

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

IMPLICACIONES FUNCIONALES DEL PERICITO EN LA RESPUESTA INMUNE  
Y EN ANGIOGÉNESIS. IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES MARCADORES  
PREDICTIVOS DE RESPUESTA A TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS.

Irene Guijarro Muñoz

Madrid, 2013



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

IMPLICACIONES FUNCIONALES DEL PERICITO EN LA RESPUESTA INMUNE  
Y EN ANGIOGÉNESIS. IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES MARCADORES  
PREDICTIVOS DE RESPUESTA A TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS.

Irene Guijarro Muñoz  
Licenciada en Bioquímica

DIRECTORES:  
DR. LUIS ÁLVAREZ VALLINA  
DRA. LAURA SANZ ALCOBER

UNIDAD DE INMUNOLOGÍA, HOSPITAL PUERTA DE HIERRO,  
MAJADAHONDA, MADRID



El Dr. Luis Álvarez Vallina, Jefe de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y Profesor Honorario del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y la Dra. Laura Sanz Alcober, Investigadora de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **Implicaciones funcionales del pericito en la respuesta inmune y en angiogénesis. Identificación de potenciales marcadores predictivos de respuesta a terapias antiangiogénicas**, que presenta IRENE GUIJARRO MUÑOZ para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y reúne las condiciones de calidad, contenido y forma flexibles para ser presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Majadahonda a 07 de Octubre de 2013.

Dr. Luis Álvarez Vallina  
Director de Tesis

Dra. Laura Sanz Alcober  
Directora de Tesis









Los pericitos son células murales de soporte que estabilizan los capilares maduros, a los que se ha atribuido tradicionalmente un papel estructural. El análisis comparativo de los perfiles transcripcionales de pericitos y células progenitoras mesenquimales, estrechamente relacionados desde el punto de vista ontogénico, permitió identificar una serie de genes cuya expresión era mayor en pericitos, *TLR4* y *ROBO4* entre ellos. TLR4 es un receptor clásico asociado con la respuesta inmune innata, cuyo papel en pericitos humanos no había sido previamente documentado. En este trabajo hemos demostrado la expresión de TLR4 en la superficie de pericitos humanos y caracterizado su respuesta a LPS y HMGB1, que da lugar a la secreción de diferentes componentes proinflamatorios y a la sobreexpresión de moléculas de adhesión. Los pericitos expresan proteínas asociadas con la respuesta a LPS como MD-2 y MyD88, y la cascada de señalización implica la activación de la vía NF- $\kappa$ B. En conjunto, estos resultados demuestran que los pericitos desempeñan un papel activo en la respuesta inflamatoria, más allá de su función homeostática.

Por su parte, *ROBO4* codifica una molécula de guía axonal que reconoce ligandos de la familia Slit. Se acepta que tanto neuronas como células endoteliales pueden responder a este tipo de moléculas modulando su capacidad migratoria, pero su expresión en pericitos no se había estudiado. En este trabajo determinamos que los pericitos humanos expresan en su membrana receptores Robo, a los que se une Slit2, y que esta unión da lugar a una inhibición de la migración de los pericitos, independiente de la activación del receptor PDGFR $\beta$ . Dado que las células endoteliales expresan Slit2, estos resultados pueden aportar una nueva perspectiva de las complejas interacciones pericito-célula endotelial durante el proceso angiogénico.

Dado el importante papel de las moléculas de guía axonal en el proceso angiogénico, parecía probable que su expresión pudiera modular la respuesta a determinados agentes antiangiogénicos. El descubrimiento de biomarcadores predictivos de respuesta ayudaría a seleccionar los pacientes susceptibles de beneficiarse de este tipo de tratamientos. En este trabajo hemos analizado muestras de pacientes con cáncer de colon que habían sido tratados con bevacizumab, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF, y comprobamos que aquellos que tenían una elevada expresión del receptor de efrinas *EPHB4* tenían mayor probabilidad de no responder al tratamiento. A falta de su validación en una serie independiente, estos datos sugieren que *EPHB4* es un potencial biomarcador de respuesta al tratamiento con bevacizumab.



Pericytes are mural cells found stabilizing mature capillaries and traditionally endowed with structural functions. The comparison of pericytes and mesenchymal stem cells transcriptional profiles allowed us to identify a group of genes with higher expression in pericytes, including *TLR4* y *ROBO4*. TLR4 is a receptor associated with immune innate responses, whose role in human pericytes has not been documented yet. In this work we have confirmed the expression of TLR4 on the surface of human pericytes and characterized their response to LPS and HMGB1, which leads to secretion of proinflammatory mediators and overexpression of adhesion molecules. Pericytes express different proteins related with LPS response as MyD88 and MD-2, and the LPS signalling pathway involves the activation of NF- $\kappa$ B. Overall, these results demonstrate that pericytes can play an active role in the inflammatory response, beyond its homeostatic function.

Robo4 is an axonal guidance molecule that recognizes Slit ligands. It is accepted that both neurons and endothelial cells can respond to axonal guidance molecules modulating their migratory capacities, but their expression in pericytes had not been studied to date. In this work, we have assessed the expression of Robo receptors in human pericytes and their binding to Slit2. This binding resulted in migration inhibition, independently of PDGFR $\beta$  activation. Given that endothelial cells express Slit2, these results may provide new perspectives on the pericyte-endothelium interactions during angiogenesis.

Given that axon guidance molecules play an important role in angiogenesis, it seemed likely that their expression could modulate the response to antiangiogenic agents. The discovery of predictive biomarkers of response would help to select patients who could benefit from this treatment. In this work we have analyzed colon cancer samples from patient treated with the monoclonal anti-VEGF bevacizumab and assessed that patients who showed high expression of the ephrin receptor *EPHB4* were less likely to respond to the treatment. Although validation by independent groups is required, these data suggest that *EPHB4* is a potential biomarker for response to bevacizumab treatment.







<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>1. ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO .....</b>	<b>24</b>
<b>2. PERICITOS .....</b>	<b>26</b>
2.1. Introducción histórica.....	26
2.2. Morfología y distribución .....	26
2.3. Marcadores moleculares.....	27
2.4. Ontogenia .....	28
<b>3. PAPEL FUNCIONAL DEL PERICITO .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. PERICITO Y ANGIOGÉNESIS.....</b>	<b>28</b>
3.1.1. PDGFB y PDGFR $\beta$ .....	29
3.1.2. Angiopoyetina-1 y Tie-2.....	29
3.1.3. TGF $\beta$ .....	30
3.1.4. Esfingosina 1 fosfato (S1P) .....	30
3.1.5. Notch .....	30
3.1.6. Moléculas de guía axonal.....	31
3.1.6.1. Slits y receptores Robo.....	32
3.1.6.2. Efrinas y receptores de efrinas .....	32
3.1.6.3. Semaforinas, Plexinas y neuropilinas .....	33
3.1.6.4. Netrinas y sus receptores UNC-5 y DCC.....	34
<b>3.2. PERICITO Y SISTEMA INMUNE .....</b>	<b>35</b>
3.2.1. Inmunidad innata .....	35
3.2.2. Inmunidad adaptativa .....	37
<b>3.3. OTRAS FUNCIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>4. PAPEL DEL PERICITO EN PATOLOGÍA.....</b>	<b>38</b>
4.1. Pericitos y retinopatía.....	38
4.2. Pericitos y cáncer .....	39
4.2.1. Papel de los pericitos en la angiogénesis tumoral.....	39
4.2.2. Papel de los pericitos en la metástasis .....	40
<b>5. TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS EN CÁNCER.....</b>	<b>41</b>
5.1. Limitaciones de la terapia antiangiogénica .....	41
5.2. Biomarcadores predictivos de respuesta .....	42
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
1. ANTICUERPOS.....	49
2. LINEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS .....	50
3. CONDICIONES DE CULTIVO Y AISLAMIENTO.....	51
3.1. Aislamiento de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) .....	51
4. ESTUDIOS FENOTÍPICOS.....	51
5. CONSTRUCCIONES GÉNICAS Y TRANSFECCIONES .....	51
6. ESTUDIOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL.....	52
6.1. Aislamiento de ARN total .....	52
6.1.1. Aislamiento de ARN total de células en cultivo y tejidos congelados .....	52
6.1.2. Aislamiento de ARN total de tejidos parafinados .....	52
6.2. Síntesis de ADNc por transcripción reversa .....	52
6.2.1. Síntesis de ADNc a partir de ARN de células o de tejidos congelados .....	52
6.2.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN de tejidos parafinados .....	52
6.3. Microarrays de ADN .....	53
6.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) .....	53
6.4.1. Arrays de qRT-PCR .....	53
6.4.2. Validación de los resultados de los microarrays mediante qRT-PCR.....	53
7. ESTUDIOS DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS .....	55
7.1. Arrays de anticuerpos inmovilizados en membrana .....	55
7.2. Citometría de flujo .....	55
8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE Robo4 .....	55
9. TRANSFERENCIA <i>WESTERN</i> .....	55
10. ENSAYOS FUNCIONALES.....	56
10.1. Ensayos de adhesión.....	56
10.1.1. Adhesión de pericitos a Slit2 inmovilizado en placa .....	56
10.1.2. Bloqueo de la adhesión a Slit2 .....	56
10.1.3. Adhesión de células mononucleadas de sangre periférica a una monocapa de pericitos.....	56
10.2. Ensayos de reorganización del citoesqueleto de actina .....	57
10.3. Ensayos de migración celular ( <i>wound healing</i> ) .....	57
10.4. Estudios de inmunofluorescencia de NF- $\kappa$ B.....	57
10.5. Inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B y MAPK.....	58
11. MUESTRAS TISULARES Y DATOS CLINICO-PATOLÓGICOS .....	58
12. INMUNOHISTOQUÍMICA .....	58



13. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LOS MICROARRAYS .....	58
14. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS.....	59
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>1. PAPEL DEL PERICITO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA .....</b>	<b>62</b>
1.1. Comparación del fenotipo de pericitos y células progenitoras mesenquimales ...	62
1.2. Comparación del perfil transcripcional de pericitos y células progenitoras mesenquimales .....	63
1.3. Expresión del receptor TLR4 y su complejo de señalización en pericitos.....	65
1.4. Análisis del perfil transcripcional de pericitos estimulados con LPS .....	66
1.4.1. Microarrays de ADN .....	66
1.4.2. PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	69
1.5. Expresión génica de pericitos estimulados con HMGB1.....	69
1.6. Producción de citoquinas y quimioquinas en pericitos estimulados con LPS y HMGB1.....	69
1.7. Activación de NF-κB en pericitos tratados con LPS .....	71
1.7.1. Translocación nuclear de NF-κB .....	71
1.7.2. Inhibición de NF-κB .....	71
1.8. Activación de MAPK en pericitos tratados con LPS .....	73
1.8.1. Inhibición de MAPK.....	73
1.8.2. Detección de fosfo-p38 .....	73
1.9. Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en pericitos tratados con LPS .....	73
1.10. Adhesión de células mononucleadas de sangre periférica a pericitos tratados con LPS.....	74
<b>2. MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL EN PERICITOS Y SU PAPEL EN ANGIOGÉNESIS.....</b>	<b>75</b>
2.1. Expresión de receptores de la familia Robo en pericitos .....	75
2.1.1. PCR cuantitativa.....	75
2.1.2. Citometría de flujo.....	75
2.1.3. Inmunoprecipitación de Robo4 .....	75
2.2. Expresión de la familia Slit en pericitos y células endoteliales .....	76
2.3. Interacción de Slit2 con receptores de pericitos .....	77
2.3.1. Ensayos de adhesión celular .....	77
2.3.2. Citometría de flujo.....	77
2.4. Efecto funcional de Slit2 en pericitos.....	77
2.4.1. Efecto sobre la migración celular .....	77
2.4.2. Efecto sobre la reorganización del citoesqueleto de actina .....	79

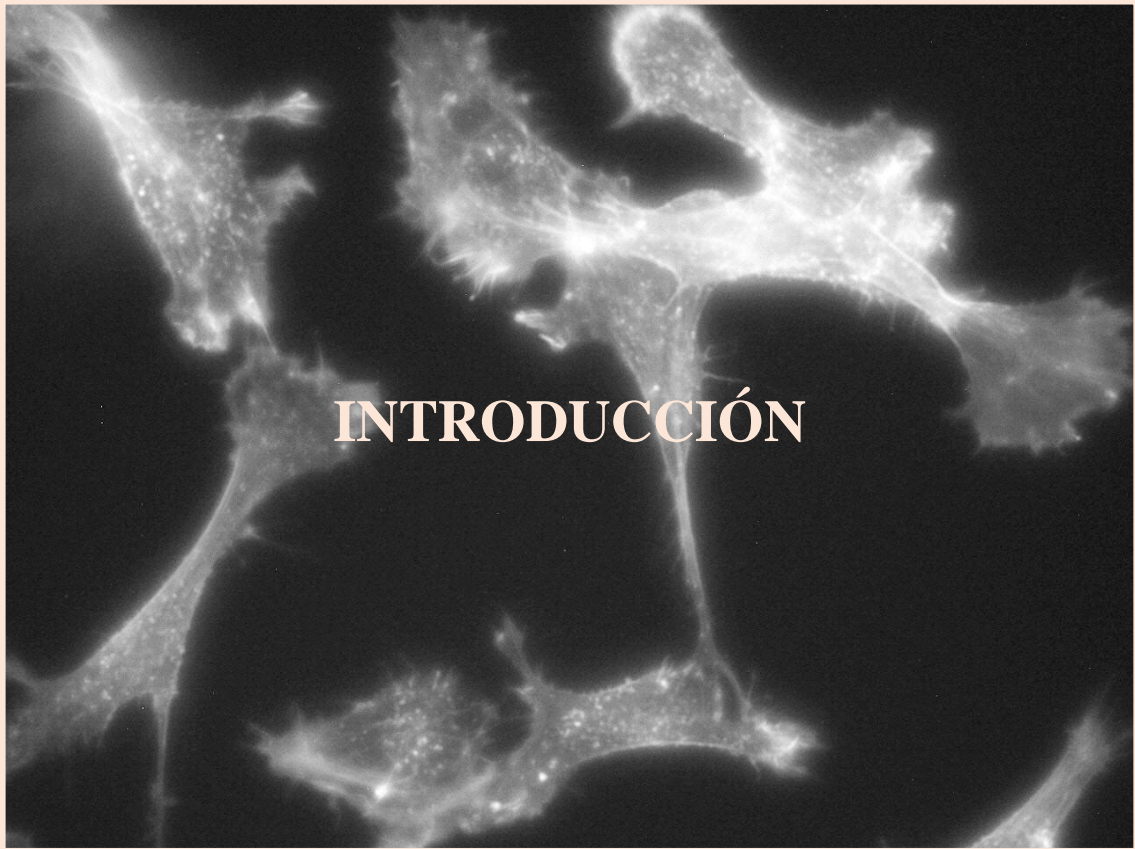
2.4.3. Efecto de Slit2 sobre la activación mediada por PDGFR $\beta$ .....	80
2.5. Receptores Robo implicados en los efectos mediados por Slit2 .....	80
3. Moléculas de guía axonal como biomarcadores de respuesta .....	81
3.1. Comparación del perfil transcripcional de muestras de pacientes respondedores y no respondedores mediante arrays de qRT-PCR .....	81
3.2. Asociación de EPHB4 con la respuesta terapéutica .....	82
3.3. Asociación de EPHB4 con supervivencia .....	83
3.4. Validación inmunohistoquímica de los arrays de qRT-PCR .....	84
3.5. Comparación del perfil transcripcional de muestras de tejido sano y tumoral ...	85
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>87</b>
1. PERICITOS, NUEVOS PARTICIPANTES EN LA RESPUESTA INMUNE .....	89
2. PERICITOS Y MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL, IMPLICACIONES EN UN CONTEXTO ANGIOGÉNICO .....	92
3. MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL COMO POTENCIALES BIOMARCADORES PREDICTIVOS.....	94
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>101</b>





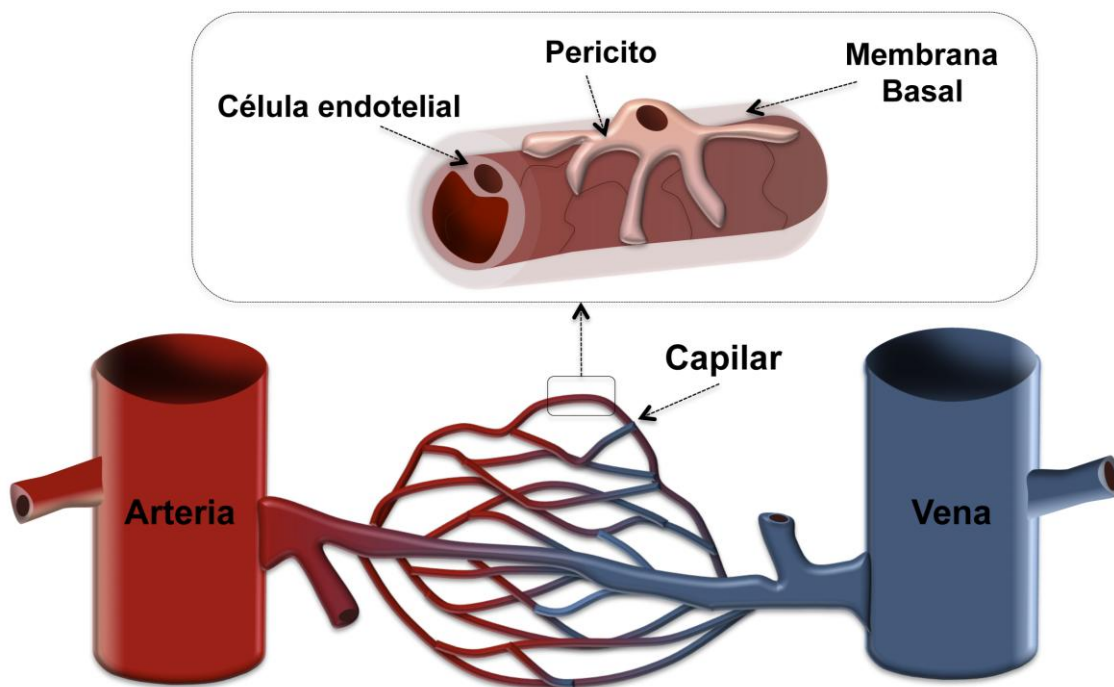
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
$\alpha$ SMA	Actina de músculo liso alfa (del inglés <i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i> )
AP	Fosfatasa alcalina (del inglés <i>Alkaline Phosphatase</i> )
ARN	Ácido ribonucleico
ASMC	Células arteriales de músculo liso (del inglés <i>Aortic Smooth Muscle Cells</i> )
ATCC	del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina (del inglés <i>Bovine Serum Albumine</i> )
<b>CCR</b>	Cáncer Colorrectal
CE	Célula endotelial
<b>DAMP</b>	Patrones moleculares asociados a daño molecular (del inglés <i>Damage-associated Molecular Pattern Molecules</i> )
DCC	Del inglés <i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (del inglés <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>FDR</b>	Estadístico que refleja la proporción esperada de falsos positivos (del inglés <i>False Discovery Rate</i> )
FFPE	Fijado con formaldehído y embebido en parafina (del inglés <i>Formalin Fixed Paraffin Embed</i> )
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
GO	Ontología génica (del inglés <i>Gene Ontology</i> )
<b>HCAEC</b>	Células endoteliales humanas de arteria coronaria (del inglés <i>Human Coronary Artery Endothelial Cells</i> )
HMGB1	Del inglés <i>High-Mobility Group Protein B1</i>
HUVEC	Célula endotelial de la vena del cordón umbilical (del inglés <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i> )
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión celular 1 (del inglés <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> )
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
<b>LBP</b>	Proteína de unión a LPS (del inglés <i>LPS Binding Protein</i> )
LPS	Lipopolisacárido (del inglés <i>Lipopolysaccharide</i> )
LRR	Repeticiones ricas en leucina (del inglés <i>Leucine Rich Repeats</i> )
<b>MAPK</b>	Proteínas activadas por mitógenos (del inglés <i>Mitogen-activated Protein Kinases</i> )
MB	Membrana basal
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MMP	Metaloproteinasas de matriz (del inglés <i>Matrix Metalloproteinases</i> )

<b>MSC</b>	Células progenitora mesenquimal (del inglés <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés <i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i> )
<b>NPN</b>	Neuropilina (del inglés <i>Neuropilins</i> )
<b>PAMP</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés <i>Pathogen-associated Molecular Patterns Molecules</i> )
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica (del inglés <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDGFB</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (del inglés <i>Platelet-Derived Growth Factor Beta</i> )
<b>PDGFRβ</b>	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (del inglés <i>Platelet-derived Growth Factor Receptor Beta</i> )
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PLX</b>	Plexinas (del inglés <i>Plexins</i> )
<b>qRT-PCR</b>	PCR cuantitativa (del inglés <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RECIST</b>	Criterio de evaluación de respuesta terapéutica en tumores sólidos (del inglés <i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i> )
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDHA</b>	Succinato deshidrogenasa A (del inglés <i>Succinate Deshydrogenase Complex, Subunit A, SDHA</i> )
<b>SMC</b>	Células de músculo liso (del inglés <i>Smooth Muscle Cells</i> )
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TLR</b>	<i>Toll Like Receptors</i>
<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>Transforming Growth Factor Beta</i> )
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> )
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión celular vascular 1 (del inglés <i>Vascular Cell Adhesion Protein 1</i> )
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>VEGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> )
<b>VSMC</b>	Células de músculo liso vasculares (del inglés <i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> )
<b>WB</b>	Transferencia <i>Western</i> (del inglés <i>Western Blot</i> )



## 1. ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO

El sistema circulatorio es el encargado de transportar los nutrientes y el oxígeno hacia los tejidos y de eliminar los residuos metabólicos, garantizando así el correcto funcionamiento de los mismos. Este sistema comienza a formarse en etapas tempranas del desarrollo embrionario por el proceso de vasculogénesis, definido como la formación de vasos sanguíneos *de novo* a partir de células precursoras denominadas angioblastos que migran y se diferencian en respuesta a señales locales (Risau, 1997) Posteriormente, gracias al proceso de angiogénesis, que consiste en la generación de nuevos vasos a partir de otros preexistentes, los vasos se ramifican y se extienden formando estructuras de mayor complejidad. Las células endoteliales (CE) que forman los vasos sanguíneos son prácticamente quiescentes y tienen una vida media prolongada en el individuo adulto. En los vasos maduros, las CE están rodeadas por células murales de soporte que las estabilizan, cuya naturaleza depende del tipo de vaso y de su localización anatómica (Jain, 2003). De esta manera, las células murales que se encuentran en los capilares y las vénulas poscapilares son los pericitos, mientras que en los vasos de mayor calibre se localizan las células de músculo liso (del inglés *Vascular Smooth Muscle Cells*, VSMC).

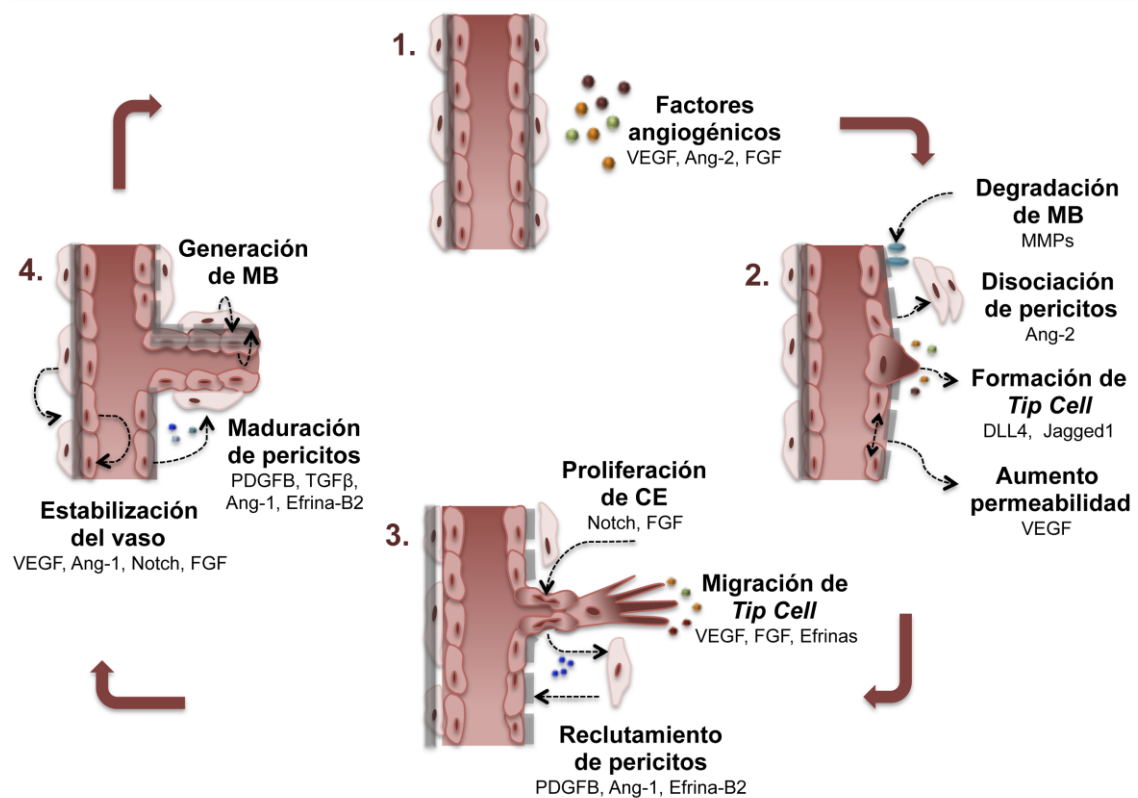


**Figura 1.** Los pericitos se sitúan rodeando a los capilares y vénulas. Se encuentran embebidos en la membrana basal en íntimo contacto con las CE.

A pesar de que los procesos angiogénicos están casi restringidos a etapas del desarrollo embrionario, se pueden producir episodios de neovascularización en el adulto en respuesta a



estímulos pro-angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), tanto en condiciones fisiológicas (curación de heridas, ciclo reproductivo femenino) como patológicas (crecimiento tumoral) (Hanahan y Weinberg, 2000; Hanahan y Folkman, 1996). En las fases iniciales del proceso angiogénico, los pericitos se disocian del endotelio y la membrana basal es degradada por la acción de metaloproteasas de matriz extracelular (del inglés *Matrix Metalloproteinases*, MMP) (Carmeliet y Jain, 2011). Las uniones entre las CE se hacen más débiles y se incrementa la permeabilidad de los vasos, permitiendo la extravasación de proteínas plasmáticas que constituyen una matriz provisional que facilita la migración de CE y pericitos (Nagy et al., 2012).



**Figura 2.** Etapas del proceso angiogénico. 1. Vaso sanguíneo quiescente. 2. Fase de activación. 3. Fase de elongación. 4. Fase de resolución/maduración.

Una CE (*tip cell*) es seleccionada para formar el extremo de crecimiento del brote vascular, mientras que las células adyacentes (*stalk cells* o células del tallo) proliferan para extenderlo. Los brotes vasculares se fusionan, se forma el lumen y se deposita una nueva membrana basal. Finalmente las CE vuelven a su estado quiescente y los pericitos son reclutados a los vasos (Benjamin et al., 1998).

## **2. PERICITOS**

### **2.1. Introducción histórica**

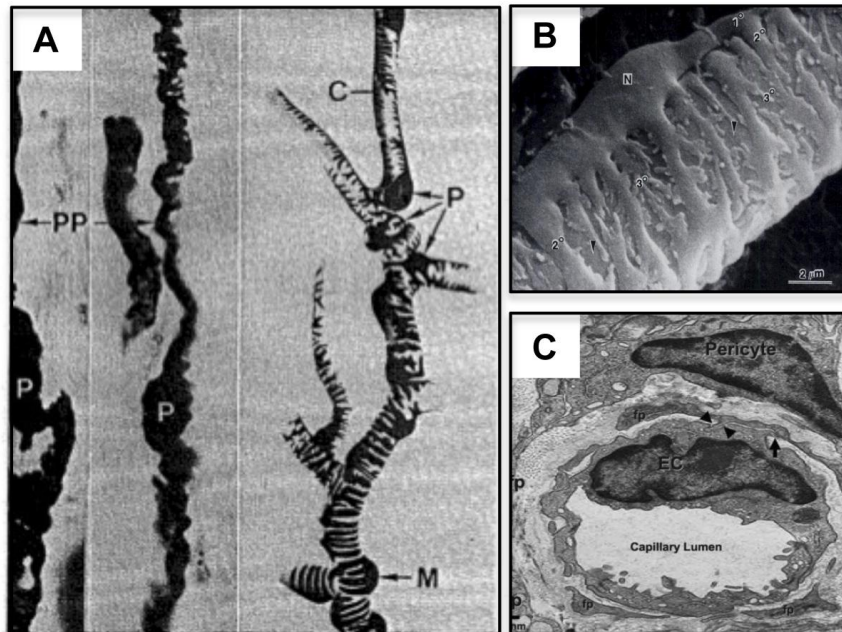
Los pericitos fueron descritos por primera vez en 1871 por Eberth, que los definió como células adventicias ramificadas localizadas en torno a los capilares sanguíneos (Eberth, 1871). Dos años más tarde, Rouget describió la existencia de unas células contráctiles no pigmentadas dispuestas en la pared de los capilares de la membrana hialoidea de la rana (Rouget, 1873, 1879). En 1922, Vimtrup realizó varios estudios sobre la capacidad contráctil de estas células en capilares de larva (Vimtrup, 1922) y posteriormente Krogh en 1929 utilizó el término “células de Rouget” para referirse a ellas (Krogh, 1929; Sims, 1986). Los primeros estudios de microscopía vinieron de la mano de Zimmermann en 1923 quien introdujo el término “pericito” y demostró su presencia alrededor de los capilares de numerosas especies. Igualmente, Zimmermann postuló que la permeabilidad capilar era modificada por la contracción de los pericitos. (Zimmerman, 1923). En 1927, Plenk consiguió demostrar la disposición de pericitos dentro de la membrana basal del capilar (Plenk, 1927).

Entre los años 20 y 60, numerosas publicaciones basadas en descripciones anatómicas con microscopía electrónica demostraron la presencia de pericitos en la microvasculatura (Bennett et al 1959, Cogan et al 1961). Los estudios morfológicos dieron paso a estudios funcionales gracias al desarrollo de los cultivos celulares (cocultivos de pericitos y CE) y al estudio *in vitro* de procesos de neovascularización. Más recientemente, el uso de ratones con deleciones en genes esenciales en la función vascular, así como el uso de anticuerpos bloqueantes han sido fundamentales para elucidar el papel funcional del pericito (Díaz-Flores et al., 2009).

### **2.2. Morfología y distribución**

Los primeros estudios de microscopía electrónica permitieron conocer la ultraestructura de los pericitos (Zimmermann 1923 y Weibel, 1974). Estas células se caracterizan por tener un núcleo grande y unas extensiones citoplasmáticas que se despliegan envolviendo al capilar por su cara abluminal y contactando con varias CE simultáneamente. La densidad de pericitos varía dependiendo del tipo de vaso y del tejido, siendo muy abundantes en el sistema nervioso central (ratio 1:1-3:1 entre CE y pericitos) y mucho más escasos en músculo esquelético (Díaz-Flores et al., 1991). Son ubicuos en los capilares sanguíneos, pero no se encuentran normalmente en los capilares linfáticos. Los pericitos están en contacto íntimo con las CE y se encuentran embebidos en la membrana basal vascular, forma especializada de matriz extracelular que es compartida y mantenida por ambos tipos celulares (Cohen et al., 1980; Mandarino et al., 1993; Stratman et al., 2009). En determinados puntos en los que la membrana basal se interrumpe, los pericitos y CE entran en contacto directo, habiéndose descrito hasta 1.000 contactos para una

sola CE, que pueden ser de diferente naturaleza. Así, se han descrito uniones estrechas tipo gap que conectan los citoplasmas de ambas células (Díaz-Flores et al., 2009; Larson et al., 1987); placas de adhesión que ayudan a la transmisión de las fuerzas mecánicas contráctiles y que están formadas por diferentes proteínas como N-caderinas,  $\beta$ -cateninas y fibronectina (Gerhardt y Betsholtz, 2003); y uniones del tipo *peg-socket* que consisten en una extensión del citoplasma del pericito (*peg*) que se inserta en una invaginación de la CE (*socket*) (Leeson, 1979).



