no significant changes were detected for either ecto-5'-nucleotidase or AP activity, a decrease in their available substrate, AMP, might contribute to the hypothesized adenosine reduction in SZ brains. Involvement of ecto-5'-nucleotidase activity in the adenosine levels of striatum has already been described in rats [50].

It is important to note the conditions of the tissues presented in this study. SZ patients underwent long-term drug treatment. Seibt et al. [51] have studied the effect of the antipsychotic drugs haloperidol, olanzapine and sulpiride, prescribed for SZ, on the nucleotide hydrolysis in brain membranes of zebrafish. They found decreased ADPase activity in the presence of haloperidol and sulpiride but only at the highest concentration tested (250 μ M). No changes in ADPase activity were reported for olanzapine. Although we cannot rule out a putative effect of sustained drug treatment on enzyme activity in the cohort studied (except for patient #15, see Table 1), the effective drug concentration in the study of Seibt et al. exceeded the concentration of the drug in the blood of our SZ patients by over 3 log of magnitude. Considering the advisability of drug prescription in most of the diagnosed SZ patients, performing the present study in drug-naive patients would hardly be feasible. Another aspect to be considered is that all patients included in the present study were male since the postmortem brain collection of the Brain Bank belongs to a hospital formerly devoted to the care of male mental patients. Therefore, the study of a larger cohort should be considered.

In summary, in the present report we describe: (a) the distribution of ecto-nucleotidases in the putamen of human brains, (b) the preservation of the activity of four ecto-nucleotidases in human postmortem brains, and (c) the reduction in ecto-nucleotidase activity in the putamen of SZ patients. These findings reinforce the “adenosine hypothesis” in SZ and point to the modulation of ecto-nucleotidases as new potential targets in the treatment of this neurological disorder.

Acknowledgments We thank Inmaculada Gómez de Aranda and *Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona, Campus de Bellvitge*, Barcelona, Spain, for their technical assistance. We thank T. Yohannan for editorial assistance. There is no conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations. This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III [PI10/00305 to M.M.S.], and La Fundació La Marató de TV3 [090330 to M.B.]. I.V.M. is the recipient of an IDIBELL predoctoral fellowship.