**Figura 3.** Imágenes de pericitos obtenidas con microscopía electrónica. A) Fotografía y representación esquemática realizados por Zimmermman K. (1923) B) Imagen de microscopía de barrido de Sheprod D. (Shepro y Morel, 1993) C) Corte transversal de un capilar de Hayden M.R. (Hayden et al., 2008).

### 2.3. Marcadores moleculares

No existe ningún marcador molecular específico de pericitos, por ello para su identificación se utiliza generalmente una combinación de marcadores positivos y negativos que en su conjunto definen a este tipo celular. Dentro de los primeros, los más aceptados son PDGFR $\beta$ , NG2, aminopeptidasa N (CD13), actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA), y desmina (Armulik et al., 2005; Díaz-Flores et al., 2009; Krueger y Bechmann, 2010). PDGFR $\beta$  es un receptor tirosín-quinasa para PDGF que está implicado en el reclutamiento de pericitos durante el proceso angiogénico y del que trataremos más adelante. NG2 es un proteoglicano condroitín-sulfato expresado en la superficie de los pericitos durante los procesos de vasculogénesis y angiogénesis (Stallcup, 2002) que también participa en su incorporación a los vasos tumorales (Huang et al., 2010; Ruiter et al., 1993). Al mismo tiempo, los pericitos no expresan marcadores de estirpe hematopoiética y endotelial como CD45, CD31 y CD34. No hay que olvidar, sin

embargo, que la expresión de estos marcadores puede variar según el tejido y que además es dinámica: se puede alterar en determinadas situaciones tanto fisiológicas como patológicas, así como durante el cultivo *in vitro* (Armulik et al., 2011).

## **2.4. Ontogenia**

Está ampliamente aceptado que las CE derivan de un precursor mesodérmico denominado angioblasto (Carmeliet, 2004), pero el origen de los pericitos es más elusivo. Observaciones tempranas sugirieron que las células murales proceden de células mesenquimales (Jones et al., 1995). Pero así como las VSMC parecen bastante homogéneas en cuanto a su origen, los pericitos pueden originarse a partir de distintos linajes durante el desarrollo embrionario. En los procesos de vasculogénesis, las células murales pueden derivar de células progenitoras derivadas del mesodermo en órganos como hígado, intestino y pulmón (Asahina et al., 2011; Que et al., 2008; Wilm et al., 2005) o de células derivadas del neuroectodermo como sucede con los pericitos del sistema nervioso central (SNC) (Etchevers et al., 2001) o del timo (Foster et al., 2008; Müller et al., 2008). En los procesos angiogénicos del adulto su origen sigue siendo un tema controvertido, pudiendo derivar localmente de la proliferación de pericitos pre-existentes y/o de la diferenciación de células mesenquimales inmaduras. Alternativamente, podrían proceder de células de médula ósea que son reclutadas hacia el compartimento perivascular durante el proceso angiogénico (Rajantie et al., 2004).

Recientemente, varios trabajos han relacionado ontogénicamente los pericitos con las células progenitoras mesenquimales (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*, MSC). Las MSC son células multipotentes derivadas del mesodermo capaces de diferenciarse en numerosos tipos celulares como adipocitos, condroblastos y osteoblastos. Parece evidente que se haya propuesto a las MSC como precursoras de los pericitos (Dhar et al., 2010; Díaz-Flores et al., 2006; Ergün et al., 2011; Howson et al., 2005) pero resulta más intrigante la teoría inversa (Crisan et al., 2008), que identifica a las MSC con células perivasculares capaces de diferenciarse en tipos celulares como adipocitos (Brachvogel et al., 2005), mioblastos (Dellavalle et al., 2007), condrocitos (Farrington-Rock et al., 2004), osteoblastos (Canfield et al., 1996) y astrocitos (Göriz et al., 2011). De hecho, se ha postulado que la zona perivascular constituiría el nicho de las MSC en los tejidos del adulto (Da Silva Meirelles et al., 2008).

## **3. PAPEL FUNCIONAL DEL PERICITO**

### **3.1. PERICITO Y ANGIOGÉNESIS**

Los pericitos no solo son células de soporte de la estructura vascular sino que también contribuyen a la estabilización de los capilares, al mantenimiento de su homeostasis y a la remodelación y maduración de los mismos (Bergers y Song, 2005; Dore-Duffy y Cleary, 2011;

Gerhardt et al., 2003). La íntima relación anatómica de CE y pericitos sugiere una estrecha interacción mediante contactos celulares y a través de señalización paracrina y yuxtacrina. A continuación describiremos brevemente algunas de las interacciones moleculares más relevantes que tienen lugar entre la CE y el pericito.

### 3.1.1. PDGFB y PDGFR $\beta$

PDGFB (del inglés *Platelet-derived growth factor B*) es un miembro de la familia PDGF secretado por las CE que se une al receptor tirosín-quinasa PDGFR $\beta$  expresado en la superficie de pericitos. Cuando el ligando PDGFB se une a PDGFR $\beta$  éste dimeriza y pone en marcha una cascada de señalización intracelular que promueve proliferación y migración (Heldin y Westermark, 1999). En el caso de los pericitos, la expresión de PDGFB por parte del endotelio es clave para su reclutamiento hacia los vasos sanguíneos en formación. Así mismo y debido a que la expresión de PDGFB en el endotelio no es uniforme (las *tip cells* muestran una expresión mayor de PDGFB que las *stalk cells*), los pericitos son atraídos hacia los vasos en formación (Gerhardt et al., 2003). Los ratones *knockout* para PDGFR $\beta$  y PDGFB presentan fenotipos prácticamente idénticos y no llegan a término debido a la disfunción vascular consecuencia del déficit en el reclutamiento de células murales (Levéen et al., 1994; Soriano, 1994). Por otro lado, una mutación que produce la activación constitutiva de PDGFR $\beta$  promueve la proliferación aberrante e inhibe la diferenciación de las células murales en un modelo murino (Olson y Soriano, 2011).

### 3.1.2. Angiopoyetina-1 y Tie-2

Angiopoyetina-1 (Ang-1) es un ligando soluble producido por los pericitos (Sundberg et al., 2002) que se une al receptor tirosín-quinasa Tie-2 expresado por las CE (Dumont et al., 1993) y ciertas subpoblaciones de macrófagos y monocitos (De Palma et al., 2005). La interacción entre Ang-1 y Tie-2 es fundamental para la maduración y estabilización del endotelio (Falcón et al., 2009; Gaengel et al., 2009). De este modo, los ratones *knockout* para Ang-1 o Tie-2 no son viables debido a los defectos cardiovasculares que presentan (Dumont et al., 1993; Sato et al., 1995; Suri et al., 1996). Diversas mutaciones del gen que codifica para Tie-2 producen una forma hereditaria de malformación venosa que cursa con disminución de la cobertura de células murales (Vikkula et al., 1996). A la inversa, la administración exógena o la sobreexpresión de Ang-1 produce un aumento de la ramificación vascular y de la remodelación de vasos inmaduros para dar lugar a estructuras más organizadas (Thurston et al., 2005; Uemura et al., 2002). Por su parte, las CE expresan angiopoyetina-2 (Ang-2) que actúa como antagonista de Tie-2, inhibiendo la estabilización vascular mediada por Ang-1 y produciendo la disociación de los pericitos del vaso (Hammes et al., 2004). Estos estudios implican a Tie-2 en el

reclutamiento de pericitos, aunque en el adulto existen estudios contradictorios. Prueba de ello es que en ratones quiméricos con CE normales y células Tie2 negativas, los pericitos fueron reclutados también por el endotelio Tie-2 negativo (Jones et al., 2001). Por otro lado, la expresión de Ang-1 no parecía ser esencial para el mantenimiento de los vasos quiescentes en ratones adultos, aunque tiene un papel clave en la modulación de la respuesta a daño vascular (Jeansson et al., 2011).

### **3.1.3. TGF $\beta$**

TGF $\beta$  (del inglés *Transforming Growth Factor Beta*) es un factor de crecimiento expresado por CE y pericitos durante procesos de angiogénesis. Ambos tipos celulares expresan los receptores de TGF $\beta$ , Alk-1 y Alk-5, que parecen tener efectos diferentes o incluso opuestos (Goumans et al., 2003; Oh et al., 2000). La activación del receptor Alk-5 promovería la diferenciación de las células murales y la maduración de los vasos, mientras que la activación de Alk-1 favorecería su proliferación y migración, de ahí que el resultado final de la señalización mediada por TGF $\beta$  dependa de los niveles de expresión de ambos receptores (Goumans et al., 2002). En ratones *knockout* para diferentes genes que intervienen en la vía señalización de TGF $\beta$  (incluyendo *ALK1* y *ALK5*) se produce letalidad embrionaria por anomalías vasculares, entre ellas una cobertura defectuosa de células murales. Además, se han encontrado mutaciones en el gen *ALK1* en pacientes con telangiectasia hemorrágica hereditaria, un trastorno caracterizado por malformaciones vasculares (Berg et al., 1997; Gallione et al., 2004).

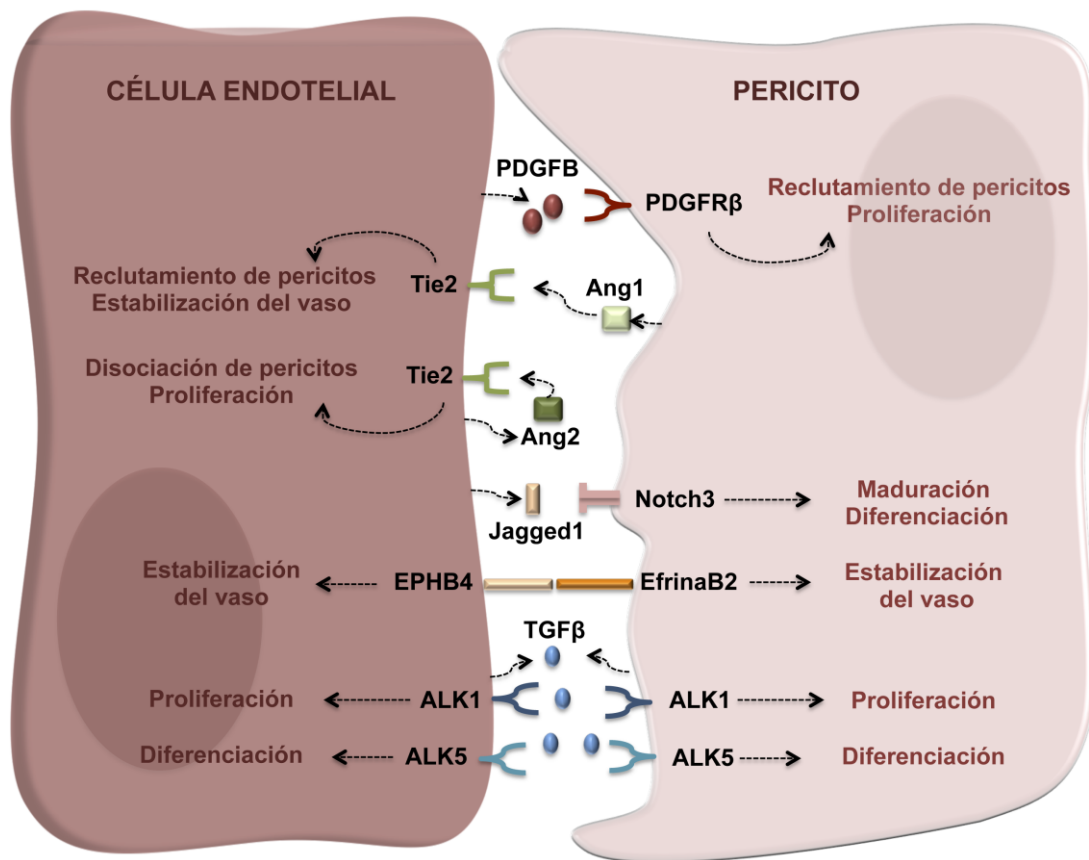
### **3.1.4. Esfingosina 1 fosfato (S1P)**

S1P es un esfingolípido producido por diferentes tipos celulares (plaquetas, eritrocitos, CE) que se une a los receptores acoplados a proteínas G EDG1-5 (Sanchez T 2004) y que modula funciones tanto de las propias CE como de las células murales. Los ratones *knockout* para *EDG1* no son viables debido a hemorragias masivas que se atribuyen a un defecto en el reclutamiento de pericitos a los vasos en formación (Allende et al., 2002; Liu et al., 2000). La activación de EDG1 en pericitos favorece su migración (Spiegel et al., 2003) y es fundamental para la estabilización de los vasos (Paik et al., 2004).

### **3.1.5. Notch**

En mamíferos, la familia Notch está formada por cuatro receptores (Notch1-4) a los que se unen cinco ligandos (DLL1, DLL3, Dll4, Jagged1 y Jagged2), siendo todos ellos proteínas transmembrana. Notch1 y Notch4 son los predominantes en el endotelio, mientras que las células murales expresan fundamentalmente Notch3. La señalización a través de Notch tiene un papel esencial en las CE controlando la excesiva ramificación vascular pero también juega un

papel relevante en las células murales. Los ratones *knockout* para Notch3 son viables pero presentan un patrón vascular anómalo debido a defectos en las células murales (Domenga et al., 2004). Además mutaciones en este gen dan lugar a al síndrome CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*), que se acompaña de degeneración focal de células murales (Joutel et al., 1996; Ruchoux et al., 1995). Más recientemente se ha demostrado, usando ARN de interferencia, que la diferenciación de los pericitos está regulada por la interacción entre Notch3 y el ligando Jagged1 expresado en la CE (Liu et al., 2009).



**Figura 4.** Mecanismos moleculares implicados en la interacción entre pericitos y CE.

### 3.1.6. Moléculas de guía axonal

Los vasos sanguíneos, al igual que los nervios, establecen circuitos funcionales de alta complejidad. Ambos se encuentran en estrecha vecindad y siguen rutas similares de migración durante el desarrollo embrionario, lo que sugiere que sus componentes celulares podrían responder a señales de “guía” comunes (Autiero et al., 2005; Carmeliet y Tessier-Lavigne, 2005). Así, de la misma forma que durante el desarrollo del sistema nervioso la migración de los axones depende del cono de crecimiento situado en su extremo distal, (Dickson, 2002; Huber et al., 2003; Tessier-Lavigne y Goodman, 1996), el extremo de los capilares en

crecimiento está constituido por *tip cells* que son las que determinan la formación de nuevos brotes vasculares (Gerhardt et al., 2003). Estas células, al igual que ocurre con el cono axonal en los nervios, son las encargadas de explorar el microambiente y de responder a las señales actuando como sensores, transductores y elementos de motilidad, capaces de dirigir el crecimiento del nuevo vaso (Lawson y Weinstein, 2002).

La existencia de moléculas de guía axonal fue propuesta por Ramón y Cajal en 1892 (Ramón y Cajal S, 1892) pero transcurrieron casi 100 años antes de que se demostrara la presencia de estos factores *in vitro* (Tessier-Lavigne et al., 1988). Estas moléculas, que pueden ejercer un efecto de atracción o de repulsión, activan diferentes vías de señalización en el citoplasma que afectan a la reorganización del citoesqueleto y modulan la migración celular (Keynes y Cook, 1995). A continuación resumiremos las características de las cuatro familias principales de moléculas de guía axonal que participan también en el proceso angiogénico (Fig. 5).

#### **3.1.6.1. Slits y receptores Robo**

La proteína Slit fue descrita originalmente en *Drosophila* como una proteína soluble implicada en el desarrollo embrionario del SNC (Rothberg et al., 1988). Robo, su receptor, fue también identificado en *Drosophila* al estudiar mutaciones que afectaban al proceso de guía axonal (Brose et al., 1999). Hasta la fecha se han descrito en mamíferos tres miembros de la familia Slit (Slit1-3) y cuatro componentes de la familia Robo (Robo1-4) (Legg et al., 2008). La expresión de estos receptores Robo y sus ligandos Slit no se limita al sistema nervioso, de hecho Robo1 es ubicuo y Robo4 se ha considerado clásicamente específico de endotelio (Huminiacki et al., 2002). La interacción entre Slit2 y Robo1 promueve angiogénesis y linfangiogénesis (Wang et al., 2003a; Yang et al., 2010b) pero el papel que juega Robo4 es más controvertido. Por un lado, parece ser esencial para el desarrollo vascular embrionario (Bedell et al., 2005), aunque en el adulto su activación por Slit2 inhibe la migración de las CE y la angiogénesis (Park et al., 2003b; Seth et al., 2005), estabilizando los vasos (Jones et al., 2008, 2009; Marlow et al., 2010). Otros estudios sugieren el efecto contrario: la señalización mediada por Robo4 promovería la migración y la formación de estructuras de tipo capilar (Kaur et al., 2006, 2008; Sheldon et al., 2009; Suchting et al., 2005). En lo que se refiere a las células murales, se ha documentado que Slit2 inhibe la migración de las VSMC de aorta humana (Liu et al., 2006) y de las vías respiratorias de rata (Ning et al., 2011). Sin embargo, no existen evidencias sobre la expresión de los receptores Robo en pericitos y de las consecuencias de su activación.

#### **3.1.6.2. Efrinas y receptores de efrinas**

Las efrinas se dividen en dos grupos: las efrinas tipo A (1-5), ancladas a la membrana vía glicosilfosfatidilinositol (GPI), que se unen indistintamente a los receptores EphA1-9, y las

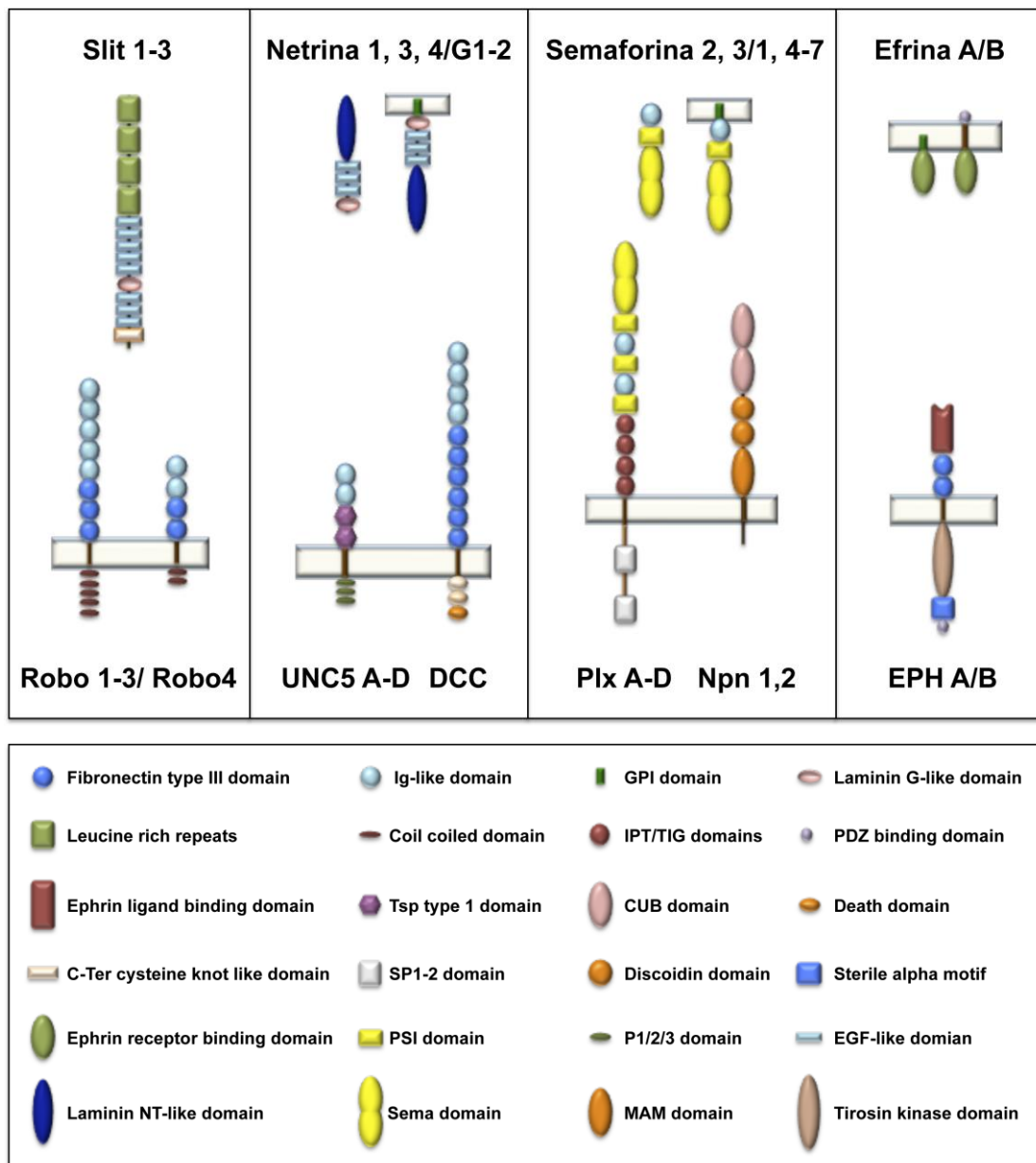


efrinas tipo B (1-3), con dominio transmembrana y por tanto con capacidad de señalización reversa, que se unen a los receptores EphB1-6 (Kullander y Klein, 2002; Pasquale, 2010). Además de sus funciones clásicas en el SNC (Yamaguchi y Pasquale, 2004), las efrinas controlan el desarrollo de la vasculatura. Un ejemplo es la pareja ligando-receptor efrinaB2/EphB4, que expresados en el endotelio, se encargan de controlar la diferenciación arterio-venosa durante el desarrollo embrionario así como la proliferación, la supervivencia y migración de las CE (Adams et al., 2001; Augustin y Reiss, 2003; Wang et al., 1998). El ratón *knockout* total para *EFRINAB2*, el *knockout* específico de endotelio, o la eliminación de su dominio citoplasmático producen defectos en la remodelación del plexo capilar (Adams et al., 2001; Wang et al., 1998). En el adulto, la efrinaB2 tiene un papel fundamental en el proceso angiogénico, ya que regula la internalización de VEGFR2 a nivel de la *tip cell*, necesaria para la señalización mediada por VEGF (Sawamiphak et al., 2010). Las efrinas y sus receptores también son relevantes en la biología de la celular mural. Ratones *knockout* para *EFRINAB2* específicos de las células murales dan lugar a capilares con un número normal de pericitos, pero que se asocian de forma defectuosa a las CE (Foo et al., 2006). Del mismo modo, el silenciamiento de *EFRINAB2* tanto en CE como en pericitos, impide el correcto ensamblaje e inhibe la formación de estructuras tipo capilar *in vitro* (Salvucci et al., 2009).

### **3.1.6.3. Semaforinas, Plexinas y neuropilinas**

Las semaforinas (Sema) constituyen una familia de proteínas secretadas o unidas a membrana (Gu y Giraud, 2013; Yazdani y Terman, 2006) identificadas como moléculas quimiorrepelentes en el desarrollo del SNC. Estas proteínas se unen a dos familias de receptores, las plexinas (Plx) y las neuropilinas (Npn). Las semaforinas de membrana se unen a las plexinas, mientras que la mayoría de las semaforinas tipo 3 secretadas lo hacen a complejos formados por neuropilinas y plexinas, con la excepción de Sema3E, que se une directamente a su receptor plexinaD1. La plexinaD1 se expresa de forma prominente en CE y es crucial para el desarrollo vascular (Gitler et al., 2004; Kim et al., 2011; Zhang et al., 2009; van der Zwaag et al., 2002).

En cuanto a las funciones de estas moléculas en las células murales se ha descrito tanto un aumento en el reclutamiento de pericitos a los vasos sanguíneos de los tumores que no expresan Sema3B (Capparuccia y Tamagnone, 2009) como una mayor presencia de pericitos en los vasos que sobreexpresan Sema3A (Maione et al., 2009).



**Figura 5.** Representación de las diferentes familias de receptores y ligandos de guía axonal.

### 3.1.6.4. Netrinas y sus receptores UNC-5 y DCC

Las netrinas son una familia de proteínas estructuralmente relacionadas con la laminina que pueden repeler o atraer a los axones durante el desarrollo del SNC (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996) y que también tienen un papel destacado en angiogénesis (Larrieu-Lahargue et al., 2012). Hasta la fecha se han identificado 5 tipos de netrinas, de las que tres de ellas (1, 3 y 4) son secretadas mientras que las otras dos (G1 y G2) permanecen unidas a la membrana plasmática mediante un anclaje GPI (Cirulli, NRCMB 2007), así como dos familias de receptores de netrinas, UNC5 (UNC5A-D) y DCC. UNC5B es el único receptor canónico para netrinas expresado en CE, y su inactivación produce un exceso de formación de filopodia en las

*tip cells* y de ramificación de los vasos (Lu et al., 2004). La activación de UNC5B por Robo4 inhibiría la señalización vía VEGF y por tanto el proceso angiogénico (Koch et al., 2011). En otro trabajo, la sobreexpresión de netrinal indujo el reclutamiento de células murales a los sitios de angiogénesis activa en un modelo de isquemia (Wilson et al., 2006).

### **3.2. PERICITO Y SISTEMA INMUNE**

El proceso inflamatorio depende del reclutamiento local de leucocitos circulantes a través de capilares y vénulas poscapilares constituidos por CE y pericitos. Ambos tipos celulares interactúan con las células inmunes infiltrantes durante el proceso de extravasación y modulan su respuesta a diferentes niveles. El potencial inmunoregulador de las CE está relativamente aceptado (Danese et al., 2007; Mai et al., 2013; Young, 2012) mientras que el de los pericitos apenas comienza a ser estudiado (Poerber y Tellides, 2012).

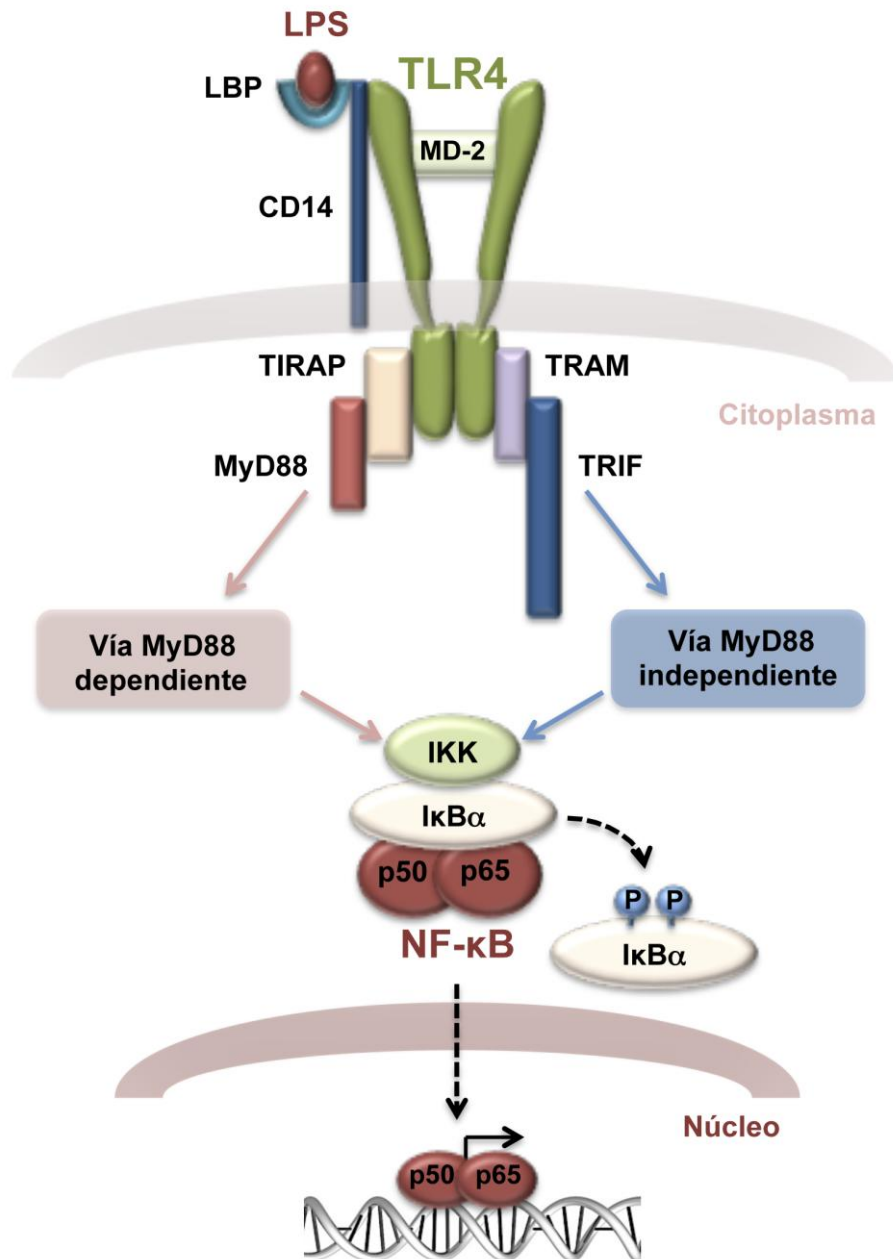
#### **3.2.1. Inmunidad innata**

En trabajos iniciales se atribuyeron a los pericitos propiedades fenotípicas y funcionales características de monocitos o macrófagos. De esta forma, se documentó la expresión en pericitos de rata de receptores Fc, receptores *scavenger* (CD163/ED2), integrina  $\alpha$ M (CD11b)/ $\beta$ 2 (receptor de complemento CR3) y MHC-II, así como su capacidad para realizar pinocitosis y fagocitosis *in vitro* e *in vivo* (Balabanov et al., 1996; Bergers y Song, 2005; Graeber et al., 1992; Mato et al., 1996; Thomas, 1999). Es más, se llegaron a considerar como células presentadoras de antígeno que participaban junto a los linfocitos en la primera línea de la respuesta inmune (Díaz-Flores et al., 2009). Estos hallazgos son actualmente objeto de controversia, ya que la población celular en estos estudios no estaba perfectamente caracterizada y no se puede descartar la contaminación con macrófagos perivasculares (Krueger y Bechmann, 2010).

Posteriormente, una serie de trabajos documentaron la respuesta a lipopolisacárido de bacterias Gram negativas (del inglés *Lipopolysaccharide*, LPS) de pericitos de pulmón de rata, con un incremento en la producción de IL-1 $\beta$ , HSP60 y HSP70 y un aumento de la permeabilidad vascular en un modelo *in vitro* (Edelman et al., 2006a, 2007a, 2007b). Del mismo modo, los pericitos de cerebro de ratón estimulados con LPS liberaban óxido nítrico y varias citoquinas y quimioquinas, incluyendo IL-1 $\alpha$ , IL-12, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Kovac et al., 2011).

Las respuestas celulares a LPS vienen mediadas por el receptor de membrana TLR4, perteneciente a la familia de receptores TLR (del inglés *Toll Like Receptors*) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*, PAMP) o a daño celular (del inglés *Damage-Associated Molecular Pattern* DAMP). Al primer grupo pertenecen productos bacterianos (como el LPS) o virales y al segundo grupo,

ligandos endógenos como la citoquina proinflamatoria HMGB1 (del inglés *High Mobility Group Protein 1*) (Park et al., 2004) o las proteínas HSP (del inglés *Heat Shock Proteins*) (Vabulas et al., 2001).



**Figura 6.** Activación del complejo TLR4 en macrófagos. El LPS se une a la molécula LBP (*LPS Binding Protein*) que facilita la asociación con CD14. Posteriormente se produce la transferencia de LPS al complejo formado por TLR4 y MD-2. TLR4 oligomeriza y recluta proteínas adaptadoras citoplásmicas a través de las vías MyD88 /TIRAP o TRIF/TRAM. Ambas vías producen la activación de la enzima IκB (IKK) que fosforila al complejo inhibidor IκBα, disociándolo y liberando a NF-κB (p50/p65), que migra al núcleo y se une a las regiones promotoras de una amplia variedad de genes.