References

- Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT (2006) Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52:139–153. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.015
- Kegeles LS, Zea-Ponce Y, Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Wang T, Weiss R, Van Heertum RL, Mann JJ, Laruelle M (1999) Stability of [¹²³I]IBZM SPECT measurement of amphetamine-induced striatal dopamine release in humans. *Synapse* 31:302–308
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199–214. doi:10.1001/archpsyc.1994.03950030035004
- Boison D, Singer P, Shen HY, Feldon J, Yee BK (2012) Adenosine hypothesis of schizophrenia-opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology* 62:1527–1543. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.01.048
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527–552
- Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7238–7241
- Ferré S (1997) Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 133:107–120. doi:10.1007/s002130050380
- Lara DR, Souza DO (2000) Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypotheses* 54:157–166. doi:10.1054/mehy.1999.0003
- Brunstein MG, Silveira EM Jr, Chaves LS, Machado H, Schenkel O, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO, Lara DR (2007) Increased serum adenosine deaminase activity in schizophrenic receiving antipsychotic treatment. *Neurosci Lett* 414:61–64. doi:10.1016/j.neulet.2006.11.071
- Dutra GP, Ottoni GL, Lara DR, Bogo MR (2010) Lower frequency of the low activity adenosine deaminase allelic variant (ADA1*2) in schizophrenic patients. *Rev Bras Psiquiatr* 32:275–278. doi:10.1590/S1516-44462010005000003
- Shen HY, Singer P, Lytle N, Wei CJ, Lan JQ, Williams-Karnesky RL, Chen JF, Yee BK, Boison D (2012) Adenosine augmentation ameliorates psychotic and cognitive endophenotypes of schizophrenia. *J Clin Invest* 122:2567–2577. doi:10.1172/JCI62378
- Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O, Kamalipour A (2000) Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther* 25:131–137. doi:10.1046/j.1365-2710.2000.00273.x
- Akhondzadeh S, Safarcherati A, Amini H (2005) Beneficial antipsychotic effects of allopurinol as add-on therapy for schizophrenia: a double blind, randomized and placebo controlled trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:253–259. doi:10.1016/j.pnpbp.2004.11.008
- Brunstein MG, Ghisolfi ES, Ramos FL, Lara DR (2005) A clinical trial of adjuvant allopurinol therapy for moderately refractory schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 66:213–219
- Dickerson FB, Stallings CR, Origoni AE, Sullens A, Khushalani S, Sandson N, Yolken RH (2009) A double-blind trial of adjunctive allopurinol for schizophrenia. *Schizophr Res* 109:66–69. doi:10.1016/j.schres.2008.12.028
- Lara DR, Brunstein MG, Ghisolfi ES, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO (2001) Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 16:235–237
- Wonodi I, Gopinath HV, Liu J, Adami H, Hong LE, Allen-Emerson R, McMahon RP, Thaker GK (2011) Dipyridamole monotherapy in schizophrenia: pilot of a novel treatment approach by modulation of purinergic signaling. *Psychopharmacology (Berl)* 218:341–345. doi:10.1007/s00213-011-2315-3
- Lucas PB, Pickar D, Kelsoe J, Rapaport M, Pato C, Hommer D (1990) Effects of the acute administration of caffeine in patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 28:35–40
- Dixon DA, Fenix LA, Kim DM, Raffa RB (1999) Indirect modulation of dopamine D2 receptors as potential pharmacotherapy for schizophrenia: I. Adenosine agonists. *Ann Pharmacother* 33:480–488. doi:10.1345/aph.18215
- Parkinson FE, Damaraju VL, Graham K, Yao SY, Baldwin SA, Cass CE, Young JD (2011) Molecular biology of nucleoside transporters and their distributions and functions in the brain. *Curr Top Med Chem* 11:948–972. doi:10.2174/156802611795347582
- Zimmermann H, Zebisch M, Strater N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502. doi:10.1007/s11302-012-9309-4
- 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. doi:10.1007/s00441-008-0681-x
- Braak H, Braak E (1999) Temporal sequence of Alzheimer's disease related pathology. In: Peters A, Morrison JH (eds) *Cerebral Cortex*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 475–512
- Aliagas E, Vidal A, Torrejón-Escribano B, Taco MD, 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(2):227–37. doi:10.1007/s11302-012-9345-0
- 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 (Oxford)* 199:191–197. doi:10.1111/j.1748-1716.2010.02095.x
- 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. doi:10.1177/8.5.387
- Munkonda MN, Kauffenstein G, Kukulski F, Lévesque SA, Legendre C, Pelletier J, Lavoie EG, Lecka J, Sévigny J (2007) Inhibition of human and mouse plasma membrane bound NTPDases by P2 receptor antagonists. *Biochem Pharmacol* 74:1524–1534. doi:10.1016/j.bcp.2007.07.033
- Schelstraete K, Deman J, Vermeulen FL, Strijckmans K, Vandecasteele C, Slegers G, De Schryver A (1985) Kinetics of ¹³N-ammonia incorporation in human tumours. *Nucl Med Commun* 6:461–470
- Perez-Buira S, Barrachina M, Rodriguez A, Albasanz JL, Martín M, Ferrer I (2007) Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease. *Neurosci Lett* 423:194–199. doi:10.1016/j.neulet.2007.06.049

30. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100:95–97. doi:10.1016/0003-2697(79)90115-5
31. Díaz-Hernández M, Gómez-Ramos A, Rubio A, Gómez-Villafuertes R, Naranjo JR, Miras-Portugal MT, Avila J (2010) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J Biol Chem* 285:32539–32548. doi:10.1074/jbc.M110.145003
32. Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E (2010) A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron* 65:585–596. doi:10.1016/j.neuron.2010.02.014
33. Weinberger DR (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44:660–669. doi:10.1001/archpsyc.1987.01800190080012
34. Ena SL, De Backer JF, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A (2013) FACS array profiling identifies ecto-5' nucleotidase as a striatopallidal neuron-specific gene involved in striatal-dependent learning. *J Neurosci* 33:8794–8809. doi:10.1523/JNEUROSCI.2989-12.2013
35. Braun N, Sévigny J, Robson SC, Enjoji K, Guckelberger O, Hammer K, Di Virgilio F, Zimmermann H (2000) Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain. *Eur J Neurosci* 12:4357–4466. doi:10.1111/j.1460-9568.2000.01342.x
36. Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sévigny J, Braun N (2005) Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal* 1:259–270. doi:10.1007/s11302-005-6314-x
37. 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* 17:1355–1364. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02567.x
38. Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sévigny J (2004) Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 43:5511–5519. doi:10.1021/bi0362222
39. Brun-Heath I, Ermonval M, Chabrol E, Xiao J, Palkovits M, Lyck R, Miller F, Couraud PO, Mornet E, Fonta C (2011) Differential expression of the bone and the liver tissue non-specific alkaline phosphatase isoforms in brain tissues. *Cell Tissue Res* 343:521–536. doi:10.1007/s00441-010-1111-4
40. Négyessy L, Xiao J, Kántor O, Kovács GG, Palkovits M, Dóczi TP, Renaud L, Baksa G, Glasz T, Ashaber M, Barone P, Fonta C (2011) Layer-specific activity of tissue non-specific alkaline phosphatase in the human neocortex. *Neuroscience* 172:406–418. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.049
41. Kretzschmar H (2009) Brain banking: opportunities, challenges and meaning for the future. *Nat Rev Neurosci* 10:70–78. doi:10.1038/nrn2535
42. Ferrer I, Martínez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M (2008) Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank* 9:181–194. doi:10.1007/s10561-008-9077-0
43. Albasanz JL, Dalfó E, Ferrer I, Martín M (2005) Impaired metabotropic glutamate receptor/phospholipase C signaling pathway in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies correlates with stage of Alzheimer's-disease-related changes. *Neurobiol Dis* 20:685–693. doi:10.1016/j.nbd.2005.05.001
44. Albasanz JL, Rodríguez A, Ferrer I, Martín M (2006) Adenosine A2A receptors are up-regulated in Pick's disease frontal cortex. *Brain Pathol* 16:249–255. doi:10.1111/j.1750-3639.2006.00026.x
45. Monoranu CM, Grünblatt E, Bartl J, Meyer A, Apfelbacher M, Keller D, Michel TM, Al-Saraj S, Schmitt A, Falkai P, Roggendorf W, Deckert J, Ferrer I, Riederer P (2011) Methyl- and acetyltransferases are stable epigenetic markers postmortem. *Cell Tissue Bank* 12:289–297. doi:10.1007/s10561-010-9199-z
46. Puig B, Viñals F, Ferrer I (2004) Active stress kinase p38 enhances and perpetuates abnormal tau phosphorylation and deposition in Pick's disease. *Acta Neuropathol* 107:185–189. doi:10.1007/s00401-003-0793-z
47. Rodríguez A, Martín M, Albasanz JL, Barrachina M, Espinosa JC, Torres JM, Ferrer I (2006) Adenosine A1 receptor protein levels and activity is increased in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-PrP mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:964–975. doi:10.1097/01.jnen.0000235120.59935.f5
48. Ferrer I (2012) Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Progr Neurobiol* 97:38–51. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.03.005
49. Vardy ER, Kellett KA, Cocklin SL, Hooper NM (2012) Alkaline phosphatase is increased in both brain and plasma in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 9:31–37. doi:10.1159/000329722
50. Delaney SM, Geiger JD (1998) Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 285:568–572
51. Seibt KJ, Oliveira Rda L, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD (2009) Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicol In Vitro* 23:78–82. doi:10.1016/j.tiv.2008.10.003

AGRAÏMENTS

“If you can dream it, you can do it”

Walt Disney

AGRAÏMENTS

No sé si riure o plorar. Vaig a escriure els agraïments. Això vol dir que ja està. Que ja queda poc. Que aviat seré doctora (OMG!). Que això s'acaba... S'acaba una etapa i en comença una altre. Agafo una motxilla i l'ompló de records, emocions, moments, confidències, alegries, riures, plors, dinars, sopars, viatges, congressos, articles, experiments, experiències, amics, companys, UNA TESI DOCTORAL, i un llarg etcètera que engloba tot el que ha implicat el meu pas durant 6 anys pel laboratori 4145. La carrego a l'esquena i, amb ella, tanco una porta i n'obro una altre, que espero m'ofereixi moltes més coses per posar a la meva motxilla.

Arribats a aquest punt, voldria expressar el més sincer agraïment a totes aquelles persones que, d'alguna o altra manera, m'han acompanyat durant aquest llarg viatge. Sense elles, ben segur, no hagués estat possible la realització d'aquesta tesi doctoral.

A la **Dra. Mireia Martín Satué**, directora de la Tesi, per confiar en mi i donar-me l'oportunitat de realitzar la Tesi doctoral al seu costat i poder forma part d'un projecte d'investigació, el qual he sentit meu des de l'inici. No puc passar per alt la dedicació i el suport ni la confiança que m'ha transmès. Gràcies per ensenyar-me, de la teva mà, la ciència i a fer ciència. Per tot això, i molt més, t'estaré sempre molt agraïda. Has estat, sense dubte, la millor directora de Tesi que hagués pogut tenir.

Als especialistes del servei d'Anatomia Patològica i de Ginecologia de l'Hospital Universitari de Bellvitge que han participat en aquest projecte. En especial, al **Dr. August Vidal**, per ensenyar-me la histologia i la histopatologia de l'endometri. Per estar sempre disposat a col·laborar, ajudar i donar bons consells.

A la **Dra. Laura Teixidó**, per dur a terme els experiments de genètica molecular inclosos en aquest treball. Sense la teva col·laboració encara estaria fent PCRs!