La activación de TLR4 pone en marcha una cascada de señalización intracelular que activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que migra al núcleo y se une a regiones promotoras de un conjunto de genes que codifican para citoquinas, quimioquinas, inmunoreceptores, moléculas de adhesión, reguladores de apoptosis y moléculas de respuesta a estrés entre otros.

La expresión de TLR4 ha sido descrita en células del sistema inmune innato como monocitos, macrófagos y células dendríticas así como en subpoblaciones de células T, pero su expresión en otros tipos celulares está apenas documentada, exceptuando algunos tipos de células epiteliales y CE (Kumar et al., 2004; Lu et al., 2012; Zeuke et al., 2002). La activación del endotelio por LPS u otros estímulos pro-inflamatorios promueve la liberación de mediadores solubles y la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 que son claves en el reclutamiento y la extravasación de células inmunes a los sitios de inflamación (Danese et al., 2007). De la misma forma, una serie de trabajos muy recientes han demostrado que los pericitos facilitan la migración *in vivo* de los neutrófilos a través de las vénulas poscapilares de forma dependiente de ICAM-1 (Proebstl et al., 2012; Wang et al., 2012), y que los neutrófilos y los monocitos son “instruidos” por los pericitos con señales migratorias durante el proceso de extravasación (Stark et al., 2013).

### **3.2.2. Inmunidad adaptativa**

La ubicación estratégica de los pericitos les permite también establecer contacto íntimo con las células del sistema inmune adaptativo siendo capaces de modular su actividad (Pober y Tellides, 2012). Así, la sobreexpresión de VCAM-1 en respuesta a TNF $\alpha$  incrementa la adhesión de linfocitos T a pericitos (Verbeek et al., 1995). Menos conocido es el hecho de que los pericitos pueden expresar en su superficie ligandos de las familias B7 y TNF, que al unirse a los receptores correspondientes en los linfocitos T proporcionan señales de coestimulación (a través de CD28, CD40, CD137, OX40 o GITR, entre otros), o de inhibición (a través de CTLA-4 o PD1, entre otros) que regulan la respuesta inmune adaptativa (Maier y Pober, 2011; Pober y Tellides, 2012). Así, pericitos humanos de placenta disminuyen la proliferación de células T aloreactivas, efecto que se ve potenciado tras el tratamiento de los pericitos con IFN $\gamma$  (Maier y Pober, 2011). También se ha propuesto que los pericitos humanos de retina tienen un efecto inmunosupresor, por lo que su pérdida en la retinopatía diabética contribuiría a la apoptosis de las CE inducida por el proceso inflamatorio (Tu et al., 2011). En ambos trabajos, el efecto inmunomodulador de los pericitos se atribuye a la expresión de PD-L1, ligando inhibitorio para el receptor PD1. Un trabajo reciente apunta a que pericitos derivados de tumor, pero no los de tejido sano, influyen negativamente en la activación de linfocitos T CD4 $^{+}$  y promueven un estado de anergia, contribuyendo a la evasión tumoral de la respuesta inmune (Bose et al., 2013).

### **3.3. OTRAS FUNCIONES**

Se ha atribuido a los pericitos la capacidad de producir vasoconstricción o vasodilatación de los capilares, regulando por tanto el flujo sanguíneo (Rucker et al., 2000). Esta función la realizan gracias a la expresión de proteínas contráctiles como la actina de músculo liso,  $\alpha$ SMA (Herman et al., 1987), tropomiosina y miosina (Joyce et al., 1985). Además poseen receptores para sustancias vasoactivas como vasopresina (Van Zwieten et al., 1988), angiotensina II (Ferrari-Dileo et al., 1996) y endotelina 1 (Chakravarthy et al., 1992).

Los vasos sanguíneos del sistema nervioso central son los que tienen una mayor cobertura de pericitos en comparación con la vasculatura de otros órganos. Los pericitos en el cerebro regulan la homeostasis de la barrera hematoencefálica, donde se encuentran en contacto íntimo con las CE y los astrocitos (Bonkowski et al., 2011; Daneman et al., 2010; Kim et al., 2006). Además, son necesarios para la formación de la barrera hematoencefálica durante el periodo embrionario siendo responsables de la formación de uniones estrechas y el tráfico de vesículas entre las CE, afectando a la permeabilidad vascular (Daneman et al., 2010).

## **4. PAPEL DEL PERICITO EN PATOLOGÍA**

Como comentamos anteriormente, en el individuo adulto los procesos de angiogénesis fisiológica se restringen a la cicatrización y a fases concretas del ciclo reproductor femenino. Pero existen determinadas condiciones patológicas en las que los procesos de neovascularización aberrante contribuyen de forma decisiva a la patogenia de la enfermedad y en las que los pericitos juegan un papel fundamental.

### **4.1. Pericitos y retinopatía**

La retinopatía diabética es una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes. Un indicador temprano de desarrollo de la enfermedad es la pérdida de pericitos en la microvasculatura de la retina, que junto con un incremento de la permeabilidad vascular produce edema macular y oclusión capilar (Cai y Boulton, 2002). Los mecanismos moleculares que desencadenan la apoptosis de los pericitos en la retinopatía diabética no están bien establecidos, aunque existen trabajos que apuntan a los ejes Ang/Tie-2 (Feng et al., 2007) y PDGFB/PDGFR $\beta$  como factores esenciales en este proceso (Betsholtz, 2004). Tanto es así que los ratones *knockout* para el motivo C-terminal de retención de PDGFB en la matriz extracelular, que son viables, desarrollan retinopatía severa debido a la disminución del número de pericitos (Lindblom et al., 2003). Por otro lado, la inhibición farmacológica de la señalización de PDGFB/PDGFR $\beta$  promueve la apoptosis de los pericitos y un incremento de la angiogénesis en un modelo de retinopatía isquémica (Wilkinson-Berka et al., 2004).

## **4.2. Pericitos y cáncer**

El crecimiento tumoral y la formación de metástasis son procesos regulados estrechamente por las células presentes en el microambiente tumoral, como fibroblastos, células inmunes, CE y pericitos (Pietras y Ostman, 2010). El papel de las CE y pericitos en la angiogénesis tumoral está perfectamente determinado: el proceso angiogénico responde a la situación de hipoxia en el tumor y tiene como objetivo restaurar el suministro de oxígeno y nutrientes. Trabajos recientes demuestran que las CE pueden además modular diferentes aspectos de la biología de la célula tumoral *in vitro*, como proliferación, invasión y respuesta a mediadores inflamatorios, así como crecimiento tumoral y diseminación *in vivo* (Franses et al., 2011). El papel de los pericitos en este contexto no se ha empezado a estudiar hasta fechas recientes (Samaniego et al., 2013). Los efectos reguladores de las CE y células murales sobre las células tumorales trascienden su papel estructural, y abren nuevas perspectivas terapéuticas en oncología.

### **4.2.1. Papel de los pericitos en la angiogénesis tumoral**

La vasculatura tumoral es caótica e irregular y está caracterizada por la presencia de vasos desestructurados y mal organizados (Morikawa et al., 2002). Esta inestabilidad se ha atribuido frecuentemente a una reducción en el número de pericitos. A pesar de que la presencia de pericitos puede variar según el tipo de tumor (aumenta en carcinoma de páncreas y disminuye en glioblastoma en comparación con los tejidos normales respectivos) (Raza et al., 2010), en realidad se encuentran presentes en la mayoría de los tumores, aunque su asociación con el endotelio sea anómala. De hecho, diferentes estudios han demostrado que son imprescindibles para el mantenimiento de la vasculatura tumoral, al igual que sucede en los vasos normales, ya que el VEGF producido por el pericito es necesario para la supervivencia de la CE en ambos contextos (Darland et al., 2003). Un ejemplo de ello es que la inhibición de PDGF con un aptámero tiene como consecuencia directa la pérdida de pericitos y de forma secundaria la apoptosis de las CE, tanto en el modelo de carcinoma de pulmón de Lewis como en el modelo de cáncer pancreático RIP1-Tag2 (Sennino et al., 2007). Igualmente, el inhibidor de tirosín-quinasa imatinib (que inhibe PDGFR, c-ABL, BCR-ABL y c-Kit), utilizado como monoterapia, es capaz de disminuir la densidad microvascular y de inhibir el crecimiento en un modelo de linfoma (Ruan et al., 2013). Así mismo, los tumores inoculados en ratones *knockout* para el motivo de retención de PDGFB presentaban una reducción en el número de pericitos y defectos en su asociación con el endotelio dando lugar a un aumento del diámetro vascular y aparición de hemorragias en el tumor (Lindblom et al., 2003). Es interesante la observación de que la sobreexpresión de PDGFB en las células tumorales incrementaba la densidad local de pericitos, pero no su grado de unión al endotelio, sugiriendo que la expresión de PDGFB por parte de la CE es un requisito para la correcta asociación de los pericitos (Abramsson et al.,

2003). Por otro lado, la inhibición específica de PDGFR $\beta$  con un anticuerpo monoclonal en el modelo RIP1-Tag2 da lugar a la depleción de pericitos maduros y sus precursores en los vasos tumorales, produciendo dilatación vascular y apoptosis de las CE (Song et al., 2005). Teniendo en cuenta que la reducción del número de pericitos desestabiliza la vasculatura tumoral y la vuelve más sensible a determinados agentes antiangiogénicos (Pietras y Hanahan, 2005), se ha postulado como una estrategia terapéutica complementaria a la dirigida frente a la CE. De esta forma, la terapia combinada con inhibidores de VEGFR y PDGFR en el modelo RIP1-Tag2 era más eficaz que cada agente por separado (Bergers et al., 2003), aunque dada la escasa especificidad de estos inhibidores no se puede descartar que ese efecto se debiera a la implicación de otras vías de señalización (Armulik et al., 2011). El efecto de esta terapia combinada dependería de la fuente celular de VEGF: si es fundamentalmente el tumor y no el pericito, los tumores serían más resistentes al tratamiento anti-PDGF (Sennino et al., 2009).

En otro estudio, la combinación del anticuerpo anti-VEGF bevacizumab con un aptámero frente a PDGF demostró un efecto terapéutico superior al de bevacizumab utilizado como monoterapia en un modelo animal de cáncer de ovario (Lu et al., 2010). Existen sin embargo otros estudios preclínicos que no consiguen demostrar un incremento en la sensibilidad de la vasculatura tumoral al bloqueo de VEGF en ausencia de pericitos (Nisancioglu et al., 2010). De hecho, en un ensayo clínico en pacientes de carcinoma renal en el que se incorporó imatinib al tratamiento combinado de bevacizumab y el inhibidor anti-EGFR erlotinib, no se apreció ningún beneficio clínico con la inhibición de PDGF (Hainsworth et al., 2007).

#### **4.2.2. Papel de los pericitos en la metástasis**

La metástasis es un proceso complejo en el que la célula tumoral escapa del tumor primario viajando por el torrente circulatorio y estableciéndose en tejidos distantes. Una hipótesis interesante considera que la reducción del número de pericitos en los vasos tumorales podría aumentar su permisividad a la intravasación de células tumorales, promoviendo su diseminación hematogena (Gerhardt y Semb, 2008; Raza et al., 2010). De hecho, se ha demostrado la existencia de una correlación inversa entre el contenido en pericitos de los vasos tumorales y el número de metástasis en pacientes con cancer colorectal (Yonenaga et al., 2005). Un efecto semejante se pudo observar en el modelo RIP1-Tag2, en el que la diseminación metastásica tanto en ganglios linfáticos locales como en órganos distantes se incrementaba en animales deficientes en PDGFB y por tanto en pericitos (Xian et al., 2006). Y a la inversa, en un modelo de cáncer de próstata se observó que los tumores con mayor contenido en pericitos en torno a sus vasos presentaban menor número de metástasis (Welén et al., 2009). Como era esperable a la luz de estos datos, la eliminación de pericitos como estrategia antitumoral ha tenido un efecto indeseado en varios modelos preclínicos: el aumento de la capacidad metastásica del tumor (Hosaka et al., 2013; Raza et al., 2010). En un estudio con pacientes de



cáncer de mama invasivo, se demostró que un número reducido de pericitos en los vasos tumorales se asociaba, no solo con un mayor número de metástasis, sino también con una disminución de la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global (Cooke et al., 2012). En este mismo trabajo se documentó que el tratamiento con ganciclovir de ratones que portan el gen suicida timidín-quinasa bajo el control transcripcional de los promotores NG2 o PDGFR $\beta$  lo que supone una disminución efectiva de pericitos, reducía el crecimiento de los tumores primarios pero incrementaba el número de metástasis.

Los pericitos no solo intervienen en las etapas iniciales de la metástasis sino que además podrían favorecer la colonización de las células metastásicas en sus tejidos diana, al menos en lo que a las metástasis hepáticas se refiere. Los pericitos del hígado, que constituyen un subtipo especializado y se denominan células estelares o de Ito, son activados y reclutados por las células tumorales y parecen contribuir a la implantación de micrometástasis avasculares gracias a la producción de factores angiogénicos (Olaso et al., 1997).

En definitiva, se requieren más estudios para evaluar los riesgos y los beneficios de la eliminación de pericitos como futura estrategia antitumoral con aplicación clínica.

## **5. TERAPIAS ANTIANGIOGÉNICAS EN CÁNCER**

### **5.1. Limitaciones de la terapia antiangiogénica**

Las terapias antiangiogénicas aprobadas para uso clínico en cáncer están dirigidas en su mayoría al bloqueo de la señalización mediada por VEGF. Estos agentes antiangiogénicos incluyen el anticuerpo monoclonal anti-VEGF bevacizumab y diversos inhibidores de tirosín-quinasa de amplio espectro, algunos de los cuales incluyen entre sus dianas a VEGFR y PDGFR, como sorafenib, sunitinib y pazopanib. Estos fármacos se utilizan fundamentalmente para el tratamiento de neoplasias metastásicas administrados como monoterapia o combinados con quimioterapia, como es el caso de bevacizumab. Sin embargo, los resultados clínicos muestran escasos beneficios en la supervivencia global, a pesar de que inicialmente se postuló que las terapias antiangiogénicas no crearían resistencias al tener como diana la CE, genéticamente estable en comparación con las células tumorales. La realidad es que en numerosas ocasiones los pacientes presentan resistencia intrínseca o adquirida al tratamiento. En estos casos el microambiente tumoral juega un papel determinante y el tratamiento antiangiogénico puede aumentar la agresividad y la capacidad metastática del tumor, al menos en modelos preclínicos (Ebos et al., 2009; Pàez-Ribes et al., 2009). Las causas de esta resistencia pueden ser diversas: por un lado, la hipoxia producida o incrementada como consecuencia de la terapia antiangiogénica puede poner en marcha mecanismos compensatorios, como la producción de factores de crecimiento alternativos a VEGF, tales como FGF, efrinas A1 y A2 y angiopoyetina 1, tanto por parte tanto del tumor como por las células del estroma

(Bergers y Hanahan, 2008). Por otro lado, la hipoxia también produce el reclutamiento de diferentes tipos de células mieloides que contribuyen de forma activa a la producción de factores pro-angiogénicos (Moserle y Casanovas, 2013).

Aunque la eficacia de esta terapia pueda parecer modesta, hay que ponerla en el contexto de los tratamientos disponibles para tumores sólidos avanzados, cuyos resultados no son mucho más esperanzadores (Bergers y Hanahan, 2008). Resulta imprescindible avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a terapias antiangiogénicas para diseñar estrategias que incrementen su eficacia, así como la identificación de biomarcadores de respuesta a dichos tratamientos que permitan seleccionar a los pacientes con más probabilidad de obtener un beneficio clínico.

## **5.2. Biomarcadores predictivos de respuesta**

Los biomarcadores son indicadores moleculares objetivos de un proceso biológico normal o patológico, o de la respuesta farmacológica a un determinado tratamiento (De Gruttola et al., 2001). En oncología se utilizan básicamente los biomarcadores pronósticos y los predictivos de respuesta. Los biomarcadores pronósticos aportan una estimación del curso de la enfermedad sin tener en cuenta el tipo de tratamiento (Wehland et al., 2013). Por su parte, los marcadores predictivos proporcionan información acerca del beneficio terapéutico que el paciente puede obtener de un tratamiento concreto (Oldenhuis et al., 2008). Si bien ha habido avances en el desarrollo de biomarcadores pronósticos en tumores sólidos, no ha sido así en lo que se refiere a la identificación de biomarcadores predictivos (Alymani et al., 2010). A pesar de la utilidad manifiesta que tendrían los biomarcadores de respuesta a las terapias antiangiogénicas en cáncer, no hay ninguno validado para su uso clínico hasta la fecha. Aunque la expresión de VEGF, de sus receptores o de moléculas implicadas en su vía de señalización serían los candidatos obvios en las terapias anti-VEGF, no se ha podido establecer una correlación entre sus niveles y el éxito del tratamiento (Jubb et al., 2006). Por tanto, la identificación de biomarcadores de respuesta a terapias antiangiogénicas sería de gran utilidad para poder seleccionar a los pacientes más susceptibles de beneficiarse del régimen terapéutico y asegurar al resto una terapia alternativa que pueda resultar más efectiva.





El objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento de las interacciones moleculares que se producen entre los componentes celulares de los vasos sanguíneos, en concreto entre las células endoteliales y los pericitos, en procesos tanto fisiológicos como patológicos y valorar su potencial aplicación como dianas terapéuticas o biomarcadores. Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- I. Estudiar el transcriptoma de pericitos humanos para identificar genes de alta expresión que puedan desempeñar un papel en su interacción con células endoteliales o con células del sistema inmune.
- II. Validar los datos obtenidos mediante qRT-PCR y realizar estudios a nivel de proteína de moléculas relevantes.
- III. Realizar estudios funcionales *in vitro*, para demostrar el efecto de dichas interacciones y estudiar las vías de señalización implicadas.
- IV. Valorar la potencial utilidad clínica de los datos anteriores utilizando muestras tisulares procedentes de pacientes.









## 1. ANTICUERPOS

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se indican en las tablas I y II.

**Tabla I.** Anticuerpos monoclonales

Antígeno	Clon	Especie	Isotipo	Conjugación	Proveedor
$\beta$ actina	8226	Ratón	IgG <sub>1</sub>	-	Abcam
CD3 $\epsilon$	OKT3	Ratón	IgG <sub>2a</sub>	-	Janssen-Cilag
CD13	WM15	Ratón	IgG <sub>1</sub>	PE	BD Pharmingen
CD31	HEC/75	Ratón	IgG <sub>1</sub>	FITC	Immunotools
CD14	[7]	Ratón	IgG <sub>2a</sub>	-	Abcam
CD34	AC136	Ratón	IgG <sub>2a</sub>	FITC	Miltenyi Biotec
CD45	J33	Ratón	IgG <sub>1</sub>	FITC	Beckman Coulter
CD73	AD2	Ratón	IgG <sub>1</sub>	PE	BD Pharmingen
CD90	5E10	Ratón	IgG <sub>1</sub>	FITC	BD Pharmingen
CD105	SN6	Ratón	IgG <sub>1</sub>	PE	eBioscience
c-myc	9E10	Ratón	IgG <sub>1</sub>	-	Sigma-Aldrich
EPHB4	3D768	Ratón	IgG <sub>1</sub>	-	Invitrogen Life Tec.
His	34670	Ratón	IgG <sub>1</sub>	-	Qiagen
ICAM-1	1H4	Ratón	IgG <sub>2b</sub>	PE	Immunotools
MHC-I	Bu8	Ratón	IgG <sub>1</sub>	FITC	Serotec
MHC-I	W6/32	Ratón	IgG <sub>2a</sub>	-	eBioscience
NG2/MCSF	LHM-2	Ratón	IgG <sub>1</sub>	PE	R&D Systems
PDGFR $\beta$	PR7212	Ratón	IgG <sub>1</sub>	PE	R&D Systems
PDGFR $\beta$	Y92	Conejo	IgG	-	Abcam
Robo1	R5	Ratón	IgG	-	(Wang et al., 2003b)
Robo2	356001	Ratón	IgG <sub>1</sub>	-	R&D Systems
Robo4	265721	Ratón	IgG <sub>2b</sub>	-	R&D Systems
Robo4	265703	Ratón	IgG <sub>2a</sub>	-	R&D Systems
Tetra-His	34670	Ratón	IgG <sub>1</sub>	-	Qiagen
TLR4	HTA125	Ratón	IgG <sub>2a</sub>	-	Abcam
VCAM-1	STA	Ratón	IgG <sub>1</sub>	PE	Abcam

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina. Wang L: Lijing Wang, Vascular Biology Research Institute, Guangzhou, China.

**Tabla II.** Anticuerpos policlonales

Antígeno	Especie	Conjugación	Proveedor
$\beta$ actina	Conejo	-	Abcam
IgG conejo	Burro	IRDye800	Rockland Immunoc.
IgG conejo	Burro	IRDye700	Rockland Immunoc.
IgG ratón	Conejo	IRDye800	Rockland Immunoc.
IgG ratón	Conejo	IRDye700	Rockland Immunoc.
IgG ratón (Fab') <sub>2</sub>	Cabra	PE	Jackson Research
MD-2	Conejo	-	Abcam
MyD88	Conejo	-	Abcam
p38	Conejo	-	Santa Cruz Biotech.
Fosfo p38	Conejo	-	Cell Signalling Biotec.
Fosfo-PDGFR $\beta$ Tyr751	Conejo	-	Cell Signalling Biotec.
Robo4	Cabra	Biotina	R&D Systems

## 2. LINEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS

En la Tabla III se indican las líneas celulares y células primarias utilizadas.

**Tabla III.** Líneas celulares y células primarias

Línea celular	Proveedor (Referencia)	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo
HEK-293	ATCC (CRL1573)	Fibroblastos embrionarios de riñón	Humano	DMEM-C
Célula primaria	Proveedor	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo
HUVEC	Lonza	Células endoteliales de vena de cordón umbilical	Humano	EGM-2
Pericitos	ScienCell	Pericitos de vasculatura de cerebro	Humano	PM-C
MSC-UC	Inbiobank	Células progenitoras mesenquimales de cordón umbilical	Humano	DMEM-LG-C

ATCC: *American Type Culture Collection*. DMEM-C: DMEM-Completo, medio DMEM (Lonza) suplementado con 10% (vol/vol) de FCS (suero fetal bovino), 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de sulfato de estreptomycin. EGM-2: medio EBM-2 (Lonza) suplementado con un 2% (vol/vol) de FCS y un cóctel de factores de crecimiento endotelial (Lonza). PM-C: medio PM

suplementado con un 2% (vol/vol) de FCS y factores de crecimiento específicos (ScienCell). DMEM-LG-C: DMEM bajo en glucosa suplementado con un 2% (vol/vol) de FCS-MS (PromoCell), 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

### **3. CONDICIONES DE CULTIVO Y AISLAMIENTO**

Las células se cultivaron a 37 °C, 95% humedad y 5% CO<sub>2</sub>. De forma rutinaria se analizó por PCR el medio de cultivo para descartar contaminación por *Mycoplasma* utilizando el sistema *Mycoplasma Plus TM Primer Set* (Stratagen).

#### **3.1. Aislamiento de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC)**

Se obtuvieron PBMC de donantes sanos mediante centrifugación a 2000 RPM durante 20 minutos en gradiente de densidad sobre *Lymphoprep* (1,077 g/ml). La fracción mononuclear resultante se recogió y se lavó dos veces con medio RPMI completo. La viabilidad celular se determinó mediante conteo y exclusión con azul tripán siendo superior al 95%. La suspensión celular se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml para el cultivo y se mantuvieron en RPMI completo, compuesto por medio RPMI (Lonza) suplementado con un 10% (vol/vol) de FCS (suero fetal bovino), 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

### **4. ESTUDIOS FENOTÍPICOS**

El estudio fenotípico de la expresión de moléculas de superficie celular en MSC y pericitos se realizó mediante citometría de flujo (marcaje directo) con anticuerpos conjugados con los fluorocromos PE o FITC (Tabla I). Las células fueron incubadas con las diluciones apropiadas de cada anticuerpo durante 30 minutos a 4°C. En todos los casos se utilizaron los controles de isotipo adecuados. Para estudiar la expresión de Robo1 y Robo4 en la superficie de los pericitos, se realizó un marcaje indirecto con los anticuerpos anti-Robo1 (R5) (Wang et al., 2003b) y anti-Robo4 (clon 265721), seguidos de una incubación con anticuerpos anti-IgG conjugados con PE o FITC (Tabla II). Para estudiar la unión de Slit2 a los pericitos, éstos se incubaron con 40 ng/ml de Slit2 unido a una cola de histidinas (R&D) durante 30 minutos a 4 °C, seguido de la incubación con un anticuerpo de ratón anti-His (clon 34670) y de un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con PE. Todas las muestras se analizaron con el citómetro EPICS XL (Beckman Coulter).

### **5. CONSTRUCCIONES GÉNICAS Y TRANSFECCIONES**

Se transfectó la línea celular 293HEK con el plásmido que contenía el gen completo ROBO4 humano, amablemente proporcionado por Pankaj Seth (*Harvard Medical School*,

Boston, USA). Para la transfección se utilizó el reactivo *Lipofectamine Plus Reagent* (Invitrogen Life Technologies) según las condiciones del fabricante. Para obtener el transfectante estable, las células se cultivaron en DMEM suplementado con 500 µg/ml de geneticina (Promega).

## **6. ESTUDIOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL**

### **6.1. Aislamiento de ARN total**

#### **6.1.1. Aislamiento de ARN total de células en cultivo y tejidos congelados**

El ARN total de pericitos y MSC estimulados o no con LPS 1 µg/ml durante 4 horas fue aislado con los sistemas *RNeasy Micro Kit* o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), dependiendo del número de células y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incorporó al protocolo un tratamiento con *DNase I* (Qiagen). Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific) y la integridad del ARN se analizó usando un *Bioanalyzer 2100B* (Agilent Technologies).

#### **6.1.2. Aislamiento de ARN total de tejidos parafinados**

El ARN total de tejidos fijados en formaldehído y embebidos en parafina (FFPE, del inglés *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) fue obtenido a partir de 3 secciones titulares consecutivas de 8-µm de grosor cada una. La parafina de las muestras se eliminó con la solución de extracción *Hemo-De* (Scientific Safety Solvents Keller) y etanol al 95%. Para el aislamiento de ARN total se utilizó el sistema específico para tejidos parafinados *RNeasy FFPE kit* (Qiagen), incorporando un tratamiento con *DNase I* (Qiagen). La concentración de ARN y su integridad se estimaron mediante los métodos anteriormente descritos. Solo cuando los ratios A260:A280 y A260:A230 fueron mayores de 1,9 las muestras fueron consideradas para el análisis posterior.

### **6.2. Síntesis de ADNc por transcripción reversa**

#### **6.2.1. Síntesis de ADNc a partir de ARN de células o de tejidos congelados**

El ADNc se sintetizó a partir de 500 ng de ARN total mediante transcripción reversa usando el sistema *Superscript VILO cDNA Síntesis Kit* (Invitrogen Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **6.2.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN de tejidos parafinados**

Para la síntesis de ADNc a partir de las muestras de ARN total de tejidos parafinados utilizamos un sistema de pre-amplificación. Para ello se procedió a la transcripción reversa de entre 500 ng-1 µg de ARN con el sistema *RT<sup>2</sup> PreAMP cDNA síntesis kit* (SuperArray

Biosciences). A continuación, se realizó una amplificación del ADNc obtenido con una mezcla de oligonucleótidos específicos para cada gen de interés (*PreAMP Pathway Primer Mixes*, SuperArray Biosciences), según las instrucciones del fabricante.

### 6.3. Microarrays de ADN

El análisis de los perfiles transcripcionales se efectuó en el Centro de Genómica y Proteómica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. El microarray empleado para el análisis fue el *GeneChip Human Gene 1.0ST array* (Affymetrix). Por cada microarray se utilizaron 250 ng de ARN total y se realizaron triplicados biológicos de cada condición experimental. Se consideraron significativamente modulados o diferencialmente expresados aquellos genes con un ratio  $> 2$  o  $< 0,5$  en relación con su control correspondiente y con un valor de  $p < 0,05$ . Los resultados obtenidos se depositaron en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO), del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) con los números de acceso GSE46235 y GSE46236.

### 6.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

#### 6.4.1. Arrays de qRT-PCR

En las muestras de ARN obtenidas de tejido parafinado analizamos la expresión de 84 genes relacionados con el proceso angiogénico utilizando el sistema de *arrays* de qRT-PCR, *Angiogenesis RT<sup>2</sup>Profiler PCR Array* (Superarray Biosciences) en un equipo Lightcycler 480 (Roche Diagnostics) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como genes de referencia para la posterior normalización de la expresión génica se utilizaron  $\beta$ -2 microglobulina (*B2M*), hipoxantina-fosfo-ribosil-transferasa (*HPRT1*), proteína ribosomal 60S L13a (*RPL13A*), gliceraldehído fosfato-deshidrogenada (*GAPDH*) y  $\beta$ -actina (*ACTB*). La expresión relativa de cada gen de interés fue normalizada con respecto a la expresión media de los genes control empleando la fórmula  $2^{-\Delta Ct} = (2^{-Ct(\text{gen de interés})}) / (2^{-Ct(\text{genes control})})$ . La diferencia en la expresión génica entre dos condiciones se determinó calculando la ratio entre la expresión relativa del gen en cada una de ellas de acuerdo a la fórmula  $2^{-\Delta Ct(\text{Condición 1})} / 2^{-\Delta Ct(\text{Condición 2})}$ . Los arrays contenían además controles de contaminación de la muestra con ADN genómico (GDC) y de la eficiencia de las reacciones de transcripción reversa (RTC) y PCR (PPC).

#### 6.4.2. Validación de los resultados de los microarrays mediante qRT-PCR

Para validar los resultados de los *microarrays* de ADN seleccionamos una serie de genes y se diseñaron oligonucleótidos específicos para ellos utilizando el programa *Primer Express oligo design* (Applied BioSystems) (Tabla IV). En todos los casos estos oligonucleótidos generaban un amplicón de entre 80-120 pb. La qRT-PCR se realizó utilizando el sistema

*Lightcycler DNA Master SYBR Green I kit* (Roche Diagnostics) en un equipo *Lightcycler 480*) con el siguiente programa: desnaturalización de 3 minutos, seguida de 40 ciclos de amplificación de 10 segundos a 95°C y 7 segundos a 59°C. La expresión relativa de cada gen fue normalizada con respecto a la del gen de referencia succinato deshidrogenasa A (del inglés *Succinate Deshydrogenase Complex, Subunit A, SDHA*), empleando la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  y el ratio fue calculado de la misma manera previamente detallada.

Para estudiar la expresión de *EPHB4* en el grupo de muestras de tejido congelado, se utilizaron los oligonucleótidos incluidos en el array de qRT-PCR, proporcionados por el mismo proveedor (SuperArray Biosciences) y se realizó la qRT-PCR en el mismo equipo y con las condiciones anteriormente descritas.

**Tabla IV.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR.

Nombre del Gen	Oligonucleótido	Secuencia
<i>SDHA</i>	hSDHA-R	CCACCACTGCATCAAATTCATG
	hSDHA-F	TGGGAACAAGAGGGGCATCTG
<i>CXCL1</i>	hCXCL1-R	CCCTGCCTTCACAATGATCT
	hCXCL1-F	ATTTCTGAGGAGCCTGCAAC
<i>CXCL2</i>	hCXCL2-R	GCTTCCTCCTTCCTTCTGGT
	hCXCL2-F	GTCAAACACATTAAGTCCTTTCCA
<i>CXCL3</i>	hCXCL3-R	GTCAAACACATTAAGTCCTTTCCA
	hCXCL3-F	GTCCCTGCCCTTACCAGAG
<i>IL6</i>	hIL6-R	GGTACATCCTCGACGGCATCT
	hIL6-F	GTGCCTCTTTGCTGCTTTACA
<i>IL8</i>	hIL8-R	TTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC
	hIL8-F	TCTGGACCCCAAGGAAAAC
<i>ROBO1</i>	hROBO1-R	GTGCCATCCACGGCTACAG
	hROBO1-F	TGCTGGAAGCATCATCAAAAG
<i>ROBO2</i>	hROBO2-R	CCAGGATTGCAGGCTCTCC
	hROBO2-F	GTGAAGCAGTGAGTCGAAATGC
<i>ROBO3</i>	hROBO3-R	CGTCGGCTGAAGTGACTGACT
	hROBO3-F	GTGGCTTTCCAGTGCGAGAC
<i>ROBO4</i>	hROBO4-R	GGCATATGGGTGGCGATTT
	hROBO4-F	TGGCATCATCCGTGGCTAC
<i>Slit1</i>	hSLIT1-R	CGGTGCCGTTGAGGATCT
	hSLIT1-F	ACTTTGGCAAACATTACACGCTC
<i>Slit2</i>	hSLIT2-R	CGGACAAAGAGAGACTCTGATCC
	hSLIT2-F	GGCTCTCATCCAGCTTCTGC
<i>Slit3</i>	hSLIT3-R	TTTGTAGAGAAGGATGCCGTTGT
	hSLIT3-F	GCAAAGACTCCTACGTGGAAC

## **7. ESTUDIOS DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS**

### **7.1. Arrays de anticuerpos inmovilizados en membrana**

El medio condicionado de pericitos estimulados o no con LPS 1 µg/ml durante 4 horas se analizó con el sistema *Human Cytokine Membrane-based Antibody Array kit 1* (RayBiotech), que permite una valoración relativa de la concentración de 23 citoquinas y quimioquinas. En el último paso sustituimos la estreptavidina conjugada con HRP proporcionada en el kit, por 10 ng/ml de estreptavidina conjugada con IRDye800 (Rockland Immunochemicals). La señal fluorescente se detectó con el sistema *Odyssey Infrared Imaging* (Li-COR Biosciences) y se cuantificó usando un software específico (Li-COR Biosciences).

### **7.2. Citometría de flujo**

Para obtener datos cuantitativos, los medios condicionados se analizaron también con un sistema basado en bolas de diferentes tamaños que llevan unidos los anticuerpos correspondientes (*Th1/Th2 FlowCytomix Multiplex kit*, eBioscience) siguiendo el protocolo del fabricante. Este método permite la cuantificación de 11 citoquinas. Las muestras procesadas se analizaron en un citómetro *FACSCalibur* (BD Biosciences).

## **8. INMUNOPRECIPITACIÓN DE Robo4**

Se prepararon lisados celulares de HEK293, HEK293ROBO4 y pericitos con buffer de lisis *IP Lysis Buffer* (Thermo Scientific) al que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific Pierce). Antes de realizar la transferencia *Western*, se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal anti-Robo4, clon 265703 (R&D Systems), usando bolas magnéticas anti-proteína G y columnas *MS MACS* en un separador *MACS* (Miltenyi Biotec).

## **9. TRANSFERENCIA WESTERN**

Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando geles de diferentes porcentajes según el tamaño de cada proteína. A continuación, las proteínas fueron transferidas por *electroblotting* a una membrana de nitrocelulosa utilizando al sistema *iBlot Western Blotting System* y los reactivos del kit *iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose* (Invitrogen Life Technologies). La membrana fue bloqueada con *Odyssey Blocking Buffer* (Li-COR Biosciences), durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C y como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-β actina (Abcam). Tras varios lavados con PBS 0,05% Tween20 y con PBS, la membrana se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos anti-IgG de ratón y anti-IgG

de conejo conjugados con IRDye800 o IRDye700 (Rockland Immunochemicals) y diluidos en solución de bloqueo 1/15000. Tras lavar de nuevo la membrana con PBS 0,05% Tween20 y PBS las bandas se visualizaron mediante el sistema de detección de fluorescencia *Odyssey Infrared Imaging system*.

## **10. ENSAYOS FUNCIONALES**

### **10.1. Ensayos de adhesión**

#### **10.1.1. Adhesión de pericitos a Slit2 inmovilizado en placa**

Para comprobar la capacidad de unión de los pericitos a Slit2, se inmovilizó 5 µg/ml de Slit2 (R&D Systems) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo mediante una incubación de 18 horas a 4°C. Como control se utilizaron pocillos en los que se había inmovilizado PBS 5% BSA. Después de lavar con PBS y bloquear durante una hora a 37 °C con una solución PBS 1% BSA, se añadieron las células ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) resuspendidas en PM. Tras un periodo de incubación de 20 minutos a 37 °C, las células no adheridas se eliminaron mediante tres lavados sucesivos con PBS y se añadió 100 µl de medio basal a cada pocillo. Para cuantificar las células adheridas al pocillo se utilizó el sistema basado en bioluminiscencia *CellTiter-Glo* (Promega) añadiendo 100 µl del sustrato a cada pocillo y cuantificando con un luminómetro *Infinite F200* (Tecan). Los resultados se expresaron en RLU (unidades relativas de luminiscencia)

#### **10.1.2. Bloqueo de la adhesión a Slit2**

En los ensayos de bloqueo de la adhesión de los pericitos a Slit2 las células previamente se incubaron a 4°C con 15 µg/ml de los anticuerpo anti-Robo1 (R5) y/o anti-Robo4 (ab10547) 30 minutos antes de añadirlas a los pocillos con Slit2 inmovilizado (5 µg/ml). R5 es un anticuerpo contra el primer dominio Ig de Robo1 que inhibe su unión a Slit2 y el anticuerpo anti-Robo4 bloquea la interacción de Slit3 con Robo4. Como control se utilizó un anticuerpo anti-CD3 a la misma concentración (OKT3, Janssen-Cilag). Estos ensayos se realizaron por triplicado.

#### **10.1.3. Adhesión de células mononucleadas de sangre periférica a una monocapa de pericitos**

Los pericitos fueron cultivados hasta alcanzar una confluencia del 100% en placas de 24 pocillos y fueron o no tratados con 1 µg/ml de LPS durante 24 horas a 37°C, y se lavaron las células 3 veces con abundante PBS. Células mononucleadas de sangre periférica de donantes sanos marcadas con PKH26 (Sigma-Aldrich), se añadieron sobre la monocapa de pericitos a una concentración de  $1,5 \times 10^5$  células por pocillo durante 2 horas a 37°C. Las células no adheridas se eliminaron mediante lavados con PBS y se adquirieron imágenes de las células adheridas con



un microscopio invertido de epi-fluorescencia (Eclipse TS100-F). La cuantificación del ensayo se efectuó contando las células de cinco campos por pocillo.

### **10.2. Ensayos de reorganización del citoesqueleto de actina**

La reorganización del citoesqueleto en pericitos se estudió mediante tinción de los filamentos de F-actina con faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 (Invitrogen Life Technologies). Para ello los pericitos se cultivaron en cámaras de cultivo de 8 pocillos *Lab-Tek* (Nunc) en los que se había inmovilizado 10 ng/ml de fibronectina (Preprotech). Al medio de cultivo se añadió 200 ng/ml Slit2 (R&D Systems) y/o 25 ng/ml de PDGFB. Tras un periodo de incubación de 5 horas a 37 °C, las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 2% y se permeabilizaron con 0,1% de Triton X-100. Tras dos lavados con PBS 1% BSA, se incubaron durante 20 minutos con una solución 0,5 µmol/L de faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 en PBS 1% BSA. Por último, se añadió el medio de montaje *Vectashield H-1200* (Vector Laboratories) y las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal *TCS-SP5* (Leica Microsystems).

### **10.3. Ensayos de migración celular (*wound healing*)**

Para evaluar la capacidad migratoria de pericitos en presencia de Slit2 se realizó un ensayo de *wound healing*. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos hasta que alcanzaron una confluencia del 100%, y sobre la monocapa se trazó una línea con una punta de pipeta P-200. Después de lavar con PBS para eliminar las células desprendidas, se añadió medio de cultivo con 5 µg/ml de Slit2 (R&D Systems) y/o 25 ng/ml de PDFG-BB (Peprotech) y los pericitos se incubaron durante 8 horas a 37 °C. Cada experimento fue realizado por triplicado. Para capturar las imágenes se utilizó un microscopio invertido *Eclipse TS100-F* (Nikon). El área libre de células fue cuantificada con el software *HoKaWo* (Hamamatsu) al inicio y al final del experimento y los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de superficie cubierta.

### **10.4. Estudios de inmunofluorescencia de NF-κB**

La translocación al núcleo del factor de transcripción NF-κB se valoró con el sistema *Cellomics® NF-κB Activation HCS Reagent Kit* (Thermo Scientific). Para ello los pericitos fueron sembrados en cámaras de cultivo celular *Lab Tek* (Nunc) y estimulados con 1 µg/ml de LPS durante 90 minutos. Posteriormente las células fueron fijadas con un 4% de paraformaldehído y permeabilizadas con 0,1% Triton X100 durante 10 minutos. Después de realizar varios lavados, las células fueron incubadas con un anticuerpo de conejo anti-NF-κB, seguido de un anticuerpo anti-conejo conjugado con IRDyLight 488 (Immunochem). Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal *TCS SP5* (Leica Microsystems).

## **10.5. Inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B y MAPK**

Para los ensayos de inhibición de la actividad de NF- $\kappa$ B, los pericitos fueron pre-tratados durante 30 minutos con diferentes concentraciones (1-10  $\mu$ M) del inhibidor SC-514 (Santa Cruz Biotechnology). Para bloquear la actividad de diferentes proteínas MAP quinasas (MAPK) tratamos los pericitos con los siguientes inhibidores a una concentración de 10  $\mu$ M: 600125 (inhibidor de JNK1-2), 98059 (inhibidor de MEK-1) y 203580 (inhibidor de p38). Tras el pre-tratamiento, los pericitos se estimularon 90 minutos con 1  $\mu$ g/ml de LPS.

## **11. MUESTRAS TISULARES Y DATOS CLINICO-PATOLÓGICOS**

Las muestras de tejido de pacientes con cáncer colorrectal metastático (CCR) que habían sido diagnosticados y tratados con bevacizumab y quimioterapia estándar fueron proporcionadas por el Departamento de Oncología Médica del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, Madrid. La respuesta al tratamiento se valoró de acuerdo con los criterios de evaluación de tumores sólidos (RECIST, versión 1.1) junto con tomografía computerizada y se clasificó a los pacientes en respondedores y no respondedores. Se obtuvieron datos de 34 pacientes para los que estaban disponibles bloques de parafina del tumor primario.

## **12. INMUNOHISTOQUÍMICA**

Para la caracterización inmunohistoquímica (IHQ) de las muestras de CCR, se procedió a desenmascarar los antígenos mediante tratamiento con calor en una olla a presión durante 4 minutos, en la solución de tampón citrato pH 6,0 *Target Retrieval Solution* (Dako). La actividad peroxidasa endógena se bloqueó durante 5 minutos con peróxido de hidrógeno 3%. La presencia de EphB4 se detectó con el anticuerpo anti-EphB4 (clon 3D7G8, Invitrogen Life Technologies) utilizando el kit *VECTASTAIN ABC peroxidase* (Vector Laboratories). Como sustrato cromogénico se utilizó DAB (Vector Laboratories) seguido de contratinción con hematoxilina. La puntuación de los niveles de EphB4 en la IHQ fue determinada por un patólogo especialista y representada por la suma de dos valores: el porcentaje de las células positivas (0-4, donde 0 = < 10%, 1 = 10-24 %, 2 = 25-49%, 3 = 50-74%, 4 = 75-100%) sumado al valor de la intensidad de las células positivas (0-4, donde 0 = no existe tinción, 1 = tinción casi imperceptible, 2 = tinción de intensidad baja, 3 = tinción de intensidad intermedia, 4 = tinción de alta intensidad)

## **13. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE LOS MICROARRAYS**

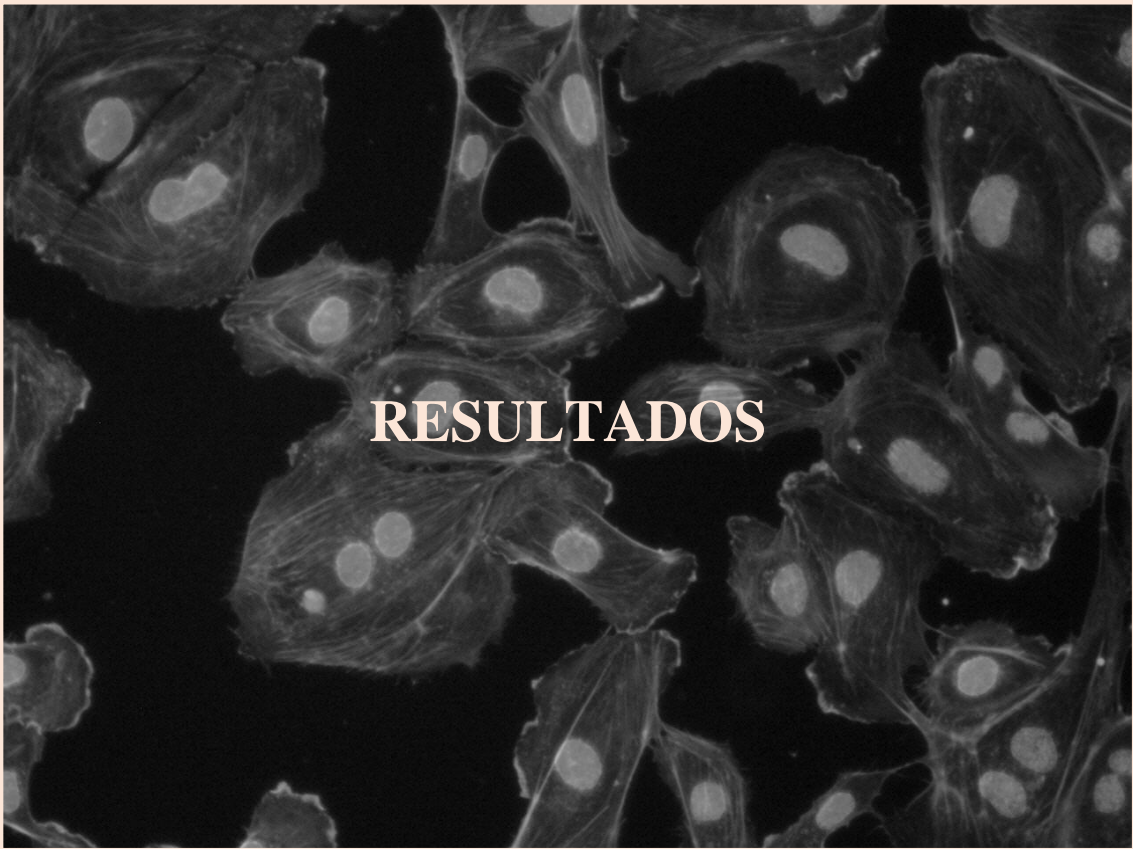
Para la anotación funcional de los genes sobreexpresados significativamente en pericitos estimulados con LPS se usó el modelo de ontología génica (GO, del inglés, *gene ontology*)

(Ashburner et al., 2000) organizado en tres categorías: proceso biológico, función molecular y compartimento celular. La asignación de términos GO se realizó mediante la herramienta *DAVID* 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), así como el análisis de enriquecimiento funcional de términos GO sobre-representados (Tabla XI). La significación estadística de dicho análisis se calculó con una modificación del test exacto de *Fisher*. Los valores de  $p$  obtenidos se corrigieron con diferentes estadísticos cada vez más restrictivos para minimizar la proporción de falsos positivos. Un valor FDR (*False Discovery Rate*)  $< 0,05$  indica un enriquecimiento significativo.

#### **14. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS**

La media y la desviación estándar se calcularon mediante el programa *Prism V* (Graphpad Software). Para calcular la significación estadística se utilizó el test paramétrico *t* de Student o el no paramétrico *Mann-Whitney*, considerándose un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. En el estudio de la expresión de EPHB4 en pacientes de CCR se dividió a los mismos en grupos de alta o baja expresión en función del punto de corte establecido mediante curva *ROC*. La prueba de Fisher se utilizó en el análisis de las tablas de contingencia. Las curvas de supervivencia se generaron con el método *Kaplan-Meier* y se compararon con el estadístico *log-rank* (*Mantel-Cox*). Se realizó un análisis por regresión de *Cox* para evaluar la importancia de los factores predictivos de la supervivencia. Todos los datos se analizaron con el software *SPSS 14.0*.

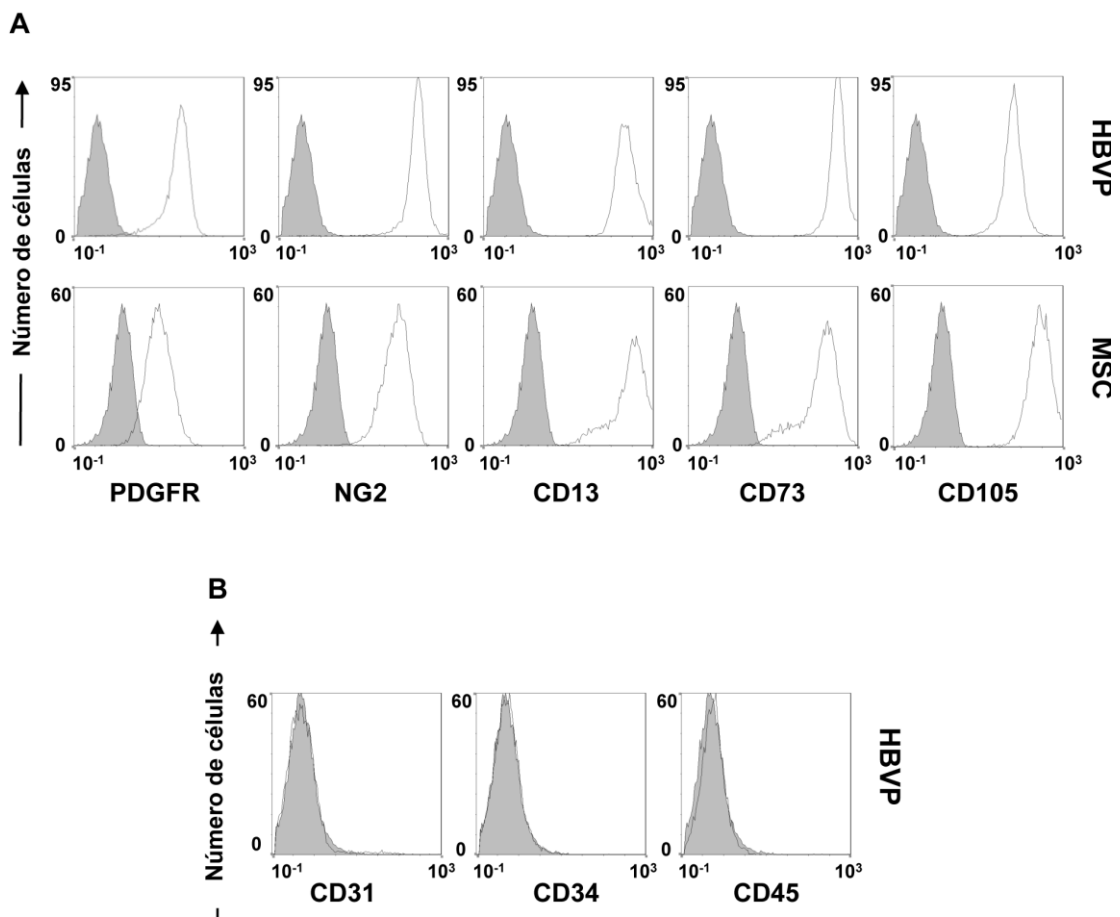




## 1. PAPEL DEL PERICITO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA

### 1.1. Comparación del fenotipo de pericitos y células progenitoras mesenquimales

Dada la estrecha relación ontogénica existente entre pericitos y MSC nos planteamos realizar un estudio fenotípico comparativo mediante citometría de flujo utilizando una combinación de anticuerpos frente a diferentes marcadores de superficie, ya que no existe ninguno absolutamente específico de pericitos o MSC. Se evaluaron los niveles de expresión tanto de marcadores característicos de pericitos (PDGFR $\beta$  y NG2) como de MSC (CD13 o aminopeptidasa N, CD73 o 5'-nucleotidasa y CD105 o endoglina) en ambos tipos celulares (Fig. 7a). La expresión de PDGFR $\beta$  era inferior en MSC pero el resto de marcadores presentaron perfiles prácticamente idénticos. Se comprobó también en pericitos la ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos y de CE como CD45, CD31 y CD34 (Fig. 7b).



**Figura 7.** Estudio fenotípico comparativo de pericitos y MSC. El control isotípico se representa de color gris.

## 1.2. Comparación del perfil transcripcional de pericitos y células progenitoras mesenquimales

Ya que la expresión de marcadores en membrana no permitía distinguir entre pericitos y MSC, se comparó el perfil transcripcional de ambos tipos celulares para identificar algún elemento diferencial a nivel de expresión génica. Para ello se utilizaron microarrays de ADN de *Affymetrix* que evalúan los niveles de expresión de 28.869 genes anotados (*Human Gene 1.0 ST array*). Del total, 607 genes (2,1%) tenían una expresión al menos dos veces mayor en pericitos que en MSC (ratio > 2, p < 0,05), y 42 genes (0,14%) tenían una expresión diez veces mayor (Tabla V). A la inversa, 882 genes (3,05%) se expresaban más del doble en MSC que en pericitos (ratio < 0,5, p < 0,05) y 78 genes (0,27%) lo hacían diez veces más.

En consonancia con el papel que juegan en la homeostasis de los vasos sanguíneos, los genes expresados preferentemente en pericitos incluyen diversos tipos de moléculas que participan en la angiogénesis: angiopoyetina 2 (*ANGPT2*), angiopoyetina 4 (*ANGPTL4*), endotelina 1 (*EDNI*), laminina  $\alpha$ 4 (*LAMA4*), laminina  $\alpha$ 5 (*LAMA5*), factor de crecimiento placentario (*PGF*), activador del plasminógeno tipo uroquinasa (*PLAU*), factor de crecimiento derivado de plaquetas A (*PDGFA*) y roundabout4 (*ROBO4*). Por su parte, los genes con mayores niveles de expresión en MSC incluyen moléculas relacionadas con la matriz extracelular, como colágenos (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL11A1*, *COL12A1*), proteoglicanos (*HSPG2*, *VCAN*, *LUM*, *GPC1*, *DCN*, *FMOD*), proteasas de matriz extracelular (*MMP-2*, -3, y -8; *ADAMTS-1*, -4 y -9), fibulina-1 (*FBLN1*), matrilina-1 (*MATN1*) y lisil-oxidasa (*LOX*).

Pero el dato más interesante fue la alta expresión relativa de *TLR4* en pericitos con respecto a MSC (73,8 veces). Dado que la expresión de *TLR4* no se ha documentado previamente en pericitos humanos, decidimos explorar la funcionalidad de la señalización vía LPS en este tipo celular.

**Tabla V:** Genes expresados al menos diez veces más en pericitos que en MSC (ratio > 10)

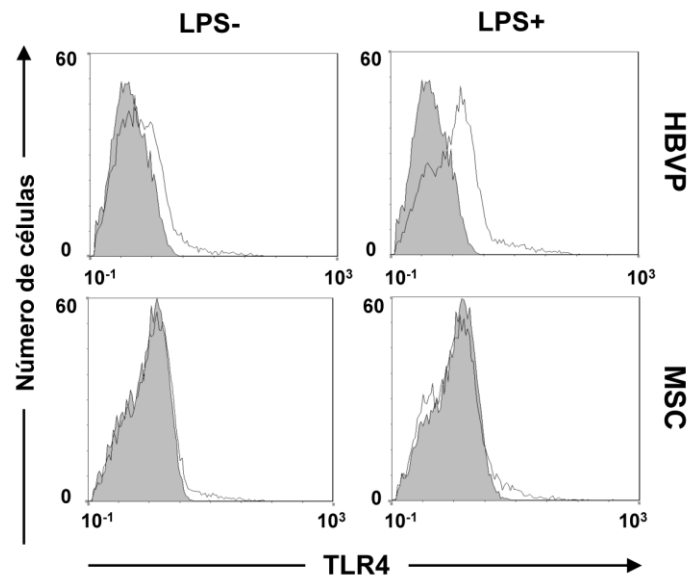
Gen	Nº acceso	Ratio	Valor p	FDR
<i>ZIC1</i>	NM_003412	84,347	2,81E-16	1,17E-12
<i>TLR4</i>	NR_024168	73,811	8,72E-16	2,12E-12
<i>SIX1</i>	NM_005982	63,233	5,26E-16	1,39E-12
<i>EPB41L3</i>	NM_012307	39,289	4,41E-15	6,42E-12
<i>EBF1</i>	NM_024007	23,831	1,85E-14	1,68E-11
<i>TFAP2C</i>	NM_003222	22,265	4,14E-13	1,47E-10
<i>FAM49A</i>	NM_030797	21,474	7,46E-14	4,43E-11
<i>C5orf23</i>	BC022250	21,317	1,23E-15	2,50E-12

<i>PTGS1</i>	NM_000962	19,319	5,14E-14	3,44E-11
<i>SEMA6D</i>	NM_153618	18,987	4,35E-12	9,05E-10
<i>TMEM156</i>	NM_024943	18,525	3,62E-13	1,37E-10
<i>OLAH</i>	NM_018324	17,606	1,05E-10	1,09E-08
<i>SULT1E1</i>	NM_005420	16,740	1,02E-12	3,01E-10
<i>GGT5</i>	NM_001099781	16,659	5,16E-13	1,73E-10
<i>TBX15</i>	NM_152380	16,610	1,84E-12	4,64E-10
<i>NPR3</i>	NM_000908	16,599	2,69E-13	1,12E-10
<i>MYO1D</i>	NM_015194	16,139	1,45E-12	3,90E-10
<i>AOX1</i>	NM_001159	15,915	2,52E-14	1,98E-11
<i>ITGA10</i>	NM_003637	15,779	2,15E-14	1,74E-11
<i>LPAR4</i>	NM_005296	15,381	2,89E-13	1,17E-10
<i>AJAPI</i>	NM_018836	15,152	7,83E-12	1,46E-09
<i>IGFBP1</i>	NM_000596	14,912	4,48E-12	9,18E-10
<i>HTR1F</i>	NM_000866	14,909	2,04E-14	1,74E-11
<i>SCUBE3</i>	NM_152753	14,131	3,03E-09	1,72E-07
<i>UNQ3104</i>	AY358109	13,360	4,39E-12	9,06E-10
<i>AFF3</i>	NM_002285	13,185	6,48E-15	8,20E-12
<i>RNF182</i>	NM_152737	13,088	6,05E-11	7,24E-09
<i>TRPC6</i>	NM_004621	12,990	3,01E-12	6,83E-10
<i>IGFBP2</i>	NM_000597	12,315	1,92E-11	2,93E-09
<i>KRT7</i>	NM_005556	12,245	1,88E-11	2,90E-09
<i>GOS2</i>	NM_015714	12,032	3,22E-13	1,28E-10
<i>MEOX2</i>	NM_005924	11,972	3,62E-11	4,74E-09
<i>ITGBL1</i>	NM_004791	11,935	8,38E-15	9,37E-12
<i>RARB</i>	NM_000965	11,857	4,53E-11	5,68E-09
<i>PODXL</i>	NM_001018111	11,472	4,13E-12	8,64E-10
<i>LY6K</i>	NM_017527	11,442	9,48E-13	2,90E-10
<i>TNFRSF1B</i>	NM_001066	10,565	9,31E-10	6,50E-08
<i>SORBS2</i>	NM_021069	10,411	5,48E-11	6,68E-09
<i>NNAT</i>	NM_005386	10,338	5,31E-11	6,55E-09
<i>CYYR1</i>	NM_052954	10,314	6,42E-11	7,59E-09
<i>MAOA</i>	NM_000240	10,219	2,60E-10	2,24E-08
<i>PTGER4</i>	NM_000958	10,009	1,43E-12	3,88E-10

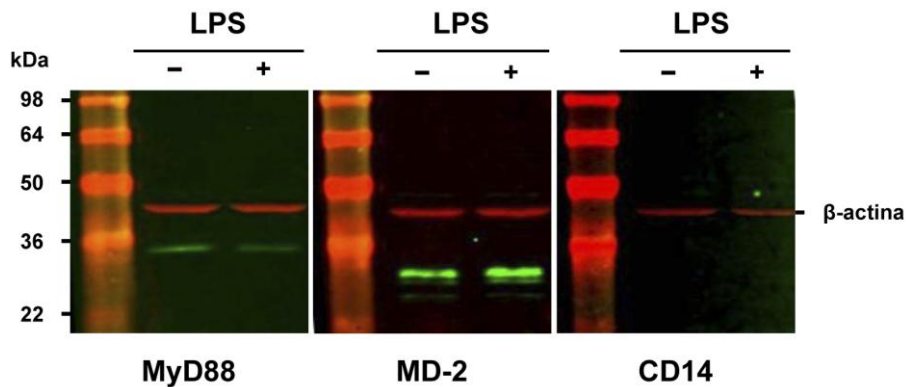


### 1.3. Expresión del receptor TLR4 y su complejo de señalización en pericitos

Para validar los resultados de los microarrays se procedió a evaluar la expresión del receptor TLR4 en la superficie de pericitos y MSC mediante citometría de flujo (Fig. 8). TLR4 se expresa a niveles bajos aunque detectables en pericitos, pero no así en MSC. Aunque no se había observado un cambio significativo en los niveles de ARN de *TLR4* en pericitos estimulados con LPS, se demostró un aumento de su expresión en la superficie celular pero no en MSC.



**Figura 8:** Expresión de TLR4 en la membrana de pericitos y MSC estimulados o no con LPS.



**Figura 9.** Expresión de moléculas implicadas en la señalización por TLR4. Los anticuerpos anti-MyD88 y anti-MD-2 detectaban bandas del tamaño esperado (35 kDa y 22 kDa respectivamente). No se pudo detectar la banda correspondiente a CD14 (40 kDa). Como control de carga se utilizó la  $\beta$ -actina (42 kDa).

MD-2 y CD14 forman parte del complejo de reconocimiento de LPS junto con TLR4. MyD88 es una proteína adaptadora que juega un papel clave en la cascada de señalización intracelular tras la activación de TLR4. La expresión de estas tres proteínas en pericitos se analizó por transferencia *Western* (Fig. 9). Se comprobó que los pericitos expresan MyD88 y MD-2, pero no así CD14. La estimulación con LPS no aumentaba la expresión de ninguna de estas proteínas.

## 1.4. Análisis del perfil transcripcional de pericitos estimulados con LPS

### 1.4.1. Microarrays de ADN

Para estudiar el efecto de LPS en la modulación de la expresión génica, se extrajo ARN total de pericitos estimulados o no durante 4 horas con 1 µg/ml de LPS para su análisis mediante microarrays de ADN. En los pericitos tratados con LPS, 76 genes fueron sobreexpresados más de dos veces (ratio > 2, p < 0,05), y 22 genes más de cinco veces (ratio > 5) (Tabla VI).