Al **Dr. Joan Blasi**, per estar sempre disposat a escoltar els meus problemes tècnics amb els experiments i ajudar-me a resoldre'ls. Pels excel·lents i savis consells. A tots els laboratoris hi hauria d'haver un professional com tu!

A l'**Inmaculada Gómez de Aranda**, per ensenyar-me els mètodes experimentals que he aplicat en aquesta recerca (al final, era ella qui em preguntava pels protocols). Al teu costat, també, he après a fer "tecnologia punta", posar l'autoclau i el "rentaprovetes i gots de precipitats", fer solucions i tot el relacionat amb el manteniment d'un laboratori. No deixis mai d'aportar l'alegria i el bon humor al laboratori.

Al **Dr. Benjamín Torrejón** (de Ardoz), dels Serveis Científics i Tècnics de la Universitat de Barcelona, per introduir-me en el món de la microscòpia confocal. Per ensenyar-me a calibrar les imatges, a posar les barres d'escala, a fer el *merge* de les imatges i tot el relacionat amb el programa LCS Lite i ImageJ. Gràcies per fer-me riure entre captura i captura i pels bons moments viscuts a la "Baticueva".

Al **Dr. Jean Sévigny** i tot el seu equip, així com al grup del **Dr. Marçal Pastor-Anglada**, per cedir-nos alguns dels anticossos utilitzats en aquesta Tesi.

Al **Dr. Carles Solsona**, per transmetre'm la seva passió per la ciència i per venir cada dia amb bon humor al laboratori.

No poden faltar totes les **pacients** que han participat en aquest estudi. Evidentment, sense la seva col·laboració gran part d'aquesta Tesi no hagués estat possible. Una part de vosaltres forma part de la ciència.

A la **Dra. Marta Barrachina**, per donar-me l'oportunitat de col·laborar amb ella i el seu equip. T'estic molt agraïda. **Izaskun**, los homogenados de tejido no hubieran salido tan bien si no hubiera tenido una maestra como tú. Ha estat un plaer treballar amb vosaltres.

També voldria expressar la meva gratitud a tots els **companys de laboratori**. Als primers que vaig tenir, l'Ezequiel, la Laura i la Carme, per fer-me sentir una més des del primer dia. Al Jonathan, per ajudar-me amb els protocols i fer-me riure constantment. Al Paolo, per ser el millor company de despatx i un bon amic. Als meus antics companys del 4112, la Priscil·la i el David, i als actuals, l'Esther, el David Soto, la Natasha, l'Artur i la Beatrice, per les divertides converses a l'hora de l'esmorzar i el dinar i per donar-me ànims en tot moment. Molt especialment, vull donar les gràcies als que han esdevingut els meus amics al llarg de tots aquests anys. A l'Anna, pels bons moments i pels inoblidables viatges. Al Francisco, Fran, per ser tan bona persona i fer-me plorar de riure cada dia. Fran, por si no me has oído, que te quiero mucho y que no cambies nunca! A l'Helena, per venir cada dia amb molta energia al laboratori i portar pastissos boníssims per esmorzar, i sobretot, per les interessants converses al cotxe. A la Cris, Cristinete, per tot el que hem rigut, xerrat, i viscut juntes (i el que ens queda!). M'emporto moltes anècdotes divertides de les quals en sou els protagonistes.

Als companys de la quarta i cinquena planta, especialment a la Mireia, que m'acompanya des de la carrera.

No puc oblidar les persones que formen part de la meva vida extraacadèmica. A l'**Amparo**, que durant tots aquests anys m'ha acompanyat en els bons i sobretot en els mals moments i ha sabut

escoltar-me, ajudar-me i aconsellar-me. Gràcies a la seva ajuda i a les seves gotes màgiques he sabut com superar els obstacles que m'han anat sorgint.

A les meves amigues, les **Nenes**, per ser les millors dels món, per estar sempre al meu costat i donar-me suport i ànims. Per tenir sempre una excusa per veure'ns. Per les hores de teràpia (impagables). I a tots els **Golf@s**, per fer-me feliç cada dia.

Al **Luís**, gràcies per estimar-me tant, i per ser tant pacient i comprensiu aquests darrers mesos (sé que no t'ho he posat gens fàcil!).

Finalment, agraeixo a tota la meva **família** els apreciats ànims que sempre m'han donat. Agraeixo als meus **pare**s l'ajuda i l'estimació que m'han ofert durant tots aquests anys, i molt especialment agraeixo a la meva **germana**, la Cristina, tots els reconfortants ànims, els valuosos consells i el suport incondicional que m'ha atorgat. Has sigut i seràs, sempre, el meu millor exemple a seguir. De la teva mà seguiré caminant per la vida.

A tots, gràcies.