**Tabla VI.** Genes sobreexpresados en pericitos tratados con LPS (ratio > 5)

Gen	Nº acceso	Ratio	Valor p	FDR
<i>CXCL10</i>	NM_001565	59,39	3,66E-04	4,82E-01
<i>CCL20</i>	NM_004591	38,33	1,03E-05	4,23E-02
<i>IL8</i>	NM_000584	32,41	2,93E-06	2,11E-02
<i>CXCL1</i>	NM_001511	23,04	1,73E-06	1,66E-02
<i>IL6</i>	NM_000600	16,38	3,09E-03	9,99E-01
<i>CCL2</i>	NM_002982	15,52	2,47E-08	7,11E-04
<i>TNFAIP3</i>	NM_006290	15,08	5,19E-05	1,38E-01
<i>ICAM1</i>	NM_000201	14,18	6,46E-05	1,43E-01
<i>IL1β</i>	NM_000576	12,66	4,10E-05	1,31E-01
<i>VCAM1</i>	NM_001078	11,71	4,77E-06	2,75E-02
<i>PTGS2</i>	NM_000963	10,99	1,02E-03	8,85E-01
<i>CXCL2</i>	NM_002089	8,53	7,61E-06	3,65E-02
<i>TNFAIP2</i>	NM_006291	8,52	1,27E-03	9,99E-01
<i>TNFAIP5</i>	NM_002852	6,56	1,09E-04	2,08E-01
<i>TNFSF18</i>	NM_005092	6,54	1,73E-06	1,66E-02
<i>TNFAIP6</i>	NM_007115	5,93	3,69E-04	4,82E-01
<i>SELE</i>	NM_000450	5,83	4,36E-02	9,99E-01
<i>IL1α</i>	NM_000575	5,64	2,37E-02	9,99E-01

<i>MX1</i>	NM_002462	5,36	9,46E-02	9,99E-01
<i>LIF</i>	NM_002309	5,19	2,39E-03	9,99E-01
<i>SOD2</i>	NM_001024465	5,15	1,02E-04	2,08E-01
<i>CLDN1</i>	NM_021101	5,06	5,39E-03	9,99E-01
<i>CXCL6</i>	NM_002993	5,02	1,42E-03	9,99E-01

De esos 22 genes, diez de ellos codificaban citoquinas y quimioquinas (*CXCL10*, *CCL20*, *IL8*, *CXCL1*, *IL6*, *CCL2*, *IL1B*, *CXCL2*, *IL1A* y *CXCL6*) y tres genes codificaban moléculas de adhesión (*ICAM1*, *VCAM*, y *SELE*). Los genes *TNFAIP-2*, *-3*, *-5* y *-6*, que codifican proteínas inducidas por TNF- $\alpha$ , también fueron regulados positivamente, así como los de las enzimas prostaglandina endoperoxidasa sintasa 2 (*PTGS2*), también denominada COX-2, y superóxido dismutasa 2 (*SOD2*). Ningún gen anotado disminuyó su expresión significativamente tras el tratamiento con LPS.

Para la anotación funcional de los 76 sobreexpresados significativamente se utilizó la herramienta *DAVID*. Dentro de la categoría proceso biológico, los términos respuesta inflamatoria, defensa inmune y respuesta inmune fueron los que alcanzaron un enriquecimiento más significativo, con un valor FDR (*false discovery rate*)  $< 5 \times 10^{-14}$ . En la categoría función molecular, los términos que alcanzaron mayor significación estadística fueron actividad citoquina y actividad quimioquina, con un valor FDR  $< 5 \times 10^{-12}$  (Tabla VII).

**Tabla VII:** Anotación funcional de los genes modulados en pericitos estimulados con LPS

Categoría	Nº/total	%	Valor p	FDR
<b>PROCESO BIOLÓGICO</b>				
GO:0006954~inflammatory response	22/65	30,99	7,98E-19	1,30E-15
GO:0006952~defense response	27/65	38,03	8,29E-19	1,35E-15
GO:0006955~immune response	27/65	38,03	1,40E-17	2,28E-14
GO:0009611~response to wounding	24/65	33,80	8,35E-17	1,78E-13
GO:0050900~leukocyte migration	10/65	14,08	4,98E-12	8,09E-09
GO:0042330~taxis	13/65	18,31	9,55E-12	1,55E-08
GO:0006935~chemotaxis	13/65	18,31	9,55E-12	1,55E-08
GO:0006916~anti-apoptosis	14/65	19,72	1,08E-11	1,75E-08
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	16/65	22,54	6,85E-11	1,11E-07
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	16/65	22,54	8,35E-11	1,36E-07
GO:0060548~negative regulation of cell death	16/65	22,54	8,68E-11	1,41E-07
GO:0007626~locomotory behavior	14/65	19,72	3,80E-10	6,17E-07

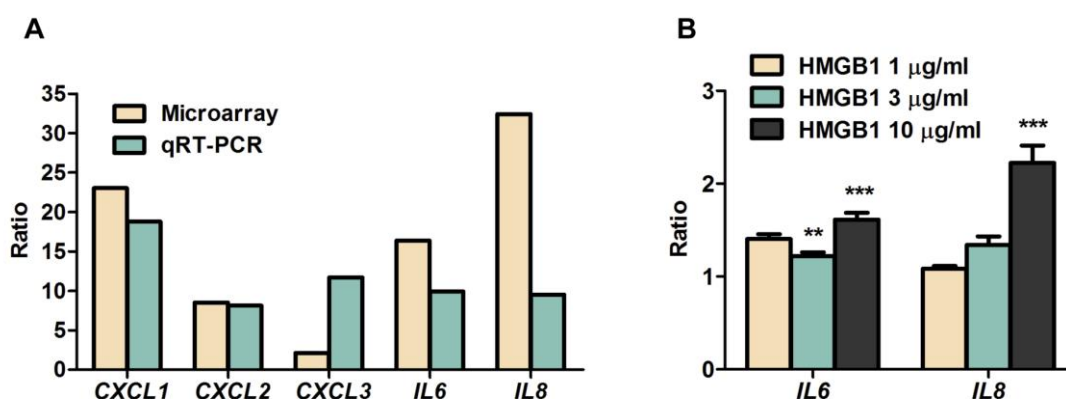
GO:0042981~regulation of apoptosis	21/65	29,58	3,90E-10	6,33E-07
GO:0043067~regulation of programmed cell death	21/65	29,58	4,64E-10	7,54E-07
GO:0010941~regulation of cell death	21/65	29,58	4,95E-10	8,04E-07
GO:0006915~apoptosis	18/65	25,35	1,65E-09	2,67E-06
GO:0012501~programmed cell death	18/65	25,35	2,06E-09	3,35E-06
GO:0008219~cell death	19/65	26,76	3,33E-09	5,40E-06
GO:0016265~death	19/65	26,76	3,71E-09	6,03E-06
GO:0002237~response to molecule of bacterial origin	9/65	12,68	6,34E-09	1,03E-05
GO:0030595~leukocyte chemotaxis	7/65	9,86	1,83E-08	2,97E-05
GO:0060326~cell chemotaxis	7/65	9,86	2,55E-08	4,14E-05
GO:0007610~behavior	15/65	21,13	2,92E-08	4,74E-05
GO:0031349~positive regulation of defense response	8/65	11,27	4,83E-08	7,84E-05
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	8/65	11,27	7,02E-08	1,14E-04
GO:0042127~regulation of cell proliferation	18/65	25,35	8,77E-08	1,42E-04
GO:0048584~positive regulation of response to stimulus	11/65	15,49	1,43E-07	2,33E-04
GO:0002684~positive regulation of immune system process	11/65	15,49	1,55E-07	2,52E-04
GO:0009617~response to bacterium	10/65	14,08	2,84E-07	4,62E-04
GO:0019221~cytokine-mediated signaling pathway	7/65	9,86	9,13E-07	1,48E-03
GO:0034097~response to cytokine stimulus	7/65	9,86	1,87E-06	3,04E-03
GO:0016477~cell migration	10/65	14,08	5,55E-06	9,01E-03
GO:0006928~cell motion	12/65	16,90	1,23E-05	2,00E-02
GO:0048870~cell motility	10/65	14,08	1,31E-05	2,12E-02
GO:0051674~localization of cell	10/65	14,08	1,31E-05	2,12E-02
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	11/65	15,49	2,23E-05	3,63E-02
GO:0050727~regulation of inflammatory response	6/65	8,45	2,88E-05	4,68E-02
<b>FUNCIÓN MOLECULAR</b>				
GO:0005125~cytokine activity	17/57	23,94	8,58E-17	1,33E-13
GO:0008009~chemokine activity	11/57	15,49	3,42E-15	4,21E-12
GO:0042379~chemokine receptor binding	11/57	15,49	6,93E-15	8,43E-12

### 1.4.2. PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Con el objeto de validar los datos de expresión génica obtenidos con los microarrays de ADN se seleccionaron cinco genes para su análisis mediante qRT-PCR en las mismas muestras de ARN: *IL6*, *IL8*, *CXCL1*, 2 y 3. El gen *SHDA* se utilizó para normalizar los datos y la especificidad de los oligonucleótidos se comprobó mediante secuenciación del producto de qRT-PCR. Los resultados confirmaron en todos los genes la tendencia observada en los microarrays (Fig. 10a), aunque en el caso del gen *CXCL3* se detectó una sobreexpresión mayor mediante qRT-PCR.

### 1.5. Expresión génica de pericitos estimulados con HMGB1

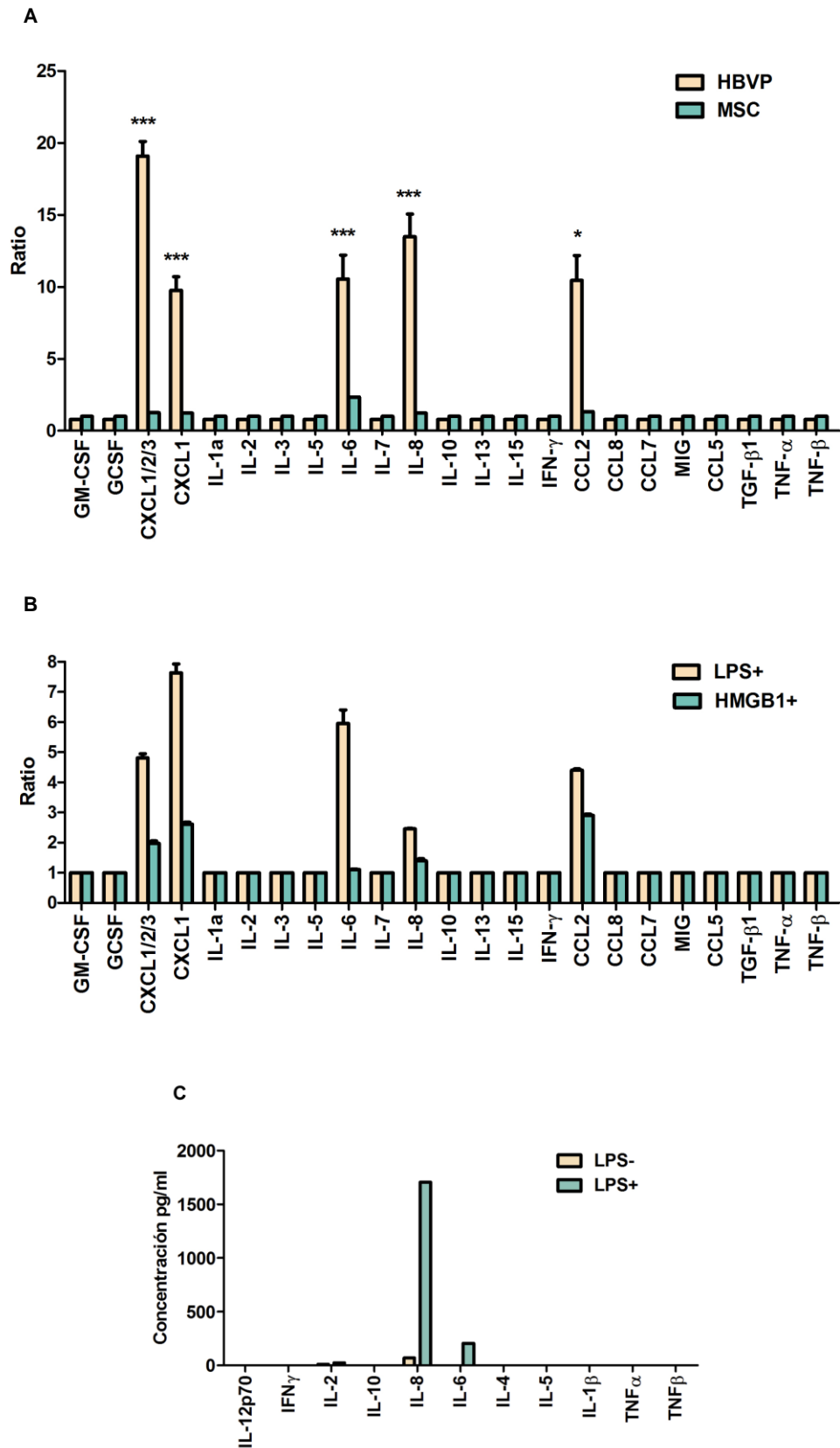
Para estudiar el efecto de HMGB1, ligando endógeno de TLR4, los pericitos se incubaron con diferentes concentraciones de HMGB1 recombinante durante 4 horas y los niveles de expresión de *IL6* e *IL8* se analizaron mediante qRT-PCR. Con la dosis más alta (10  $\mu$ g/ml) se pudo observar un aumento significativo de los niveles de expresión de ambos genes (Fig. 10b).



**Figura 10.** A) Validación los resultados de los microarrays mediante análisis por qRT-PCR de la expresión de cinco genes relevantes modulados en pericitos tratados con LPS. B) Análisis por qRT-PCR de los niveles de *IL6* y *IL8* en pericitos estimulados con HMGB1.

### 1.6. Producción de citoquinas y quimioquinas en pericitos estimulados con LPS y HMGB1

Para evaluar la sobreexpresión de los genes correspondientes se traducían a nivel de proteína, analizamos 23 citoquinas y quimioquinas en el medio condicionado de pericitos tratados o no con LPS o HMGB1 usando un sistema de arrays de anticuerpos inmovilizados en membrana (Fig. 11). Los pericitos secretan de forma basal niveles bajos de CXCL2, CXCL3, IL-8 y CCL2. La estimulación con LPS resultó en un aumento estadísticamente significativo de la producción de estas proteínas, así como en la secreción de IL-6 y CXCL1.



**Figura 11.** A) Perfil de secreción de citoquinas y quimioquinas en pericitos y MSC estimulados con 1 $\mu$ g/ml de LPS, \*= p < 0,05; \*\*= p < 0,01. B) Perfil de secreción de citoquinas y quimioquinas en pericitos incubados durante 4 horas con 50 ng/ml LPS o 10  $\mu$ g/ml HMGB1. C) Cuantificación de citoquinas en el medio de pericitos incubados con LPS.

De hecho, se pudo demostrar un incremento en todas las proteínas representadas en los arrays de anticuerpos cuyos genes se sobreexpresaban más de cinco veces en los microarrays de ADN, excepto en el caso de IL-1 $\alpha$ . Para corroborar estos datos, se realizó un ensayo complementario mediante citometría de flujo que permitía la cuantificación de citoquinas en el medio (Fig. 11c). Se observó un aumento de los niveles de IL-8 en el medio de pericitos tratados con LPS (1706 pg/ml) en comparación con las células no tratadas (68,51 pg/ml). Y aunque no se detectó IL-6 en el medio de los pericitos control, se alcanzaron niveles de 206,42 pg/ml de IL-6 tras la estimulación con LPS. No se pudo detectar la secreción de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  TNF- $\beta$  ni en condiciones basales ni en pericitos tratados con LPS. Dado que TLR4 no se expresaba en la superficie de MSC, su capacidad de respuesta a LPS debería ser limitada. De hecho, el tratamiento de MSC con LPS no produjo ningún cambio significativo en la secreción de citoquinas y quimioquinas al medio (Fig. 11a).

Por otro lado, la estimulación de los pericitos con HMGB1 dio lugar a la liberación de CXCL1, CXCL2, CXCL3, IL-8 y CCL2, aunque a niveles más bajos que los observados para LPS (Fig. 11b).

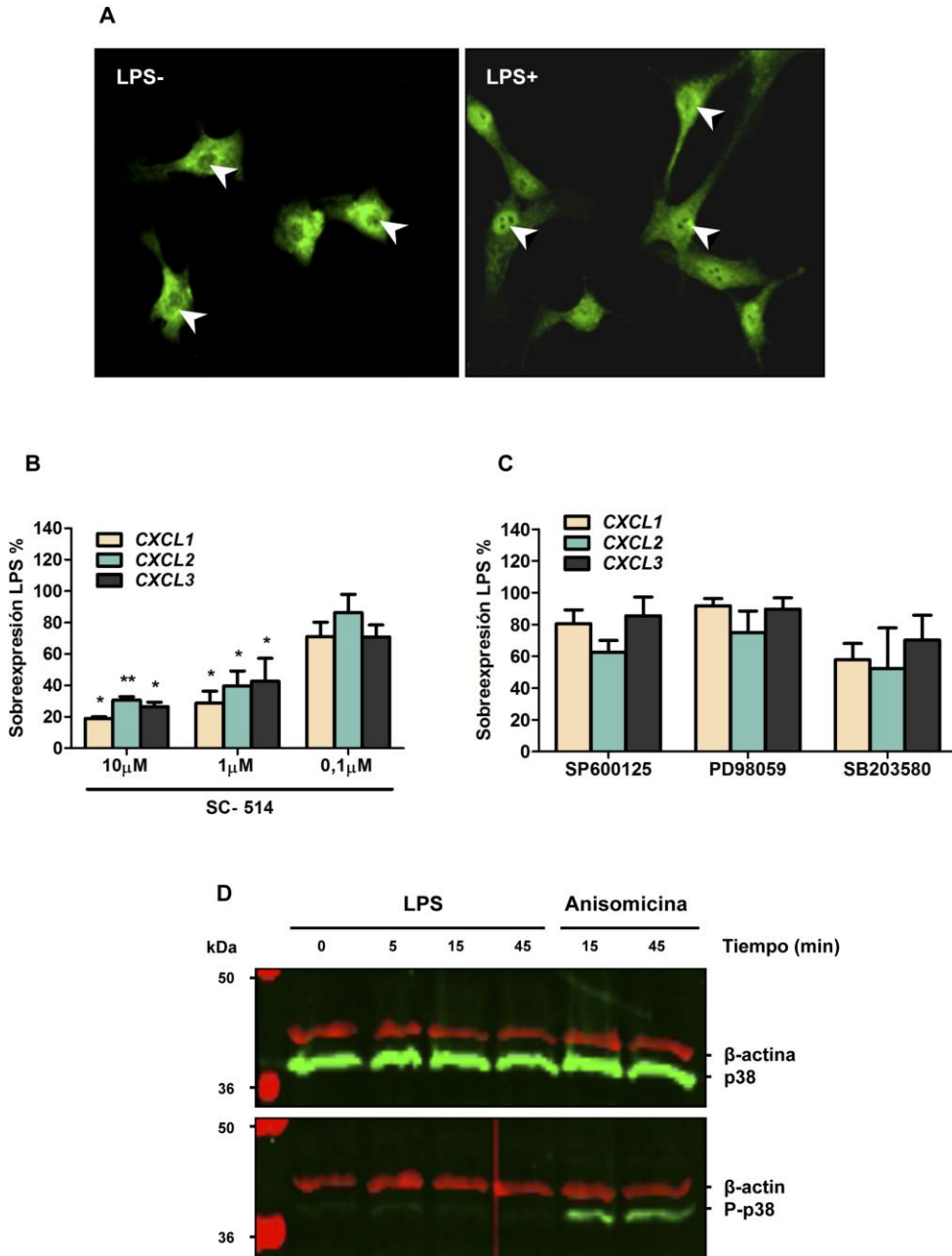
## **1.7. Activación de NF- $\kappa$ B en pericitos tratados con LPS**

### **1.7.1. Translocación nuclear de NF- $\kappa$ B**

TLR4 induce la activación de NF- $\kappa$ B en diferentes tipos celulares, pero la funcionalidad de esta vía en pericitos no había sido estudiada previamente. Ya que la activación de NF- $\kappa$ B provoca su translocación al núcleo, se analizó la localización subcelular de NF- $\kappa$ B mediante inmunofluorescencia en pericitos estimulados o no con LPS. En los pericitos control, NF- $\kappa$ B se localizaba principalmente en el citoplasma; sin embargo, la estimulación con LPS inducía la translocación de NF- $\kappa$ B desde el citoplasma al núcleo, como se observa en la figura 12a.

### **1.7.2. Inhibición de NF- $\kappa$ B**

Para comprobar si la ruta de NF- $\kappa$ B es relevante para la producción de mediadores inflamatorios en pericitos, las células se pretrataron con diferentes concentraciones del inhibidor de NF- $\kappa$ B, SC-514, antes de la estimulación con LPS. El tratamiento con SC-514 dio como resultado la inhibición de la sobreexpresión de los genes *CXCL1*, 2 y 3 (Fig. 12b) de manera dosis dependiente. Con la concentración más alta de SC-514 (10  $\mu$ M), los niveles de ARN de *CXCL1*, 2 y 3 disminuyeron entre un 70 y un 82% en relación a los de pericitos estimulados con LPS en ausencia del inhibidor.



**Figura 12.** A) La estimulación con LPS media la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B en pericitos. La subunidad p65 de NF- $\kappa$ B se detecta en el citoplasma de los pericitos no estimulados (imagen de la izquierda) pero fundamentalmente en el núcleo tras la estimulación con LPS (imagen de la derecha). Aumento  $\times$  400. B) Supresión de la expresión génica de *CXCL1*, 2 y 3 en pericitos tratados con el inhibidor de NF- $\kappa$ B, SC-514, previamente a la estimulación con LPS. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ . C) Niveles de expresión de *CXCL1*, 2 y 3 en pericitos tratados con inhibidores de MAPK antes de la estimulación con LPS. D) Transferencia Western para la detección del estado de fosforilación de p38 en pericitos estimulados con LPS. Como control positivo, las células fueron tratadas con anisomicina 10  $\mu$ M.



## 1.8. Activación de MAPK en pericitos tratados con LPS

### 1.8.1. Inhibición de MAPK

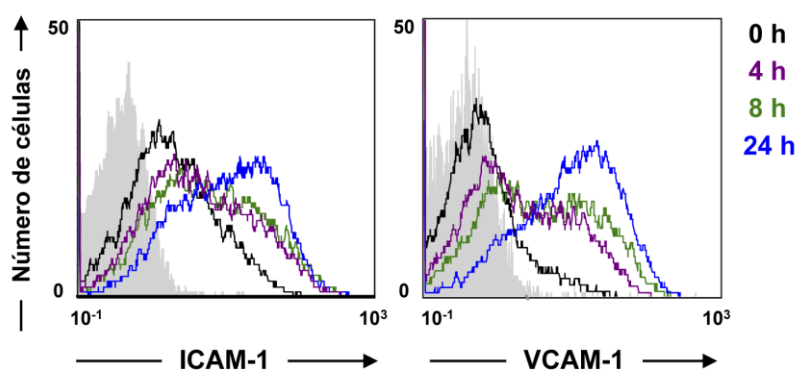
TLR4 puede activar otras vías alternativas a la de NF- $\kappa$ B como las que implican a proteínas MAP quinasas (MAPK). Para estudiar su posible contribución a la sobreexpresión de mediadores inflamatorios, se utilizaron inhibidores de varias vías MAPK: SB203580 (inhibidor de p38), SP600125 (inhibidor de JNK1-2) y PD98059 (inhibidor de MEK-1). Como se muestra en la figura 12c, ninguno de estos inhibidores afectó de forma estadísticamente significativa a la sobreexpresión de *CXCL1*, 2 y 3, aunque se apreció una tendencia a la disminución de los niveles de ARN con el inhibidor de p38.

### 1.8.2. Detección de fosfo-p38

Para corroborar que no se producía activación de p38 en pericitos tras la estimulación con LPS, se estudió su estado de fosforilación en células tratadas con LPS a diferentes tiempos mediante transferencia *Western*. Así como la proteína p38 total se detectaba en todas las muestras, no fue posible visualizar la banda correspondiente a fosfo-p38 en ninguna de las muestras. Como control positivo se utilizaron pericitos tratados con anisomicina, un activador de la vía de p38, en los que se detectaba claramente fosfo-p38 (Fig. 12d).

## 1.9. Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en pericitos tratados con LPS

A nivel de ARN habíamos demostrado un incremento en la expresión de genes que codificaban moléculas de adhesión (*SELE*, *ICAM1*, y *VCAM1*) en pericitos estimulados con LPS (Tabla VI). Para evaluar si esta modulación se producía también a nivel de proteína, se analizó la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 mediante citometría de flujo en pericitos tratados con LPS durante diferentes tiempos (4, 8 y 24 horas) (Fig. 13).



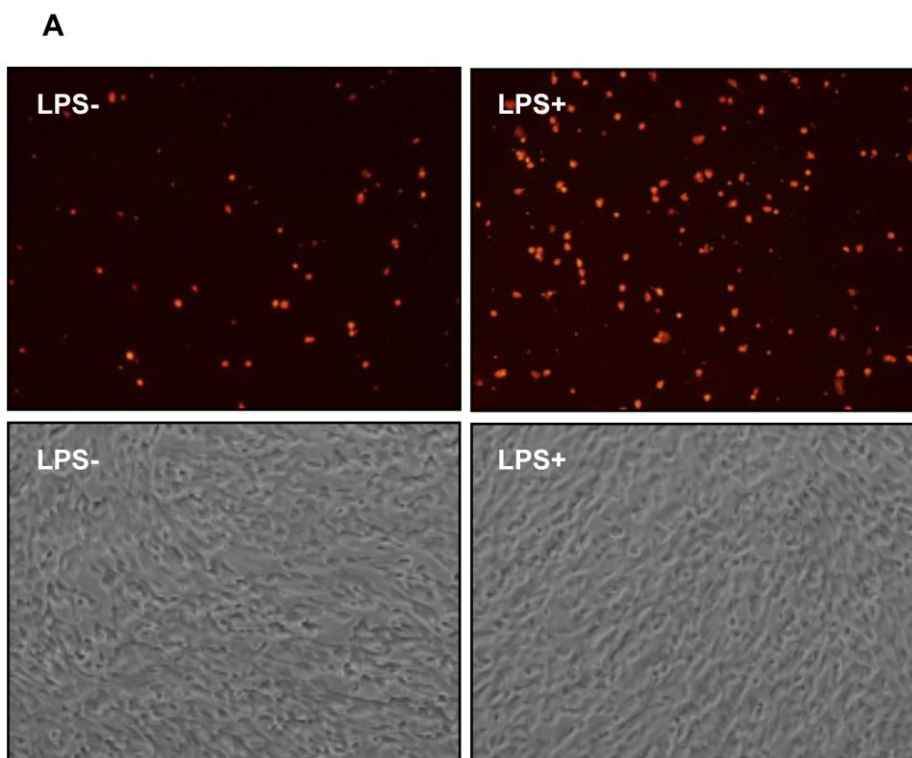
**Figura 13.** Expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en pericitos incubados con LPS a diferentes tiempos.

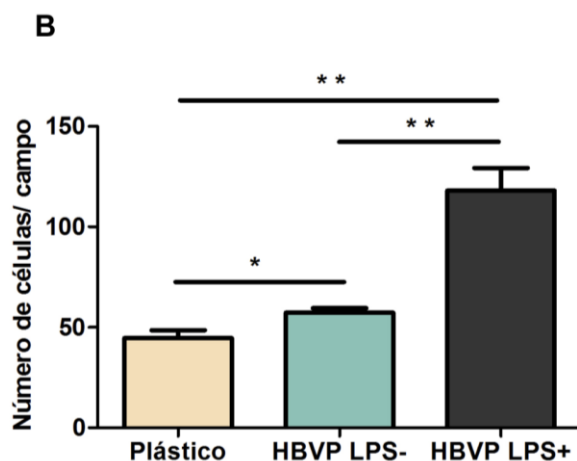
Los pericitos no estimulados mostraban una expresión basal de ICAM-1 y VCAM-1 en superficie (41% y 10% de células positivas, respectivamente). A las 4 horas de tratamiento con LPS, la expresión de ambas proteínas se había incrementado, alcanzando su máximo a las 24 horas, cuando la intensidad media de fluorescencia fue similar para ICAM-1 y VCAM-1 (80% y 78% de células positivas, respectivamente).

### **1.10. Adhesión de células mononucleadas de sangre periférica a pericitos tratados con LPS.**

La relevancia biológica del aumento de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 se confirmó con el incremento significativo de la adhesión de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) a pericitos tratados con LPS. En este ensayo las PBMC se marcaron con el colorante fluorescente PKH26 y se cultivaron sobre monocapas de pericitos que habían sido tratados o no con LPS (Fig. 14a). El número de PBMC adheridas se cuantificó mediante visualización directa bajo el microscopio de fluorescencia de cuatro campos diferentes.

Dado que los pericitos tienen expresión basal de ICAM-1 y VCAM-1, se apreció un mayor número de PBMC adheridas a la monocapa de pericitos que al plástico (57,3 +/- 3,8 y 44,7 +/- 6,6, respectivamente,  $p = 0,045$ ) El tratamiento de pericitos con LPS incrementó la adhesión de PBMC significativamente (118 +/- 19,7 células) en comparación con el plástico y con los pericitos no tratados ( $p = 0,003$  y  $p = 0,005$ , respectivamente) (Fig. 14a y b).





**Figura 14.** Adhesión de células mononucleadas de sangre periférica a pericitos, tratadas o no con LPS. Las células adheridas en tres campos diferentes se cuantificaron bajo un microscopio de fluorescencia (x200 aumentos), \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$ .

## 2. MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL EN PERICITOS Y SU PAPEL EN ANGIOGÉNESIS

### 2.1. Expresión de receptores de la familia Robo en pericitos

#### 2.1.1. PCR cuantitativa

De acuerdo a los datos de los microarrays de ADN, otro de los genes que se expresaba más en pericitos que en MSC era *ROBO4*, que codifica para uno de los receptores de las moléculas de guía axonal Slit. El nivel de expresión génica de los diferentes receptores Robo se analizó en pericitos mediante qRT-PCR. *ROBO3* no presentaba niveles detectables de ARN, pero se comprobó la expresión de *ROBO1*, 2 y 4, siendo los niveles de *ROBO1* y 4 los más elevados (Fig. 15a).

#### 2.1.2. Citometría de flujo

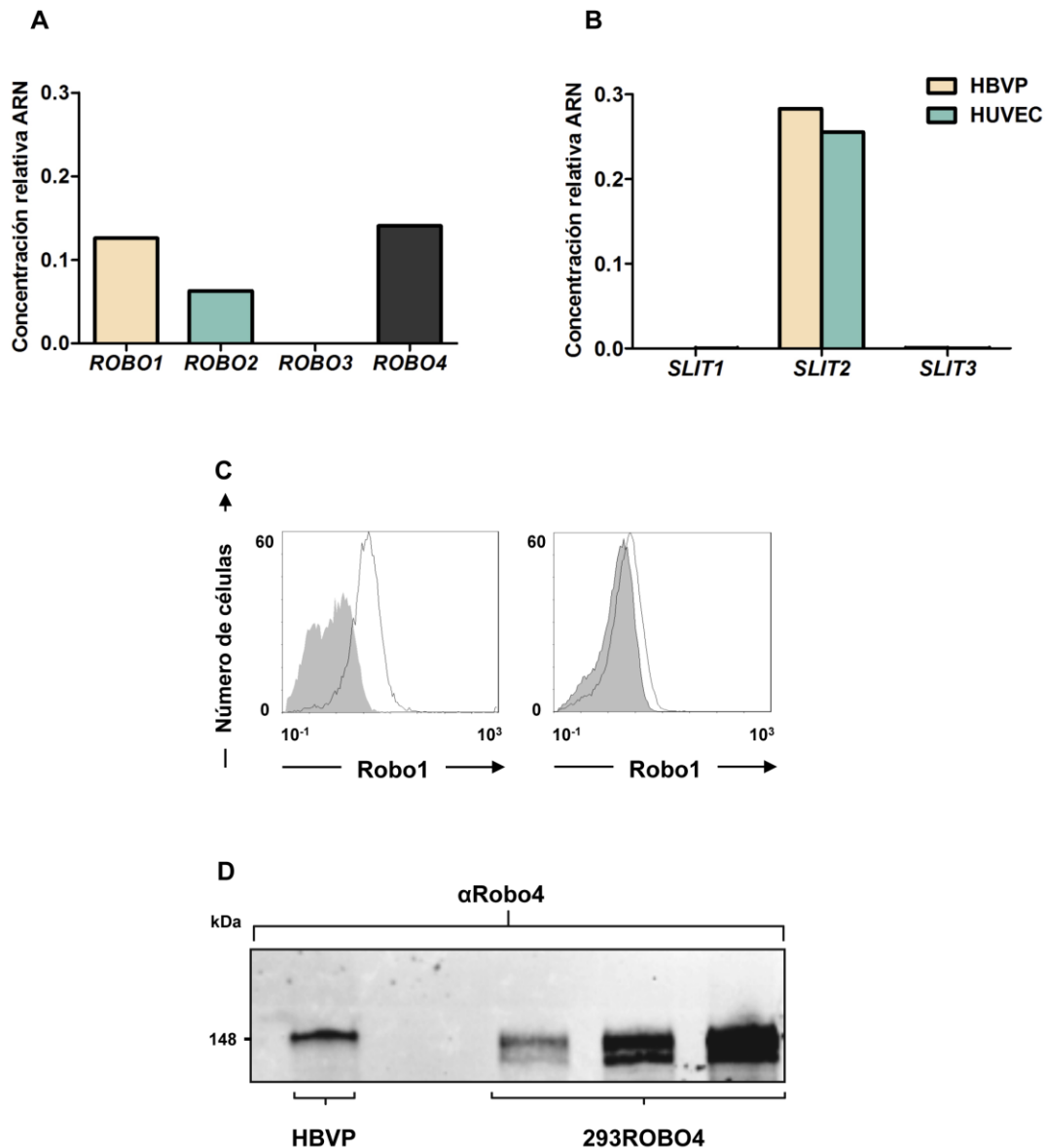
A continuación, quisimos analizar a nivel de proteína la expresión en membrana de los receptores Robo1 y Robo4 por citometría de flujo. A pesar de que los niveles de ARN para ambas moléculas era similares pudimos comprobar que Robo1 se expresaba en pericitos a un nivel medio-alto, mientras que Robo4 se expresa a niveles bajos (Fig. 15c).

#### 2.1.3. Inmunoprecipitación de Robo4

Para confirmar la expresión de Robo4 en pericitos, la proteína fue inmunoprecipitada y analizada mediante transferencia *Western*, utilizando un lisado de células 293ROBO4 como control positivo. Se pudo corroborar así la expresión de Robo4 en pericitos, que aparecía como una banda del peso molecular esperado (en torno a los 150 KDa) (Fig. 15d).

## 2.2. Expresión de la familia Slit en pericitos y células endoteliales

Mediante qRT-PCR se cuantificaron también los niveles de ARN de *SLIT1*, 2 y 3 en pericitos y en CE. Observamos expresión de *SLIT2* en ambos tipos celulares y a unos niveles similares, mientras que la expresión de *SLIT1* y *SLIT3* era indetectable (Fig.15b). Estos datos sugieren que Slit2 producido de forma autocrina por los pericitos o paracrina por las CE, podría actuar como ligando para los receptores Robo 1 y Robo4 expresados en pericitos.



**Figura 15.** Los pericitos expresan Robo1, Robo2, Robo4 y Slit2. A) Análisis de los miembros de la familia *ROBO* por qRT-PCR en pericitos. B) Análisis de los miembros de la familia *SLIT* por qRT-PCR en CE y los pericitos. C) Expresión de Robo1 y Robo4 en la superficie de los pericitos. D) Inmunoprecipitación de Robo4 en pericitos y análisis por transferencia *Western* junto con diferentes concentraciones de lisado de células 293ROBO4 como control positivo.

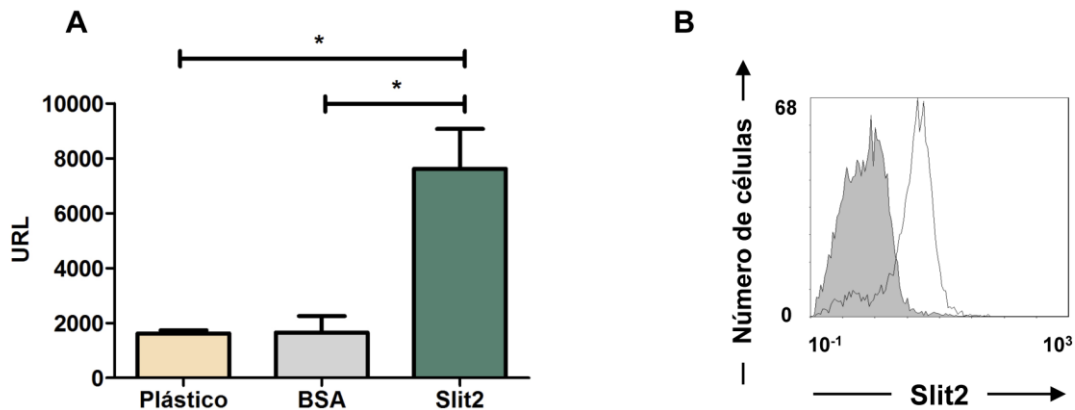
## 2.3. Interacción de Slit2 con receptores de pericitos

### 2.3.1. Ensayos de adhesión celular

Para comprobar si la proteína Slit2 puede unirse efectivamente a los receptores expresados en pericitos, se realizó un ensayo de adhesión celular a Slit2 inmobilizado, utilizando como control negativo albúmina sérica bovina (BSA). Los pericitos se añadieron a los pocillos correspondientes durante 20 minutos de incubación y tras una serie de lavados para eliminar las células no adheridas, se observó que su unión a Slit2 inmobilizado era al menos cuatro veces mayor que a BSA ( $p < 0,05$ ) o plástico ( $p < 0,005$ ) (Fig. 16a).

### 2.3.2. Citometría de flujo

Con el fin de confirmar la unión de Slit2 a la superficie de pericitos, las células en suspensión fueron incubadas con Slit2 recombinante unido a una etiqueta peptídica de histidinas, seguido por un anticuerpo de ratón anti-histidinas y un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con PE. Mediante citometría de flujo se comprobó la unión de Slit2 a la superficie celular de pericitos, confirmando la presencia de receptores para el ligando Slit2. El control negativo se estableció incubando los pericitos con los dos anticuerpos mencionados en ausencia de Slit2 (Fig. 16b).



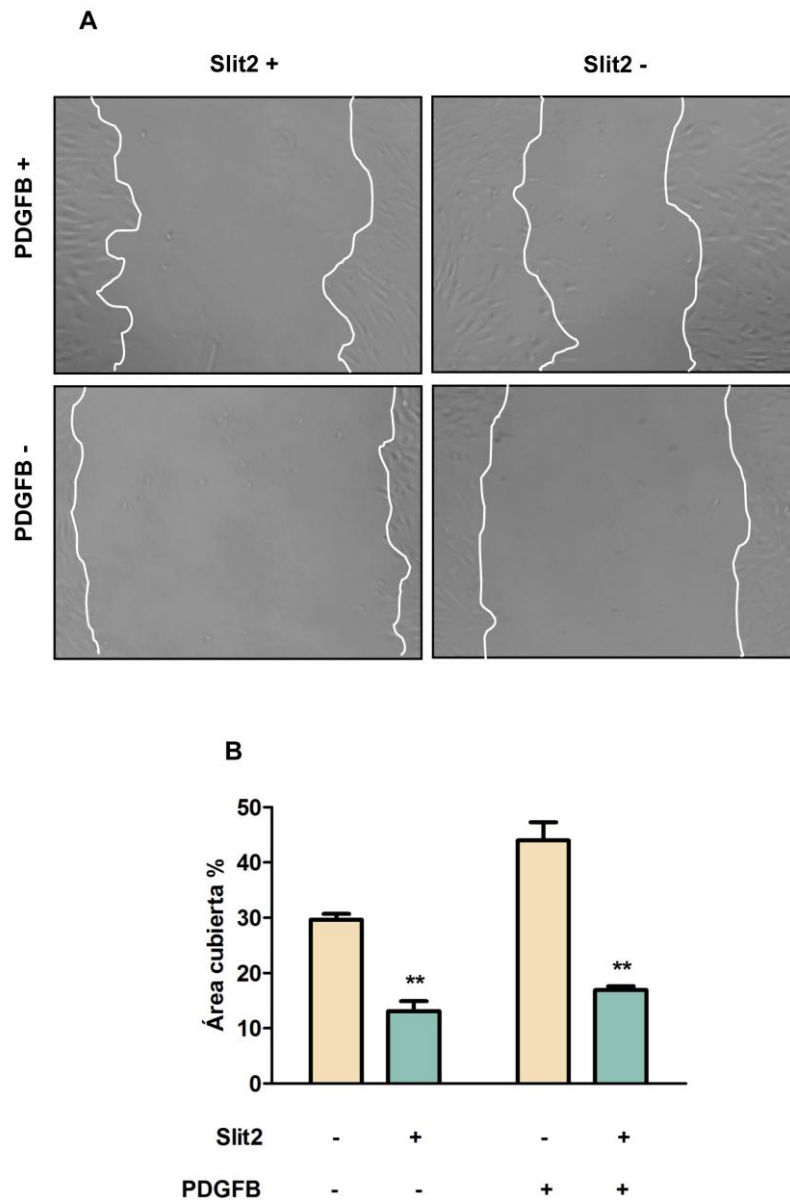
**Figura 16.** Interacción de Slit2 con la superficie de los pericitos. A) Adhesión de pericitos a Slit2 o a BSA inmobilizados en placa, \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ . B) Análisis por citometría de flujo de la unión de Slit2.

## 2.4. Efecto funcional de Slit2 en pericitos

### 2.4.1. Efecto sobre la migración celular

Se había documentado previamente en CE que la interacción de Slit2 con Robo4 podía inhibir su migración. Para estudiar si este efecto se producía también en pericitos, se realizaron

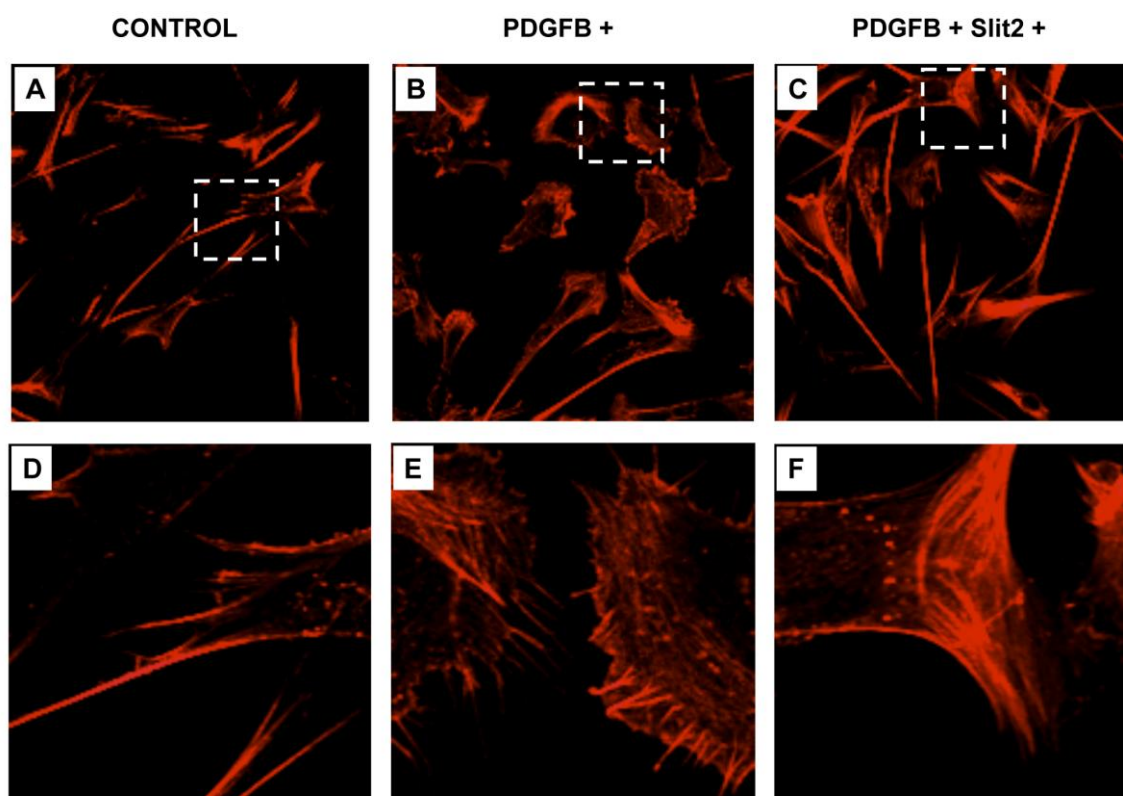
ensayos de *wound healing* con monocapas de pericitos en las que se había producido una solución de continuidad. Al cabo de 8 horas, los pericitos habían cubierto el 40% del área libre de células en presencia de PDGFB y el 30% sin PDGFB. Sin embargo, Slit2 producía un retraso significativo del cierre del área sin células, con una superficie cubierta durante el mismo periodo del 17% y del 13%, respectivamente (Fig. 17). Estos datos sugieren que la proteína Slit2 produce una disminución de la capacidad migratoria de pericitos *in vitro*.



**Figura 17.** A) Ensayo de *wound healing* en pericitos incubados en presencia o ausencia de Slit2 y PDGFB. B) La gráfica muestra el porcentaje de área cubierta por células, \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .

### 2.4.2. Efecto sobre la reorganización del citoesqueleto de actina

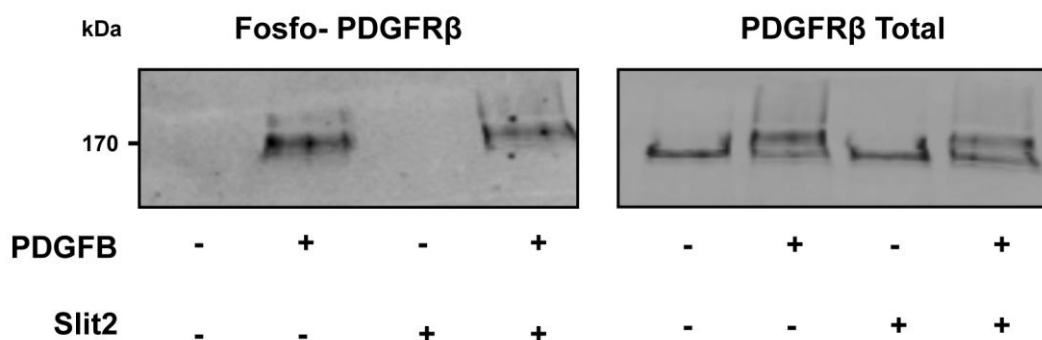
Para estudiar el efecto de Slit2 sobre el citoesqueleto de actina, se cultivaron los pericitos en placas en las que se había inmovilizado fibronectina, en presencia o no de Slit2 y/o PDGFB solubles. A las 5 horas, los filamentos de actina se tiñeron con faloidina marcada con Alexa Fluor 594. Los pericitos no estimulados con PDGFB presentaban una conformación extendida y largas prolongaciones citoplasmáticas, con la actina empaquetada de forma más densa en los bordes de la célula y sin apenas presencia de filopodios o lamelipodios. La incubación con PDGFB producía una modificación en el citoesqueleto de actina que se traducía en un incremento considerable del número de lamelipodios y filopodios, lo que sugiere un fenotipo promigratorio. La adición de Slit2 previene la formación de estas estructuras en presencia de PDGFB y devuelve los pericitos su estado basal (Fig. 18).



**Figura 18.** Imágenes de microscopía confocal en las que se observan los filamentos de actina de pericitos control (A y D), incubados con PDGFB (B y E) o con PDGFB y Slit2 (C y F). Aumento x630. Las imágenes D, E y F son ampliaciones de A, B y C respectivamente.

### 2.4.3. Efecto de Slit2 sobre la activación mediada por PDGFR $\beta$

Para comprobar si Slit2 estaba interfiriendo con la activación de PDGFR $\beta$ , se preincubaron los pericitos con PDGFB durante 10 minutos antes de añadir Slit2 durante otros 30 minutos. La fosforilación de PDGFR $\beta$  en presencia de PDGFB se analizó mediante transferencia *Western*, así como la cantidad de PDGFR $\beta$  total.



**Figura 19.** Análisis por transferencia *Western* del efecto de Slit2 sobre la fosforilación de PDGFR $\beta$ . Slit2 no produjo diferencias significativas en la activación del receptor PDGFR $\beta$ .

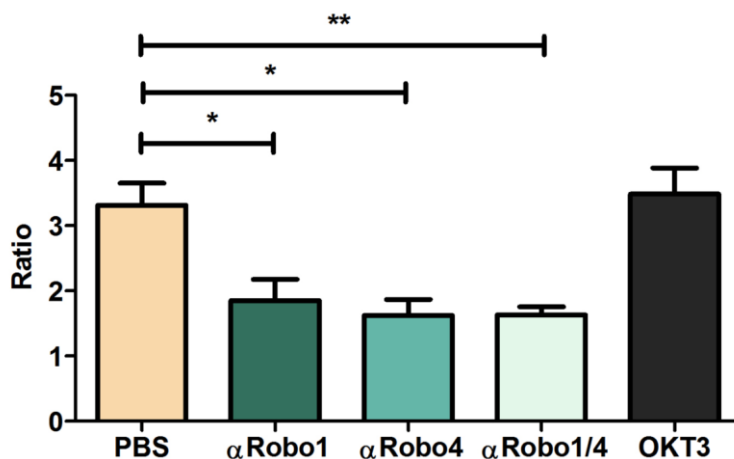
La incubación con Slit2 no afectaba a la activación del receptor en presencia de su ligando, y los niveles totales de PDGFR $\beta$  tampoco se modificaban en presencia de Slit2 o PDGFB. El anticuerpo anti-PDGFR $\beta$  detectaba una doble banda en las células tratadas con PDGFB, correspondiendo la banda de mayor peso molecular a fosfo-PDGFR $\beta$ . Este resultado sugiere que el efecto de Slit2 sobre pericitos es independiente del estado de activación del receptor PDGFR $\beta$  (Fig. 19).

### 2.5. Receptores Robo implicados en los efectos mediados por Slit2

Para determinar si la unión de Slit2 en la membrana de pericitos era mediada por un receptor Robo concreto, incubamos pericitos con anticuerpos bloqueantes anti-Robo1 y/o anti-Robo4, antes de añadir las células a pocillos en los que se había inmovilizado Slit2.

Ambos anticuerpos inhibieron parcialmente la adhesión de pericitos a Slit2 inmovilizado, con unos porcentajes de un 44% con respecto al control para los pericitos tratados con el anticuerpo anti-Robo1 ( $p = 0,034$ ) y de un 52% en el caso del anticuerpo anti-Robo4 ( $p = 0,015$ ). La combinación de ambos anticuerpos no produjo un efecto sinérgico significativo en los niveles de inhibición (51%,  $p = 0,009$ ), (Fig. 20).





**Figura 20.** Bloqueo de la adhesión de pericitos a Slit2 inmovilizado mediante preincubación con anticuerpos frente a Robo1 y/o Robo4. Los datos representan la ratio entre a la adhesión de los pericitos a Slit2 y BSA, \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .

### 3. Moléculas de guía axonal como biomarcadores de respuesta

#### 3.1. Comparación del perfil transcripcional de muestras de pacientes respondedores y no respondedores mediante arrays de qRT-PCR

Dado el importante papel de las moléculas de guía axonal en el proceso angiogénico, parecía probable que su expresión pudiera modular la respuesta a determinados agentes antiangiogénicos. Para comprobar esta hipótesis, se seleccionaron 25 pacientes diagnosticados con cáncer colorectal metastásico (CCR) que habían sido tratados con el anticuerpo monoclonal anti-VEGF bevacizumab y que estaban clasificados como respondedores o no respondedores a la terapia.

A partir de muestras de tejidos parafinados de estos pacientes, tanto de tumor como de mucosa normal, se aisló ARN para estudios de expresión génica mediante arrays de qRT-PCR. El análisis de los resultados de los arrays permitió identificar hasta 18 genes con expresión diferencial en pacientes respondedores y no respondedores (ratio  $> 2$  o  $< 0,5$ ) (Tabla VIII). De los 18 genes, 3 mostraban un incremento de expresión en el grupo de respondedores (ratio  $> 2$ ) y 15 una expresión menor en dicho grupo (ratio  $< 0,5$ ). Usando el test no paramétrico de *Mann-Whitney*, se comprobó que la expresión del gen, *EPHB4*, era significativamente mayor en los pacientes que no respondían al tratamiento con bevacizumab ( $p = 0,045$ ). Por el contrario, el gen que codifica para su ligando, *EFNB2*, no mostró ningún tipo de expresión diferencial. Las características clínico-patológicas de los pacientes agrupados según sus niveles de *EPHB4* se muestran en la Tabla IX. Otros genes que mostraban una tendencia a la sobreexpresión fueron *ANPEP* (aminopeptidasa N, CD13), *CCL11* (Eotaxina-1), *ITGAV* (integrina  $\alpha V$ , CD51) y *VEGFA*, ( $p < 0,1$ ).

**Tabla VIII.** Lista de genes expresados diferencialmente entre pacientes respondedores y no respondedores a bevacizumab, ratio  $> 2$  o  $< 0,5$ .

Gen	Ratio	Valor p	Nombre completo del gen
<i>ANPEP</i>	2.843	0.09	Aminopeptidase N (CD13)
<i>BAIL</i>	0.329	0.28	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
<i>CCL11</i>	12.412	0.09	Chemokine (C-C motif) ligand 11. eotaxin-1
<i>COL4A3</i>	0.478	0.355	Collagen. type IV. alpha 3 chain
<i>CXCL5</i>	0.491	0.355	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
<i>EPHB4</i>	0.446	0.045	EPH receptor B4
<i>EREG</i>	0.451	0.44	Epiregulin
<i>FGF1</i>	0.392	0.355	Fibroblast growth factor 1
<i>HAND2</i>	0.465	0.440	Heart and neural crest derivatives expressed 2
<i>IGF1</i>	0.429	0.440	Insulin-like growth factor 1
<i>IL1B</i>	0.451	0.165	interleukin 1. beta
<i>ITGAV</i>	0.456	0.090	Integrin. alpha V chain (CD51)
<i>KDR</i>	0.397	0.165	Kinase insert domain receptor
<i>MDK</i>	0.491	0.440	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)
<i>PTGS1</i>	2.173	0.440	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1
<i>THBS2</i>	0.290	0.123	Thrombospondin 2
<i>TIMP2</i>	0.502	0.217	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
<i>VEGFA</i>	0.342	0.064	Vascular endothelial growth factor A

### 3.2. Asociación de EPHB4 con la respuesta terapéutica

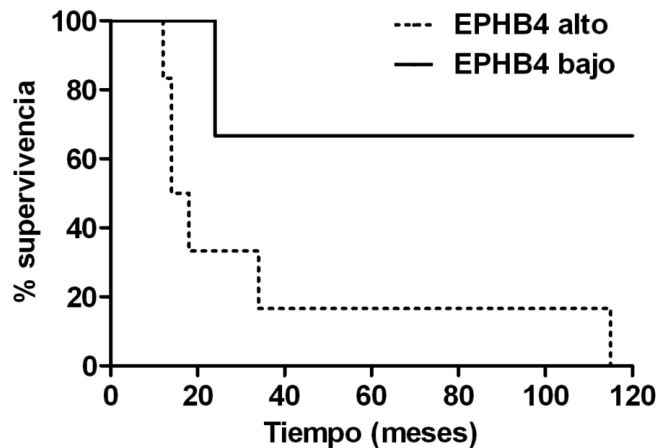
Para comprobar si *EPHB4* podría utilizarse como factor predictivo de respuesta al tratamiento con bevacizumab, se estableció el punto de corte en los niveles de expresión de *EPHB4* mediante un análisis ROC (*Receiver-Operating Characteristic*) que permitió dividir a los pacientes en dos grupos, de alta y de baja expresión. Observamos que todos los pacientes del grupo de baja expresión de *EPHB4* respondieron al tratamiento con bevacizumab, pero sólo un tercio de los pacientes del grupo de alta expresión de *EPHB4* se encontraban entre los respondedores ( $p = 0,021$ , test de *Fisher*) (Tabla IX). La sensibilidad y la especificidad del modelo fueron del 100% y 77,78%, respectivamente.

**Tabla IX.** Características clínico-patológicas de los pacientes de baja o alta expresión de *EPHB4*

Variable	Total(%)	<i>EPHB4</i> reducido	<i>EPHB4</i> elevado	Valor p
<b>Sexo n (%)</b>				
Hombre	5 (38.5%)	3 (42.9%)	2 (33.3%)	
Mujer	8 (61.5%)	4(57.1%)	4 (66.7%)	1.0 <sup>1</sup>
<b>Edad (años)</b>				
media+/-DE	59+/-9.9	61.3+/-6.7	56.3 +/-13.6	0.30 <sup>2</sup>
<b>Grado de diferenciación, n (%)</b>				
Moderadamente diferenciado	7 (53.8%)	4 (57.1%)	3 (50%)	
Poco diferenciado	6 (46.2%)	3 (42.9%)	3 (50%)	1.0 <sup>1</sup>
<b>Respuesta a bevacizumab, n (%)</b>				
Si	9 (69.2%)	7 (100%)	2 (33.3%)	
No	4 (30.8%)	0	4 (66.7%)	0.021 <sup>1</sup>
<b>Supervivencia, n (%)</b>				
Si	5 (38.5%)	5 (71.4%)	0	
No	8 (61.5%)	2 (28.6%)	6 (100%)	0.021 <sup>1</sup>

### 3.3. Asociación de *EPHB4* con supervivencia

El test de *Fisher* permitió asociar la elevada expresión de *EPHB4* con baja supervivencia global de los pacientes ( $p = 0,021$ ). Ninguno de los pacientes con alta expresión de *EPHB4* sobrevivió al final del estudio, sin embargo, el 71,4% de los pacientes con reducidos niveles de *EPHB4* sí lo hicieron. El valor de la mediana de la supervivencia de los pacientes con alta expresión de *EPHB4* fue de 16 meses, mientras que en el caso de los pacientes con baja expresión de *EPHB4* fue de 48 meses. Las curvas de supervivencia para ambos grupos se construyeron usando el método de *Kaplan-Meier* y se compararon entre sí mediante el test *log-rank* (Fig. 21), demostrándose una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia de los pacientes con niveles elevados y reducidos de *EPHB4* ( $p = 0,012$ ). Estos resultados fueron confirmados con el modelo de regresión de *Cox* ( $p = 0,031$ ). La influencia de la expresión de *EPHB4* en la supervivencia era independiente de la edad, género y grado histológico del tumor. Para distinguir si los niveles de *EPHB4* tenían un verdadero valor predictivo de respuesta al tratamiento y no un valor pronóstico independiente del mismo, analizamos la expresión de *EPHB4* en muestras de un grupo independiente de 21 pacientes con CCR metastásico que habían sido tratados con quimioterapia pero no con bevacizumab, y estudiamos la correlación entre los niveles de *EPHB4* y la supervivencia.

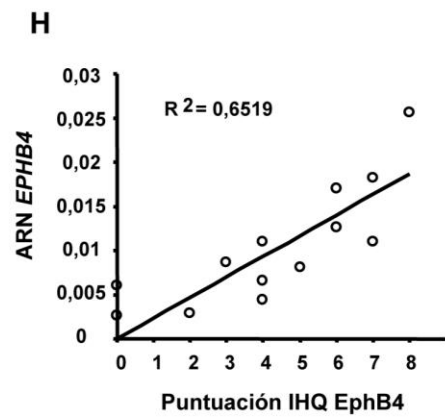
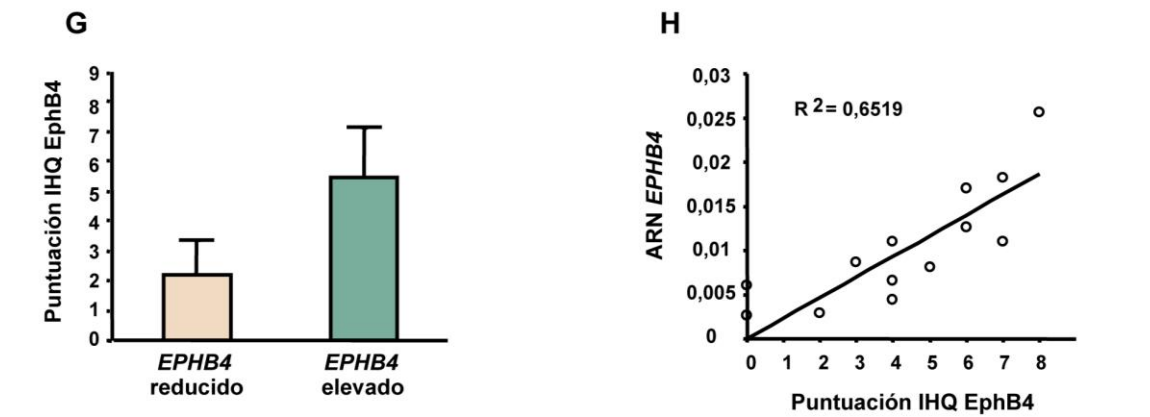
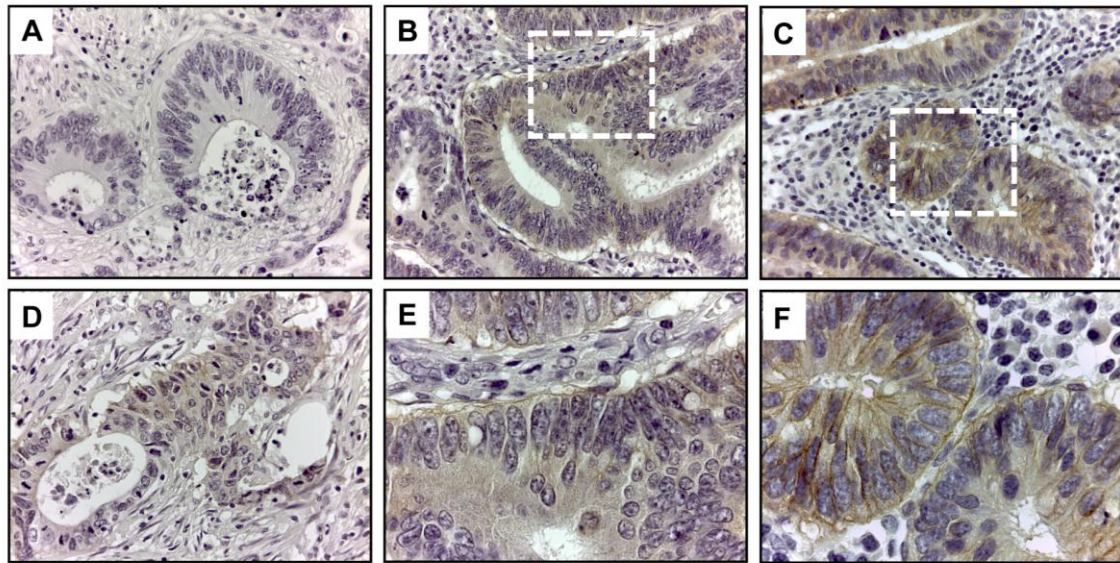


**Figura 21.** Curvas de supervivencia de los pacientes tratados con bevacizumab según sus niveles de expresión de *EPHB4* ( $p = 0,021$ ).

No se detectaron diferencias significativas en la supervivencia global de este grupo de pacientes de acuerdo a los niveles de ARN de *EPHB4* ( $p = 0,253$ ). Estos datos en su conjunto sugieren que la expresión de *EPHB4* podría ser útil como biomarcador predictivo para la respuesta al tratamiento con bevacizumab.

### 3.4. Validación inmunohistoquímica de los arrays de qRT-PCR

Para validar los resultados obtenidos con los arrays de qRT-PCR a nivel de proteína, se realizó un estudio inmunohistoquímico en las mismas muestras de tejido de las que se había extraído ARN. La expresión de EphB4 fue significativamente mayor, de intensa a moderada, en las secciones tisulares del grupo de pacientes de expresión elevada de *EPHB4*, en comparación con los pacientes del grupo de reducida expresión, en el que la tinción de EphB4 fue débil o ausente. La figura 22a muestra el control negativo en el que se ha omitido el anticuerpo primario anti-EphB4. Las imágenes 22b, 22c y 22d, muestran diferentes niveles de intensidad de la tinción de EphB4. EphB4 aparecía de forma difusa en el citoplasma de las células, aunque a mayor aumento (400x) se podía observar una tinción discontinua de la membrana basolateral, más llamativa en las muestras con mayor expresión de *EPHB4*, (Fig. 22e, 22f). Las diferencias en las valoraciones del nivel de tinción de las muestras de los grupos de baja y alta expresión de *EPHB4* fueron estadísticamente significativas ( $t$  de *Student*,  $p = 0,002$ ) (Fig. 22g). Por otra parte, los niveles de tinción valorados por IHQ se correlacionaron significativamente con los niveles de expresión de ARN obtenidos mediante qRT-PCR (Fig. 22h).



**Figura 22.** Validación inmunohistoquímica de la expresión de EphB4 A) Control negativo. B-D) Diferentes niveles de tinción de EphB4. Amplificación x400. E y F) Ampliación de las imágenes B y C. F) Imagen que muestra la tinción de la membrana basolateral discontinua. G) Puntuaciones IHQ (media ± DE) de las muestras de baja/alta expresión de *EPHB4*.

### 3.5. Comparación del perfil transcripcional de muestras de tejido sano y tumoral

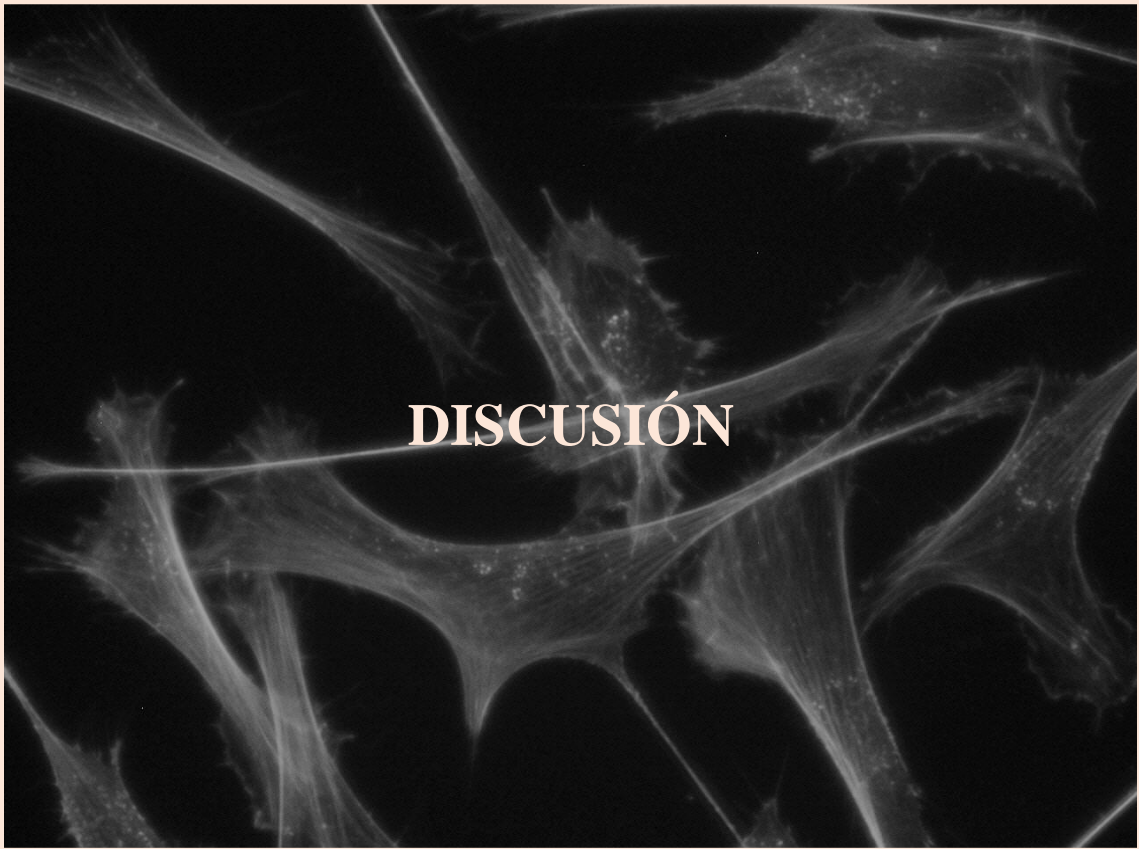
Aunque el principal objetivo de este trabajo era la identificación de biomarcadores predictivos de respuesta a bevacizumab en muestras tumorales, se analizaron conjuntamente bloques de mucosa de colon normal de los mismos pacientes. En total se obtuvieron muestras de tejido sano de 10 pacientes de las que se extrajo ARN y se analizaron mediante arrays de qRT-PCR comparando su perfil de expresión génica con el de las muestras de CCR, identificando mediante la prueba *U* de *Mann-Whitney* dos genes, *THBS2* y *ANPEP*, expresados

diferencialmente a niveles estadísticamente significativos ( $p = 0,019$ ) entre el tejido tumoral y el sano (Tabla X).

**Tabla X.** Genes expresados diferencialmente en tejido tumoral y sano.

<b>Gen</b>	<b>Ratio</b>	<b>Valor p</b>	<b>Nombre completo del gen</b>
<i>ANPEP</i>	0.463	0.019	Aminopeptidase N (CD13)
<i>CXCL10</i>	2.322	0.266	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
<i>CXCL5</i>	2.256	0.412	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
<i>EREG</i>	3.868	0.292	Epiregulin
<i>IGF1</i>	2.068	0.242	Insulin-like growth factor 1
<i>IL-8</i>	2.356	0.558	Interleukin 8
<i>MMP9</i>	2.618	0.061	Matrix metallopeptidase 9
<i>PTGS1</i>	0.339	0.380	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1
<i>THBS2</i>	4.226	0.019	Thrombospondin 2









## 1. PERICITOS, NUEVOS PARTICIPANTES EN LA RESPUESTA INMUNE

A pesar de que los pericitos fueron descritos por primera vez hace casi ciento cincuenta años, su papel ha estado limitado en general al meramente estructural. En la actualidad se acepta que los pericitos son reguladores clave de la morfogénesis vascular en el desarrollo de los vasos sanguíneos y participan activamente en el control de la homeostasis y en la maduración y estabilización de los vasos en el adulto, pero solo muy recientemente se han empezado a estudiar funciones que van más allá de su estrecha interacción con la CE.

Con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre aspectos funcionales del pericito nos propusimos comparar su perfil transcripcional con el de las MSC. Este estudio comparativo surge del creciente número de trabajos que relacionan ambos tipos celulares desde el punto de vista ontogénico, relación que se traduce en gran medida a nivel fenotípico. Para buscar diferencias en el perfil de expresión génica de pericitos y MSC que pudieran orientarnos hacia nuevas funciones del pericito, utilizamos microarrays de ADN. Entre los genes más representados en pericitos en relación con MSC se encontraba *TLR4*, el clásico receptor de moléculas PAMP (como LPS) y DAMP (como HMGB1). Este dato resultaba de gran interés, ya que de confirmarse su expresión en la membrana de los pericitos conferiría a éstos un más que probable papel en la respuesta inflamatoria. En la literatura previa solo existen cuatro trabajos, de dos grupos diferentes, que hayan documentado algún tipo de respuesta de pericitos a LPS (Edelman et al., 2006b, 2007a, 2007b; Kovac et al., 2011) sin llegar a estudiar la expresión de *TLR4* en membrana y utilizando células procedentes de rata o de ratón. En el caso de las moléculas DAMP, no existe información alguna sobre la capacidad de respuesta de pericitos de cualquier especie. Esta situación contrasta con la de las CE, cuya implicación en el desarrollo de los procesos inflamatorios ha sido ampliamente estudiada en numerosos trabajos (Danese et al., 2007; Mai et al., 2013; Young, 2012).

Al analizar mediante citometría de flujo la expresión de *TLR4* en la superficie demostramos por primera vez la expresión de *TLR4* en pericitos humanos. Curiosamente y a pesar de que los niveles de ARN de *TLR4* eran similares a los de *SDHA*, la expresión de la proteína resultó ser relativamente modesta. Esta observación podría estar relacionada con la presencia del receptor en compartimentos intracelulares, tal como se ha documentado en células epiteliales humanas, que sin embargo conservan la capacidad de responder a LPS (Guillot et al., 2004). La estimulación con LPS produce un aumento de la expresión de *TLR4* en la superficie de los pericitos, a pesar de que no se observaron cambios a nivel de ARN, lo que podría apoyar la teoría de una posible relocalización de la proteína desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática.

La expresión de *TLR4* por sí sola, no implica directamente una capacidad de respuesta a LPS o a HMGB1. Gracias a estudios sobre la activación de *TLR4* en monocitos y macrófagos, se conoce que para generar una respuesta efectiva a LPS, es necesaria la participación de un

repertorio de moléculas que facilitan la activación de TLR4 y la posterior señalización intracelular. Entre estas moléculas se encuentran las proteínas MD-2 y CD14 que forman el complejo receptor junto con TLR4, y la proteína adaptadora MyD88 que promueve la transducción de la señal (Medzhitov, 2007). La expresión de estas moléculas en pericitos no estaba previamente documentada, así que procedimos a estudiarla mediante transferencia *Western*, comprobando que los pericitos expresan constitutivamente MD-2 y MyD88, pero no CD14. El receptor CD14 se puede encontrar como receptor de membrana unido mediante un anclaje GPI o de forma soluble (sCD14). Dado que las CE no expresan tampoco CD14 en su membrana, y su capacidad de respuesta a LPS está ampliamente reconocida, se ha sugerido que requieren la presencia del sCD14 del plasma (Pugin et al., 1993). En nuestros experimentos los pericitos se han tratado con LPS en ausencia de suero, así que se puede asumir que la activación del complejo receptor TLR4 que caracterizamos es independiente de CD14.

Se ha descrito que la cascada de señalización puesta en marcha por TLR4 se traduce en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y/o de diferentes MAP quinasas (MAPK). La translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en pericitos tratados con LPS demuestra la activación de este factor de transcripción, aunque no pudimos demostrar la implicación de las proteínas MAPK analizadas (JNK1-2, MEK1 y p38) en la respuesta a LPS. Este dato contrasta con lo publicado sobre las CE, ya que se ha descrito la activación de p38 tras la estimulación con LPS tanto en células HUVEC como en células endoteliales de microvasculatura (Li et al., 2012; Yan et al., 2002).

TLR4 es también el receptor de diferentes ligandos endógenos como HMGB1. El efecto proinflamatorio de HMGB1 ha sido descrito en diversos tipos celulares, incluyendo monocitos (Andersson et al., 2000; Yang et al., 2010a), neutrófilos (Park et al., 2003a), células dendríticas (Messmer et al., 2004), células endoteliales (Treutiger et al., 2003) y fibroblastos (Rossini et al., 2008). En este trabajo, demostramos que los pericitos también pueden ser activados por HMGB1, aunque su efecto sobre la expresión génica y la secreción de proteínas es inferior al producido por LPS, como ya se había observado en células HUVEC (Treutiger et al., 2003). De hecho, se ha propuesto que HMGB1 solo es capaz de ejercer su efecto pro-inflamatorio cuando forma un complejo con LPS (Youn et al., 2008). Por otro lado, también se ha sugerido que la activación óptima de TLR4 mediada por HMGB1 requiere la presencia de CD14, al menos en macrófagos murinos (Kim et al., 2013).

El estudio mediante microarrays de ADN del perfil transcripcional de pericitos estimulados con LPS reveló un patrón clásico de respuesta a estímulos pro-inflamatorios, con la sobreexpresión de genes de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión. A nivel de proteína demostramos la secreción de CXCL1, CXCL2, CXCL3, IL-8, CCL2 e IL-6 al medio condicionado de pericitos tratados con LPS. Curiosamente, el patrón de citoquinas y quimioquinas producidas por los pericitos humanos es diferente al de pericitos de ratón,

recientemente publicado (Kovac et al., 2011). En dicho estudio, la estimulación con LPS daba lugar a un incremento significativo en la producción de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, G-CSF, GM-CSF y CCL5, que fueron indetectables en el nuestro. Tanto los pericitos de ratón como los humanos producían CCL2 y CXCL1 en respuesta a LPS, pero en ningún caso hubo secreción detectable de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 o IL-5. Estos datos apoyan la hipótesis de que existen diferencias entre especies en la respuesta inflamatoria de los pericitos, como ya se ha documentado en las CE (Pober and Tellides, 2012).

Por otra parte, el perfil de los genes sobreexpresados en pericitos humanos tratados con LPS es muy similar al de las CE. Así, se ha documentado que el LPS induce en CE de la arteria coronaria humana (HCAEC) la liberación de IL-6, IL-8 y CCL2 pero no de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  o IL-10 (Zeuke et al., 2002), al igual que sucede en pericitos. Curiosamente, en el mismo trabajo sobre HCAEC se documentó un incremento de ARN de *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  y *TNF- $\alpha$*  que no se tradujo a nivel de proteína, fenómeno similar al que hemos observado en pericitos.

CXCL1, CXCL2, CXCL3 e IL-8 pertenecen a la familia de quimioquinas CXC con un motivo ELR N-terminal que poseen un conocido efecto pro-angiogénico (Keeley et al., 2011). Los receptores para estas quimioquinas son CXCR1 y CXCR2, que se expresan en la superficie de las CE (Li et al., 2002; Singh et al., 2011). En un trabajo reciente se observó que el *knockdown* específico de *CXCR1* y/o *CXCR2* en CE humanas inhibe su supervivencia, proliferación y migración, así como de la formación de capilares *in vitro* (Singh et al., 2011). Por su parte, CCL2 es el miembro de la familia de quimioquinas CC mejor estudiado como mediador de procesos de neovascularización. Se ha demostrado que las CE también expresan el receptor de CCL2, CCR2 que media la quimiotaxis y la formación de estructuras capilares en respuesta a CCL2 tanto *in vitro* (Gálvez et al., 2005; Stamatovic et al., 2006) como *in vivo* (Goede et al., 1999). El perfil de secreción de quimioquinas por parte de los pericitos en presencia de un estímulo proinflamatorio puede arrojar nueva luz sobre las interacciones CE-pericito, sugiriendo un papel dual de los pericitos en función de su estado de activación. En condiciones fisiológicas normales, los pericitos son esenciales para la estabilidad del endotelio en reposo (Barlow et al., 2013); sin embargo, los pericitos activados podrían actuar como promotores de la angiogénesis durante los procesos inflamatorios.

Las quimioquinas secretadas por los pericitos pueden potenciar el reclutamiento de leucocitos a los lugares de inflamación, como se ha documentado ampliamente para las CE. Los receptores CXCR1 y CXCR2, además de expresarse en CE lo hacen en neutrófilos, monocitos, ciertos subtipos de células T, células NK, basófilos y mastocitos. El receptor CCR2, se expresa en monocitos, células B, células T activadas y células dendríticas. De hecho un estudio reciente revela que los pericitos peritumorales son capaces de modular la composición del infiltrado inflamatorio gracias a la secreción de CCL2 en melanoma humano (Samaniego et al., 2013).

En los pericitos activados con LPS se detectó además la sobreexpresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Un trabajo reciente ha demostrado que los pericitos pueden facilitar la transmigración de los neutrófilos a través de las paredes de las vénulas postcapilares en respuesta a estímulos proinflamatorios *in vivo*, de una manera dependiente de la expresión de ICAM-1 (Proebstl et al., 2012; Wang et al., 2012). Es más, los pericitos son capaces de “instruir” con señales migratorias a neutrófilos y monocitos durante el proceso de extravasación (Stark et al., 2013).

Por otro lado, los pericitos también pueden interactuar con las células T y modular la respuesta inmune adaptativa. Así, la sobreexpresión de VCAM-1 por parte de pericitos de cerebro humano estimulados con TNF- $\alpha$ , incrementaba la adhesión de células T (Verbeek et al., 1995). Más recientemente se ha descrito que los pericitos de retina son capaces de inhibir la proliferación de las células T (Tu et al., 2011) y se ha demostrado que los pericitos de placenta pueden regular negativamente la activación de las células T (Maier and Pober, 2011). De la misma manera pero en un contexto diferente, se ha podido comprobar como los pericitos derivados de tumor son capaces de inducir un estado de anergia en las células T (Bose et al., 2013).

Los pericitos están estrechamente relacionados con las MSC, a las que se ha atribuido una función inmunosupresora (Nauta and Fibbe, 2007), en sintonía con los trabajos comentados anteriormente. Sin embargo, en un contexto inflamatorio ambas células podrían dar lugar a efectos diferentes. Hemos demostrado que los pericitos estimulados con LPS promueven fenómenos inflamatorios mediante la sobreexpresión de una serie de factores solubles y moléculas de membrana. Sin embargo, las MSC parecen tener un efecto anti-inflamatorio y mejoran la supervivencia de los ratones en diferentes modelos de sepsis inducida por LPS (Gonzalez-Rey et al., 2009; Matthay et al., 2010; Xu et al., 2007).

En conclusión, la activación de los pericitos mediante LPS o HMGB1 pone en marcha un complejo programa pro-inflamatorio y pro-angiogénico en un contexto de infección o de inflamación estéril, respectivamente. Los pericitos pueden por tanto considerarse miembros activos en la respuesta inmune.

## **2. PERICITOS Y MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL, IMPLICACIONES EN UN CONTEXTO ANGIOGÉNICO**

*ROBO4* era otro de los genes, que de acuerdo a los datos de los microarrays de ADN, se expresaba con más abundancia en pericitos que en MSC. Como la presencia de Robo4 en pericitos no se había descrito previamente, decidimos estudiar su expresión en membrana y las consecuencias funcionales de su interacción con el ligando Slit2. De los tres miembros de la familia Slit, seleccionamos Slit2 porque era el único cuya expresión a nivel de ARN se demostró tanto en pericitos como en CE. Dos trabajos previos con VSMC de aorta humana y de

las vías respiratorias de rata habían demostrado que Slit2 inhibía su migración (Liu et al., 2006) (Ning et al., 2011), y este mismo efecto fue el que observamos en pericitos.

Sin embargo, Robo4 no es el único receptor de Slit2 presente en pericitos, ya que también pudimos detectar la expresión de Robo1. De hecho, la capacidad de Robo4 para unirse a Slit2 se encuentra actualmente cuestionada. Los miembros de la familia Slit2 son proteínas multidominio con repeticiones ricas en leucina (LRR). Los receptores Robo pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y Robo1, Robo2 y Robo3 presentan en su porción extracelular cuatro o cinco dominios Ig, mientras que Robo4 solo conserva dos. Se ha descrito que la interacción Robo1-Slit2 tiene lugar entre el segundo dominio LRR de Slit 2 y los dos dominios Ig N-terminales de Robo1 (Morlot et al., 2007), ausentes en Robo4.

Esto no impidió que en uno de los primeros trabajos en los que se describió Robo4, Park et al. demostraran la coimmunoprecipitación de Robo4 y Slit2-myc y que el medio condicionado de células HEK-Slit2-myc inhibía la migración de HEK transfectadas con Robo4, pero no de las HEK control. Más recientemente, se documentó que Slit2 inhibía la migración y la formación de estructuras de tipo capilar en CE aisladas de ratones Robo4<sup>+/+</sup>, pero este efecto no se observaba en las de ratones Robo4<sup>AP/AP</sup> en los que se había sustituido el gen *ROBO4* por el de la fosfatasa alcalina (del inglés *Alkaline Phosphatase*, AP) (Jones et al., 2009). La activación de Robo4 por Slit2 inhibiría la cascada de señalización puesta en marcha por VEGF, disminuyendo la permeabilidad de los vasos, estabilizando la vasculatura y evitando la angiogénesis aberrante en un modelo de retinopatía en ratones Robo4<sup>+/+</sup>, pero no en Robo4<sup>AP/AP</sup>. En otro trabajo del mismo grupo, la administración exógena del fragmento activo N-terminal de Slit2 era capaz de inhibir de forma dependiente de Robo4 la hiperpermeabilidad vascular inducida por LPS in vivo, incrementando la supervivencia de los ratones Robo4<sup>+/+</sup> (London et al., 2010).

Aunque estos estudios sugieren una interacción directa entre Robo4 y Slit2, otros grupos no han conseguido demostrarla. Así, se observó la unión a Robo1 de Slit-1, -2, y -3 mediante inmunoprecipitación y BiaCore, pero no a Robo4 (Suchting et al., 2005). En un trabajo más reciente se analizó la unión de una librería de proteínas secretadas y dominios extracelulares a Robo4-Fc, y sorprendentemente la interacción más específica se producía entre Robo4 y UNC5B, conocido como receptor de netrinas (Koch et al., 2011). Es más, se comprobó por SPR (Surface plasmon resonance) que Robo4 y la netrinal se unían a diferentes dominios de UNC5B, pero no se observó unión de Robo4 a Slit2.

Para añadir más complejidad al tema, algunos autores plantearon la posible formación de heterodímeros Robo1-Robo4 capaces de unir Slit 2 al observar la coimmunoprecipitación de ambos receptores (Sheldon et al., 2009) (Kaur et al., 2008).

En este contexto, los datos obtenidos con los anticuerpos bloqueantes anti-Robo1 y anti-Robo4 en ensayos de inhibición de la unión de pericitos a Slit2 ofrecen interesantes implicaciones. Con cada uno de ellos por separado se apreció una inhibición significativa pero

no total de la adhesión a Slit2. Esto supone que Robo4 expresado por pericitos participa efectivamente en la unión a Slit2, apoyando los trabajos previos en los que se describe dicha interacción. Sin embargo, la combinación de ambos anticuerpos no tuvo ningún efecto aditivo.

Este hecho puede ser atribuido a la contribución de otros potenciales receptores distintos de los de la familia Robo. Alternativamente, esta observación sería compatible con la formación de heterodímeros Robo1-4, con los anticuerpos compitiendo por la unión a epítomos solapantes. Como se comentó en la introducción, se ha descrito una serie moléculas solubles y de membrana que modulan la interacción pericito-CE, promoviendo la estabilización de dicha interacción y el mantenimiento de vasos quiescentes, o favoreciendo su desestabilización como parte del proceso angiogénico. Con este trabajo, proponemos la vía Slit2/Robo como un nuevo componente implicado en esta regulación.

### **3. MOLÉCULAS DE GUÍA AXONAL COMO POTENCIALES BIOMARCADORES PREDICTIVOS**

Uno de los principales problemas a los que se enfrentan las terapias antiangiogénicas es la resistencia intrínseca o adquirida al tratamiento. El avance en el conocimiento de los mecanismos implicados y la identificación de biomarcadores predictivos de respuesta a dichos tratamientos resultan por tanto necesarios. Nuestro estudio con pacientes de CCR tratados con el anticuerpo monoclonal anti-VEGF bevacizumab sugiere que los pacientes con niveles elevados de *EPHB4* serían menos susceptibles a beneficiarse de esta terapia.

EphB4 y su ligando efrinaB2 intervienen en la diferenciación arteriovenosa durante el desarrollo embrionario y regulan la formación y maduración de nuevos vasos sanguíneos en el adulto, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Noren et al., 2006; Wang et al., 2010). De hecho, la inhibición de la señalización EphB4-efrinaB2 con formas truncadas solubles del receptor (sEphB4), anticuerpos monoclonales anti-EphB4 o anti-efrinaB2, inhibidores tirosín-kinasas de EphB4 o péptidos antagonistas reduce la angiogénesis y el crecimiento tumoral en modelos preclínicos de distintos tipos de cáncer (Djokovic et al., 2010; Kertesz et al., 2006; Krasnoperov et al., 2010; Martiny-Baron et al., 2010; Noberini et al., 2011; Abengozar et al., 2012; Ferguson et al., 2013; Hasina et al., 2013).

Ya que esta vía es independiente de la de VEGF-VEGFR, el tratamiento combinado con anticuerpos anti-VEGF y anti-efrinaB2 o EphB4 soluble incrementa el efecto terapéutico en un modelo de glioblastoma humano (Li et al., 2011). Un estudio reciente en un modelo de mesotelioma demostró que la combinación de sEphB4 con bevacizumab no solo tenía un efecto mayor que el de cada agente por separado sino que promovía la regresión tumoral completa (Liu et al., 2013) Es más, el bloqueo de la señalización EphB4-efrinaB2 conseguía revertir la resistencia a la terapia anti-VEGF *in vivo*, lo que apoya la existencia de una sinergia entre las dos vías (Li et al., 2011). Este trabajo sustenta la hipótesis de que la expresión elevada de

*EPHB4* podría compensar la inhibición de la angiogénesis mediada por bevacizumab, en clara concordancia con el resultado de nuestro estudio, en el que los pacientes con expresión reducida de *EPHB4* son más sensibles al bloqueo de VEGF.

Además de su papel en angiogénesis, la expresión de *EPHB4* tiene un efecto funcional directo sobre el tumor (Kumar et al., 2009; Liu et al., 2002; Stephenson et al., 2001), y niveles elevados de *EPHB4* se han correlacionado con progresión de la enfermedad y reducción de la supervivencia (Kumar et al., 2007, 2009; Noren and Pasquale, 2007). Esta función promotora de tumor se puso de manifiesto en los ratones dobles transgénicos para *EPHB4* y neuT (homólogo de *HER2*), que desarrollaban carcinomas de mama más rápidamente que los ratones neuT y que a diferencia de éstos presentaban metástasis pulmonares (Munarini et al., 2002).

Este no deja de ser un tema controvertido, ya que otros estudios postulan a *EPHB4* como un factor supresor de tumores (Doposo et al., 2009; Noren et al., 2006), de modo que los niveles reducidos de *EPHB4* en pacientes con CCR se relacionarían con mal pronóstico. En otro trabajo, la pérdida de expresión de *EPHB4* se correlaciona con el grado de malignidad en pacientes con CCR (Davalos et al., 2006). Es más, en ratones *Apc* [Min/+] (modelo de poliposis adenomatosa familiar) que desarrollan espontáneamente adenomas en el intestino delgado, pero no adenocarcinomas, la reducción de la expresión de *EPHB4* promueve la progresión maligna (Batlle et al., 2005).

Todo ello pone de manifiesto que el papel de EphB4 en la progresión tumoral es más complejo de lo que cabía esperar (Noren and Pasquale, 2007; Xiao et al., 2012). De hecho, evidencias recientes apuntan a un papel dual de EphB4 como promotor o supresor de tumores determinado por la ausencia o presencia de su ligando efrinaB2 (Rutkowski et al., 2012). La sobreexpresión de EphB4 en ausencia de efrinaB2 determinaría la señalización independiente de ligando y contribuiría al crecimiento tumoral. En cambio, este efecto se revertiría en presencia de efrinaB2, sugiriendo que la señalización dependiente de ligando suprime el crecimiento tumoral.

En nuestro trabajo comparamos también la expresión génica de las muestras de CCR con la mucosa colónica normal de los mismos pacientes, identificando dos genes expresados de forma diferencial. *THBS2*, que codifica la trombospondina 2, un inhibidor endógeno clásico de angiogénesis, mostró mayor expresión en las muestras de CCR, de acuerdo con trabajos previos. De hecho, la expresión de *THBS2* se ha identificado mediante microarrays de ADN como factor predictivo de respuesta a la radioterapia preoperatoria en CCR (Watanabe et al., 2006). Además, en un estudio con pacientes de CCR tratados con bevacizumab, la supervivencia fue mayor en aquellos que tenían niveles más elevados de *THBS2* aunque este dato no alcanzó significación estadística (Jubb et al., 2006). Por otra parte, observamos una menor expresión de *ANPEP* en las muestras de CCR. La disminución de los niveles de *ANPEP* en CCR en comparación con la mucosa sana ha sido descrita previamente utilizando *microarrays* de ADN, y se ha propuesto

como posible gen supresor de tumores (Birkenkamp-Demtroder et al., 2002). Siguiendo en la misma línea, se observó que la expresión reducida de *ANPEP* formaba parte de la firma molecular que permitía diferenciar a nivel transcripcional células de CCR con fenotipo invasivo de células normales de la mucosa colónica (Wiese et al., 2007). También en cáncer de próstata se ha identificado la pérdida de expresión de aminopeptidasa N mediante inmunohistoquímica como un rasgo diferencial frente al tejido normal (Liu et al., 2004)

Analizando los resultados obtenidos proponemos que la expresión de *EPHB4* podría ser considerada como potencial marcador predictivo de respuesta en pacientes de CCR tratados con bevacizumab. Los pacientes con niveles elevados de *EPHB4* poseen una supervivencia significativamente menor, y su identificación les permitiría beneficiarse de un tratamiento más agresivo y con más posibilidades terapéuticas

Los resultados observados en este trabajo están en concordancia con la hipótesis de que la expresión de *EPHB4* contribuye no solo a la angiogénesis tumoral sino también a la supervivencia de las células tumorales. En trabajos anteriores se había relacionado la sobreexpresión de EphB4 con mal pronóstico en pacientes de cáncer de ovario (Kumar et al., 2007) y de cáncer de mama (Brantley-Sieders et al., 2011), pero esta es la primera vez que se propone como marcador en CCR.

El siguiente paso para el desarrollo de *EPHB4* como marcador predictivo de utilidad clínica implicaría su validación en una muestra independiente de tamaño adecuado, preferiblemente en otro laboratorio (Alymani et al., 2010)







- I. El estudio fenotípico comparativo de pericitos y células progenitoras mesenquimales humanas mediante citometría de flujo no permite identificar marcadores específicos.
- II. La comparación del perfil transcripcional de pericitos y células progenitoras mesenquimales humanas permitió la identificación de una serie de genes con mayor expresión en pericitos, destacando entre ellos los que codifican los receptores de membrana TLR4 y Robo4.
- III. Demostramos por primera vez que los pericitos humanos expresan TLR4 en la superficie y poseen la maquinaria de señalización necesaria para responder a la estimulación con LPS, que da lugar a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.
- IV. La estimulación de los pericitos humanos con LPS o HMGB1 induce la sobreexpresión de genes que codifican citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, promoviendo la secreción de IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL12 y CXCL13, y CCL2 y un incremento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, que favorece la adhesión de células mononucleadas de sangre periférica.
- V. Los pericitos expresan receptores de la familia Robo en la superficie celular e interactúan con su ligando Slit2 tanto inmobilizado como en solución. La incubación con Slit2 inhibe la migración de los pericitos en un ensayo *in vitro*, y este efecto es independiente de la vía PDGFR $\beta$ .
- VI. En presencia de anticuerpos bloqueantes anti-Robo1 y anti-Robo4, la interacción de los pericitos con Slit2 es inhibida parcialmente, lo que sugiere la posible implicación de otros receptores.
- VII. La comparación del perfil transcripcional de muestras de pacientes con cáncer de colon metastático que habían respondido o no al tratamiento con bevacizumab permitió la identificación del gen que codifica el receptor de efrinas *EPHB4* como sobreexpresado en grupo no respondedor.
- VIII. Una expresión elevada de *EPHB4* se asocia con baja supervivencia global, de forma secundaria a la resistencia al tratamiento.
- IX. El nivel de expresión de *EPHB4* puede ser considerado como un potencial biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento con bevacizumab en pacientes con cáncer de colon metastático.



A black and white microscopic image showing several cells with bright, glowing nuclei and some internal structures. The word "BIBLIOGRAFÍA" is overlaid in the center in a white, serif font.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abengozar, M.A., de, F.S., Ferreiro, S., Soriano, J., Perez-Martinez, M., Olmeda, D., Marenchino, M., Canamero, M., Ortega, S., Megias, D., et al. (2012). Blocking ephrinB2 with highly specific antibodies inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor growth. *Blood* *119*, 4565–4576.
- Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J. Clin. Invest.* *112*, 1142–1151.
- Adams, R.H., Diella, F., Hennig, S., Helmbacher, F., Deutsch, U., and Klein, R. (2001). The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration. *Cell* *104*, 57–69.
- Allende, M.L., and Proia, R.L. (2002). Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim. Biophys. Acta* *1582*, 222–227.
- Alymani, N.A., Smith, M.D., Williams, D.J., and Petty, R.D. (2010). Predictive biomarkers for personalised anti-cancer drug use: discovery to clinical implementation. *Eur.J.Cancer.* *46*, 869–879.
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., et al. (2000). High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J. Exp. Med.* *192*, 565–570.
- Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/Pericyte Interactions. *Circulation Research* *97*, 512–523.
- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell* *21*, 193–215.
- Asahina, K., Zhou, B., Pu, W.T., and Tsukamoto, H. (2011). Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology* *53*, 983–995.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* *25*, 25–29.
- Augustin, H.G., and Reiss, Y. (2003). EphB receptors and ephrinB ligands: regulators of vascular assembly and homeostasis. *Cell Tissue Res.* *314*, 25–31.
- Autiero, M., De Smet, F., Claes, F., and Carmeliet, P. (2005). Role of neural guidance signals in blood vessel navigation. *Cardiovasc. Res.* *65*, 629–638.
- Balabanov, R., Washington, R., Wagnerova, J., and Dore-Duffy, P. (1996). CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin alpha M, and macrophage marker ED-2. *Microvasc. Res.* *52*, 127–142.
- Barlow, K.D., Sanders, A.M., Soker, S., Ergün, S., and Metheny-Barlow, L.J. (2013). Pericytes on the tumor vasculature: jekyll or hyde? *Cancer Microenviron* *6*, 1–17.
- Battle, E., Bacani, J., Begthel, H., Jonkheer, S., Jonkeer, S., Gregorieff, A., Van de Born, M., Malats, N., Sancho, E., Boon, E., et al. (2005). EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* *435*, 1126–1130.

- Bedell, V.M., Yeo, S.-Y., Park, K.W., Chung, J., Seth, P., Shivalingappa, V., Zhao, J., Obara, T., Sukhatme, V.P., Drummond, I.A., et al. (2005). roundabout4 is essential for angiogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 6373–6378.
- Benjamin, L.E., Hemo, I., and Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* *125*, 1591–1598.
- Berg, J.N., Gallione, C.J., Stenzel, T.T., Johnson, D.W., Allen, W.P., Schwartz, C.E., Jackson, C.E., Porteous, M.E., and Marchuk, D.A. (1997). The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am. J. Hum. Genet.* *61*, 60–67.
- Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 592–603.
- Bergers, G., and Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology* *7*, 452–464.
- Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., and Hanahan, D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* *111*, 1287–1295.
- Betsholtz, C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* *15*, 215–228.
- Birkenkamp-Demtroder, K., Christensen, L.L., Olesen, S.H., Frederiksen, C.M., Laiho, P., Aaltonen, L.A., Laurberg, S., Sorensen, F.B., Hagemann, R., and ORntoft, T.F. (2002). Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res.* *62*, 4352–4363.
- Bonkowski, D., Katyshev, V., Balabanov, R.D., Borisov, A., and Dore-Duffy, P. (2011). The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS* *8*, 8.
- Bose, A., Barik, S., Banerjee, S., Ghosh, T., Mallick, A., Bhattacharyya Majumdar, S., Goswami, K.K., Bhuniya, A., Banerjee, S., Baral, R., et al. (2013). Tumor-derived vascular pericytes anergize Th cells. *J. Immunol.* *191*, 971–981.
- Brachvogel, B., Moch, H., Pausch, F., Schlötzer-Schrehardt, U., Hofmann, C., Hallmann, R., Von der Mark, K., Winkler, T., and Pöschl, E. (2005). Perivascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. *Development* *132*, 2657–2668.
- Brantley-Sieders, D.M., Jiang, A., Sarma, K., Badu-Nkansah, A., Walter, D.L., Shyr, Y., and Chen, J. (2011). Eph/ephrin profiling in human breast cancer reveals significant associations between expression level and clinical outcome. *PLoS.One.* *6*, e24426.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., and Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* *96*, 795–806.
- Cai, J., and Boulton, M. (2002). The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye (Lond)* *16*, 242–260.



- Canfield, A.E., Sutton, A.B., Hoyland, J.A., and Schor, A.M. (1996). Association of thrombospondin-1 with osteogenic differentiation of retinal pericytes in vitro. *J. Cell. Sci.* *109* ( Pt 2), 343–353.
- Capparuccia, L., and Tamagnone, L. (2009). Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. *J. Cell. Sci.* *122*, 1723–1736.
- Carmeliet, P. (2004). Manipulating angiogenesis in medicine. *J. Intern. Med.* *255*, 538–561.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* *10*, 417–427.
- Carmeliet, P., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* *436*, 193–200.
- Chakravarthy, U., Gardiner, T.A., Anderson, P., Archer, D.B., and Trimble, E.R. (1992). The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvasc. Res.* *43*, 241–254.
- Cohen, M.P., Frank, R.N., and Khalifa, A.A. (1980). Collagen production by cultured retinal capillary pericytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *19*, 90–94.
- Cooke, V.G., Lebleu, V.S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, J.T., Teng, Y., Duncan, M.B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., et al. (2012). Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway. *Cancer Cell* *21*, 66–81.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* *3*, 301–313.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A.A., and Barres, B.A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* *468*, 562–566.
- Danese, S., Dejana, E., and Fiocchi, C. (2007). Immune Regulation by Microvascular Endothelial Cells: Directing Innate and Adaptive Immunity, Coagulation, and Inflammation. *J Immunol* *178*, 6017–6022.
- Darland, D.C., Massingham, L.J., Smith, S.R., Piek, E., Saint-Geniez, M., and D'Amore, P.A. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* *264*, 275–288.
- Davalos, V., Dopeso, H., Castano, J., Wilson, A.J., Vilardell, F., Romero-Gimenez, J., Espin, E., Armengol, M., Capella, G., Mariadason, J.M., et al. (2006). EPHB4 and survival of colorectal cancer patients. *Cancer Res.* *66*, 8943–8948.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R., et al. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 255–267.
- Dhar, K., Dhar, G., Majumder, M., Haque, I., Mehta, S., Veldhuizen, P.V., Banerjee, S., and Banerjee, S. (2010). Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Molecular Cancer* *9*, 209.

- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Varela, H., Rancel, N., and Valladares, F. (1991). Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol. Histopathol.* *6*, 269–286.
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Madrid, J.F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martín-Vasallo, P., and Díaz-Flores, L., Jr (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol. Histopathol.* *24*, 909–969.
- Díaz-Flores, L., Jr, Madrid, J.F., Gutiérrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Argüelles, H., and Díaz-Flores, L. (2006). Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol. Histopathol.* *21*, 995–1027.
- Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* *298*, 1959–1964.
- Djokovic, D., Trindade, A., Gigante, J., Badenes, M., Silva, L., Liu, R., Li, X., Gong, M., Krasnoperov, V., Gill, P.S., et al. (2010). Combination of Dll4/Notch and Ephrin-B2/EphB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis. *BMC.Cancer.* *10:641.*, 641.
- Domenga, V., Fardoux, P., Lacombe, P., Monet, M., Maciazek, J., Krebs, L.T., Klonjowski, B., Berrou, E., Mericskay, M., Li, Z., et al. (2004). Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* *18*, 2730–2735.
- Dopeso, H., Mateo-Lozano, S., Mazzolini, R., Rodrigues, P., Lagares-Tena, L., Ceron, J., Romero, J., Esteves, M., Landolfi, S., Hernandez-Losa, J., et al. (2009). The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* *69*, 7430–7438.
- Dore-Duffy, P., and Cleary, K. (2011). Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol. Biol.* *686*, 49–68.
- Dumont, D.J., Gradwohl, G.J., Fong, G.H., Auerbach, R., and Breitman, M.L. (1993). The endothelial-specific receptor tyrosine kinase, tek, is a member of a new subfamily of receptors. *Oncogene* *8*, 1293–1301.
- Eberth CJ (1871) *Handbuch der Lehre von den Geweben des Menschen und der Thiere* (W. Engelman, Leipzig).
- Ebos, J.M.L., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* *15*, 232–239.
- Edelman, D.A., Jiang, Y., Tyburski, J., Wilson, R.F., and Steffes, C. (2006a). Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. *J. Surg. Res.* *135*, 305–311.
- Edelman, D.A., Jiang, Y., Tyburski, J., Wilson, R.F., and Steffes, C. (2006b). Toll-like receptor-4 message is up-regulated in lipopolysaccharide-exposed rat lung pericytes. *J. Surg. Res.* *134*, 22–27.
- Edelman, D.A., Jiang, Y., Tyburski, J.G., Wilson, R.F., and Steffes, C.P. (2007a). Cytokine production in lipopolysaccharide-exposed rat lung pericytes. *J Trauma* *62*, 89–93.
- Edelman, D.A., Jiang, Y., Tyburski, J.G., Wilson, R.F., and Steffes, C.P. (2007b). Lipopolysaccharide up-regulates heat shock protein expression in rat lung pericytes. *J. Surg. Res.* *140*, 171–176.

- Ergün, S., Tilki, D., and Klein, D. (2011). Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 981–995.
- Etchevers, H.C., Vincent, C., Douarin, N.M.L., and Couly, G.F. (2001). The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* *128*, 1059–1068.
- Falcón, B.L., Hashizume, H., Koumoutsakos, P., Chou, J., Bready, J.V., Coxon, A., Oliner, J.D., and McDonald, D.M. (2009). Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am. J. Pathol.* *175*, 2159–2170.
- Farrington-Rock, C., Crofts, N.J., Doherty, M.J., Ashton, B.A., Griffin-Jones, C., and Canfield, A.E. (2004). Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* *110*, 2226–2232.
- Feng, Y., Vom Hagen, F., Pfister, F., Djokic, S., Hoffmann, S., Back, W., Wagner, P., Lin, J., Deutsch, U., and Hammes, H.-P. (2007). Impaired pericyte recruitment and abnormal retinal angiogenesis as a result of angiopoietin-2 overexpression. *Thromb. Haemost.* *97*, 99–108.
- Ferguson, B.D., Liu, R., Rolle, C.E., Tan, Y.-H.C., Krasnoperov, V., Kanteti, R., Tretiakova, M.S., Cervantes, G.M., Hasina, R., Hseu, R.D., et al. (2013). The EphB4 receptor tyrosine kinase promotes lung cancer growth: a potential novel therapeutic target. *PLoS ONE* *8*, e67668.
- Ferrari-Dileo, G., Davis, E.B., and Anderson, D.R. (1996). Glaucoma, capillaries and pericytes. 3. Peptide hormone binding and influence on pericytes. *Ophthalmologica* *210*, 269–275.
- Foo, S.S., Turner, C.J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha, D., and Adams, R.H. (2006). Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* *124*, 161–173.
- Foster, K., Sheridan, J., Veiga-Fernandes, H., Roderick, K., Pachnis, V., Adams, R., Blackburn, C., Kioussis, D., and Coles, M. (2008). Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus. *J. Immunol.* *180*, 3183–3189.
- Franses, J.W., Baker, A.B., Chitalia, V.C., and Edelman, E.R. (2011). Stromal endothelial cells directly influence cancer progression. *Sci Transl Med* *3*, 66ra5.
- Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., and Betsholtz, C. (2009). Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 630–638.
- Gallione, C.J., Repetto, G.M., Legius, E., Rustgi, A.K., Schelley, S.L., Tejpar, S., Mitchell, G., Drouin, E., Westermann, C.J.J., and Marchuk, D.A. (2004). A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* *363*, 852–859.
- Gálvez, B.G., Genís, L., Matías-Román, S., Oblander, S.A., Tryggvason, K., Apte, S.S., and Arroyo, A.G. (2005). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/cc12 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 1292–1298.
- Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* *314*, 15–23.
- Gerhardt, H., and Semb, H. (2008). Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? *J. Mol. Med.* *86*, 135–144.

- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* *161*, 1163–1177.
- Gitler, A.D., Lu, M.M., and Epstein, J.A. (2004). PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev. Cell* *7*, 107–116.
- Goede, V., Brogelli, L., Ziche, M., and Augustin, H.G. (1999). Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int. J. Cancer* *82*, 765–770.
- Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., González, M.A., Rico, L., Büscher, D., and Delgado, M. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* *58*, 929–939.
- Göritz, C., Dias, D.O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O., and Frisén, J. (2011). A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* *333*, 238–242.
- Goumans, M.-J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., and Ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* *21*, 1743–1753.
- Goumans, M.-J., Lebrin, F., and Valdimarsdottir, G. (2003). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc. Med.* *13*, 301–307.
- Graeber, M.B., Streit, W.J., Büringer, D., Sparks, D.L., and Kreutzberg, G.W. (1992). Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *51*, 303–311.
- De Gruttola, V.G., Clax, P., DeMets, D.L., Downing, G.J., Ellenberg, S.S., Friedman, L., Gail, M.H., Prentice, R., Wittes, J., and Zeger, S.L. (2001). Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. summary of a National Institutes of Health workshop. *Control Clin Trials* *22*, 485–502.
- Gu, C., and Giraudo, E. (2013). The role of semaphorins and their receptors in vascular development and cancer. *Exp. Cell Res.* *319*, 1306–1316.
- Guillot, L., Medjane, S., Le-Barillec, K., Balloy, V., Danel, C., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2004). Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J. Biol. Chem.* *279*, 2712–2718.
- Hainsworth, J.D., Spigel, D.R., Sosman, J.A., Burris, H.A., 3rd, Farley, C., Cucullu, H., Yost, K., Hart, L.L., Sylvester, L., Waterhouse, D.M., et al. (2007). Treatment of advanced renal cell carcinoma with the combination bevacizumab/erlotinib/imetinib: a phase I/II trial. *Clin Genitourin Cancer* *5*, 427–432.
- Hammes, H.-P., Lin, J., Wagner, P., Feng, Y., Vom Hagen, F., Krzizok, T., Renner, O., Breier, G., Brownlee, M., and Deutsch, U. (2004). Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* *53*, 1104–1110.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353–364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.

- Hasina, R., Mollberg, N., Kawada, I., Mutreja, K., Kanade, G., Yala, S., Surati, M., Liu, R., Li, X., Zhou, Y., et al. (2013). Critical role for the receptor tyrosine kinase EPHB4 in esophageal cancers. *Cancer Res.* *73*, 184–194.
- Hayden, M.R., Karuparthi, P.R., Habibi, J., Lastra, G., Patel, K., Wasekar, C., Manrique, C.M., Ozerdem, U., Stas, S., and Sowers, J.R. (2008). Ultrastructure of islet microcirculation, pericytes and the islet exocrine interface in the HIP rat model of diabetes. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) *233*, 1109–1123.
- Heldin, C.H., and Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* *79*, 1283–1316.
- Herman, I.M., Newcomb, P.M., Coughlin, J.E., and Jacobson, S. (1987). Characterization of microvascular cell cultures from normotensive and hypertensive rat brains: pericyte-endothelial cell interactions in vitro. *Tissue Cell* *19*, 197–206.
- Hosaka, K., Yang, Y., Seki, T., Nakamura, M., Andersson, P., Rouhi, P., Yang, X., Jensen, L., Lim, S., Feng, N., et al. (2013). Tumour PDGF-BB expression levels determine dual effects of anti-PDGF drugs on vascular remodelling and metastasis. *Nat Commun* *4*, 2129.
- Howson, K.M., Aplin, A.C., Gelati, M., Alessandri, G., Parati, E.A., and Nicosia, R.F. (2005). The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *289*, C1396–1407.
- Huang, F.-J., You, W.-K., Bonaldo, P., Seyfried, T.N., Pasquale, E.B., and Stallcup, W.B. (2010). Pericyte deficiencies lead to aberrant tumor vascularization in the brain of the NG2 null mouse. *Dev. Biol.* *344*, 1035–1046.
- Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., and Cloutier, J.-F. (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* *26*, 509–563.
- Huminięcki, L., Gorn, M., Suchting, S., Poulson, R., and Bicknell, R. (2002). Magic Roundabout Is a New Member of the Roundabout Receptor Family That Is Endothelial Specific and Expressed at Sites of Active Angiogenesis. *Genomics* *79*, 547–552.
- Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* *9*, 685–693.
- Jeansson, M., Gawlik, A., Anderson, G., Li, C., Kerjaschki, D., Henkelman, M., and Quaggin, S.E. (2011). Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *J. Clin. Invest.* *121*, 2278–2289.
- Jones, A.R., Clark, C.C., and Brighton, C.T. (1995). Microvessel endothelial cells and pericytes increase proliferation and repress osteoblast phenotypic markers in rat calvarial bone cell cultures. *J. Orthop. Res.* *13*, 553–561.
- Jones, C.A., London, N.R., Chen, H., Park, K.W., Sauvaget, D., Stockton, R.A., Wythe, J.D., Suh, W., Larriue-Lahargue, F., Mukoyama, Y.-S., et al. (2008). Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. *Nat. Med.* *14*, 448–453.
- Jones, C.A., Nishiya, N., London, N.R., Zhu, W., Sorensen, L.K., Chan, A.C., Lim, C.J., Chen, H., Zhang, Q., Schultz, P.G., et al. (2009). Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1325–1331.

- Jones, N., Voskas, D., Master, Z., Sarao, R., Jones, J., and Dumont, D.J. (2001). Rescue of the early vascular defects in Tek/Tie2 null mice reveals an essential survival function. *EMBO Rep.* 2, 438–445.
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cécillion, M., Marechal, E., et al. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707–710.
- Joyce, N.C., Haire, M.F., and Palade, G.E. (1985). Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase localization of tropomyosin. *J. Cell Biol.* 100, 1379–1386.
- Jubb, A.M., Hurwitz, H.I., Bai, W., Holmgren, E.B., Tobin, P., Guerrero, A.S., Kabbinavar, F., Holden, S.N., Novotny, W.F., Frantz, G.D., et al. (2006). Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J.Clin.Oncol.* 24, 217–227.
- Kaur, S., Castellone, M.D., Bedell, V.M., Konar, M., Gutkind, J.S., and Ramchandran, R. (2006). Robo4 signaling in endothelial cells implies attraction guidance mechanisms. *J. Biol. Chem.* 281, 11347–11356.
- Kaur, S., Samant, G.V., Pramanik, K., Loscombe, P.W., Pendrak, M.L., Roberts, D.D., and Ramchandran, R. (2008). Silencing of directional migration in roundabout4 knockdown endothelial cells. *BMC Cell Biol.* 9, 61.
- Keeley, E.C., Mehrad, B., and Strieter, R.M. (2011). Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res* 317, 685–690.
- Kertesz, N., Krasnoperov, V., Reddy, R., Leshanski, L., Kumar, S.R., Zozulya, S., and Gill, P.S. (2006). The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood.* 107, 2330–2338.
- Keynes, R., and Cook, G.M. (1995). Axon guidance molecules. *Cell* 83, 161–169.
- Kim, J., Oh, W.-J., Gaiano, N., Yoshida, Y., and Gu, C. (2011). Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. *Genes Dev.* 25, 1399–1411.
- Kim, J.A., Tran, N.D., Li, Z., Yang, F., Zhou, W., and Fisher, M.J. (2006). Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26, 209–217.
- Kim, S., Kim, S.Y., Pribis, J.P., Lotze, M., Mollen, K.P., Shapiro, R., Loughran, P., Scott, M.J., and Billiar, T.R. (2013). Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. *Mol. Med.* 19, 88–98.
- Koch, A.W., Mathivet, T., Larrivé, B., Tong, R.K., Kowalski, J., Pibouin-Fragner, L., Bouvrée, K., Stawicki, S., Nicholes, K., Rathore, N., et al. (2011). Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev. Cell* 20, 33–46.
- Kovac, A., Erickson, M.A., and Banks, W.A. (2011). Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroinflammation* 8, 139.
- Krasnoperov, V., Kumar, S.R., Ley, E., Li, X., Sehnet, J., Liu, R., Zozulya, S., and Gill, P.S. (2010). Novel EphB4 monoclonal antibodies modulate angiogenesis and inhibit tumor growth. *Am.J.Pathol.* 176, 2029–2038.

- Krogh, A., 1929. The anatomy and physiology of capillaries. 2nd edition. New Haven (Yale University Press).
- Krueger, M., and Bechmann, I. (2010). CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia* 58, 1–10.
- Kullander, K., and Klein, R. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 475–486.
- Kumar, M.V., Nagineni, C.N., Chin, M.S., Hooks, J.J., and Detrick, B. (2004). Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *Journal of Neuroimmunology* 153, 7–15.
- Kumar, S.R., Masood, R., Spannuth, W.A., Singh, J., Scehnet, J., Kleiber, G., Jennings, N., Deavers, M., Krasnoperov, V., Dubeau, L., et al. (2007). The receptor tyrosine kinase EphB4 is overexpressed in ovarian cancer, provides survival signals and predicts poor outcome. *Br.J.Cancer.* 96, 1083–1091.
- Kumar, S.R., Scehnet, J.S., Ley, E.J., Singh, J., Krasnoperov, V., Liu, R., Manchanda, P.K., Ladner, R.D., Hawes, D., Weaver, F.A., et al. (2009). Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression. *Cancer Res.* 69, 3736–3745.
- Larrieu-Lahargue, F., Thomas, K.R., and Li, D.Y. (2012). Netrin ligands and receptors: lessons from neurons to the endothelium. *Trends Cardiovasc. Med.* 22, 44–47.
- Larson, D.M., Carson, M.P., and Haudenschild, C.C. (1987). Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes. *Microvasc. Res.* 34, 184–199.
- Lawson, N.D., and Weinstein, B.M. (2002). Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat. Rev. Genet.* 3, 674–682.
- Leeson, T.S. (1979). Rat retinal blood vessels. *Can. J. Ophthalmol.* 14, 21–28.
- Legg, J.A., Herbert, J.M.J., Clissold, P., and Bicknell, R. (2008). Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis* 11, 13–21.
- Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 8, 1875–1887.
- Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., and Singh, R.K. (2002). Interleukin-8-induced proliferation, survival, and MMP production in CXCR1 and CXCR2 expressing human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc. Res.* 64, 476–481.
- Li, J.L., Sainson, R.C., Oon, C.E., Turley, H., Leek, R., Sheldon, H., Bridges, E., Shi, W., Snell, C., Bowden, E.T., et al. (2011). DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer Res.* 71, 6073–6083.
- Li, X., Zheng, Z., Li, X., and Ma, X. (2012). Unfractionated heparin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through blocking p38 MAPK and NF- $\kappa$ B activation on endothelial cell. *Cytokine* 60, 114–121.
- Lindblom, P., Gerhardt, H., Liebner, S., Abramsson, A., Enge, M., Hellstrom, M., Backstrom, G., Fredriksson, S., Landegren, U., Nystrom, H.C., et al. (2003). Endothelial PDGF-B retention

is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev.* *17*, 1835–1840.

Liu, A.Y., Roudier, M.P., and True, L.D. (2004). Heterogeneity in primary and metastatic prostate cancer as defined by cell surface CD profile. *Am.J.Pathol.* *165*, 1543–1556.

Liu, D., Hou, J., Hu, X., Wang, X., Xiao, Y., Mou, Y., and De Leon, H. (2006). Neuronal chemorepellent Slit2 inhibits vascular smooth muscle cell migration by suppressing small GTPase Rac1 activation. *Circ. Res.* *98*, 480–489.

Liu, H., Kennard, S., and Lilly, B. (2009). NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circ. Res.* *104*, 466–475.

Liu, R., Ferguson, B.D., Zhou, Y., Naga, K., Salgia, R., Gill, P.S., and Krasnoperov, V. (2013). EphB4 as a therapeutic target in mesothelioma. *BMC Cancer* *13*, 269.

Liu, W., Ahmad, S.A., Jung, Y.D., Reinmuth, N., Fan, F., Bucana, C.D., and Ellis, L.M. (2002). Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma. *Cancer.* *94*, 934–939.

Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.X., Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Nava, V.E., Chae, S.S., Lee, M.J., et al. (2000). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* *106*, 951–961.

London, N.R., Zhu, W., Bozza, F.A., Smith, M.C.P., Greif, D.M., Sorensen, L.K., Chen, L., Kaminoh, Y., Chan, A.C., Passi, S.F., et al. (2010). Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med* *2*, 23ra19.

Lu, C., Shahzad, M.M.K., Moreno-Smith, M., Lin, Y.G., Jennings, N.B., Allen, J.K., Landen, C.N., Mangala, L.S., Armaiz-Pena, G.N., Schmandt, R., et al. (2010). Targeting pericytes with a PDGF-B aptamer in human ovarian carcinoma models. *Cancer Biol. Ther.* *9*, 176–182.

Lu, X., Le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., De Lafarge, B., Sugiyama, D., Bréant, C., Claes, F., De Smet, F., Thomas, J.-L., et al. (2004). The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* *432*, 179–186.

Lu, Z., Li, Y., Jin, J., Zhang, X., Lopes-Virella, M.F., and Huang, Y. (2012). Toll-like receptor 4 activation in microvascular endothelial cells triggers a robust inflammatory response and cross talk with mononuclear cells via interleukin-6. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 1696–1706.

Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H., and Yang, X.-F. (2013). An evolving new paradigm: endothelial cells - conditional innate immune cells. *J Hematol Oncol* *6*, 61.

Maier, C.L., and Pober, J.S. (2011). Human placental pericytes poorly stimulate and actively regulate allogeneic CD4 T cell responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 183–189.

Maione, F., Molla, F., Meda, C., Latini, R., Zentilin, L., Giacca, M., Seano, G., Serini, G., Bussolino, F., and Giraud, E. (2009). Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J. Clin. Invest.* *119*, 3356–3372.

Mandarino, L.J., Sundarraj, N., Finlayson, J., and Hassell, H.R. (1993). Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp. Eye Res.* *57*, 609–621.



- Marlow, R., Binnewies, M., Sorensen, L.K., Monica, S.D., Strickland, P., Forsberg, E.C., Li, D.Y., and Hinck, L. (2010). Vascular Robo4 restricts proangiogenic VEGF signaling in breast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 10520–10525.
- Martiny-Baron, G., Holzer, P., Billy, E., Schnell, C., Brueggen, J., Ferretti, M., Schmiedeberg, N., Wood, J.M., Furet, P., and Imbach, P. (2010). The small molecule specific EphB4 kinase inhibitor NVP-BHG712 inhibits VEGF driven angiogenesis. *Angiogenesis*. *13*, 259–267.
- Mato, M., Ookawara, S., Sakamoto, A., Aikawa, E., Ogawa, T., Mitsuhashi, U., Masuzawa, T., Suzuki, H., Honda, M., Yazaki, Y., et al. (1996). Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 3269–3274.
- Matthay, M.A., Goolaerts, A., Howard, J.P., and Lee, J.W. (2010). Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence. *Crit. Care Med.* *38*, S569–573.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* *449*, 819–826.
- Messmer, D., Yang, H., Telusma, G., Knoll, F., Li, J., Messmer, B., Tracey, K.J., and Chiorazzi, N. (2004). High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J. Immunol.* *173*, 307–313.
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* *160*, 985–1000.
- Morlot, C., Thielens, N.M., Ravelli, R.B.G., Hemrika, W., Romijn, R.A., Gros, P., Cusack, S., and McCarthy, A.A. (2007). Structural insights into the Slit-Robo complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 14923–14928.
- Moserle, L., and Casanovas, O. (2013). Anti-angiogenesis and metastasis: a tumour and stromal cell alliance. *J. Intern. Med.* *273*, 128–137.
- Müller, S.M., Stolt, C.C., Terszowski, G., Blum, C., Amagai, T., Kessaris, N., Iannarelli, P., Richardson, W.D., Wegner, M., and Rodewald, H.-R. (2008). Neural crest origin of perivascular mesenchyme in the adult thymus. *J. Immunol.* *180*, 5344–5351.
- Munarini, N., Jager, R., Abderhalden, S., Zuercher, G., Rohrbach, V., Loercher, S., Pfanner-Meyer, B., Andres, A.C., and Ziemiecki, A. (2002). Altered mammary epithelial development, pattern formation and involution in transgenic mice expressing the EphB4 receptor tyrosine kinase. *J. Cell Sci.* *115*, 25–37.
- Nagy, J.A., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (2012). Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation. *Cold Spring Harb Perspect Med* *2*, a006544.
- Nauta, A.J., and Fibbe, W.E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* *110*, 3499–3506.
- Ning, Y., Sun, Q., Dong, Y., Xu, W., Zhang, W., Huang, H., and Li, Q. (2011). Slit2-N inhibits PDGF-induced migration in rat airway smooth muscle cells: WASP and Arp2/3 involved. *Toxicology* *283*, 32–40.
- Nisancioglu, M.H., Betsholtz, C., and Genové, G. (2010). The absence of pericytes does not increase the sensitivity of tumor vasculature to vascular endothelial growth factor-A blockade. *Cancer Res.* *70*, 5109–5115.

- Noberini, R., Mitra, S., Salvucci, O., Valencia, F., Duggineni, S., Prigozhina, N., Wei, K., Tosato, G., Huang, Z., and Pasquale, E.B. (2011). PEGylation Potentiates the Effectiveness of an Antagonistic Peptide That Targets the EphB4 Receptor with Nanomolar Affinity. *PLoS.One.* 6, e28611.
- Noren, N.K., and Pasquale, E.B. (2007). Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer. *Cancer Res.* 67, 3994–3997.
- Noren, N.K., Foos, G., Hauser, C.A., and Pasquale, E.B. (2006). The EphB4 receptor suppresses breast cancer cell tumorigenicity through an Abl-Crk pathway. *Nat.Cell Biol.* 8, 815–825.
- Oh, S.P., Seki, T., Goss, K.A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P.K., Li, L., Miyazono, K., Ten Dijke, P., Kim, S., et al. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2626–2631.
- Olaso, E., Santisteban, A., Bidaurrezaga, J., Gressner, A.M., Rosenbaum, J., and Vidal-Vanaclocha, F. (1997). Tumor-dependent activation of rodent hepatic stellate cells during experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 26, 634–642.
- Oldenhuis, C.N.A.M., Oosting, S.F., Gietema, J.A., and De Vries, E.G.E. (2008). Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur. J. Cancer* 44, 946–953.
- Olson, L.E., and Soriano, P. (2011). PDGFR $\beta$  signaling regulates mural cell plasticity and inhibits fat development. *Dev. Cell* 20, 815–826.
- Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15, 220–231.
- Paik, J.-H., Skoura, A., Chae, S.-S., Cowan, A.E., Han, D.K., Proia, R.L., and Hla, T. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev.* 18, 2392–2403.
- De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L.S., Sampaolesi, M., and Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8, 211–226.
- Park, J.S., Arcaroli, J., Yum, H.-K., Yang, H., Wang, H., Yang, K.-Y., Choe, K.-H., Strassheim, D., Pitts, T.M., Tracey, K.J., et al. (2003a). Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 284, C870–879.
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., and Abraham, E. (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.* 279, 7370–7377.
- Park, K.W., Morrison, C.M., Sorensen, L.K., Jones, C.A., Rao, Y., Chien, C.-B., Wu, J.Y., Urness, L.D., and Li, D.Y. (2003b). Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev. Biol.* 261, 251–267.
- Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat.Rev.Cancer.* 10, 165–180.

- Pietras, K., and Hanahan, D. (2005). A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose “chemo-switch” regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *J. Clin. Oncol.* *23*, 939–952.
- Pietras, K., and Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* *316*, 1324–1331.
- Plenk H. Über argyrophilen Fasern (Gitterfasern) und ihre Bildungszellen. *Erg Anat.* 1927;27:302–412.
- Pober, J.S., and Tellides, G. (2012). Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends Immunol.* *33*, 49–57.
- Proebstl, D., Voisin, M.-B., Woodfin, A., Whiteford, J., D’Acquisto, F., Jones, G.E., Rowe, D., and Nourshargh, S. (2012). Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med.*
- Pugin, J., Schürer-Maly, C.C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R.J., and Tobias, P.S. (1993). Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 2744–2748.
- Que, J., Wilm, B., Hasegawa, H., Wang, F., Bader, D., and Hogan, B.L.M. (2008). Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchyme during lung development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 16626–16630.
- Ramón y Cajal S. La Rétine Des vertèbres. *La Cellule.* 1892;9:119–258.
- Rajantie, I., Ilmonen, M., Alminaitte, A., Ozerdem, U., Alitalo, K., and Salven, P. (2004). Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* *104*, 2084–2086.
- Raza, A., Franklin, M.J., and Dudek, A.Z. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *American Journal of Hematology* *85*, 593–598.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* *386*, 671–674.
- Rossini, A., Zacheo, A., Mocini, D., Totta, P., Facchiano, A., Castoldi, R., Sordini, P., Pompilio, G., Abeni, D., Capogrossi, M.C., et al. (2008). HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *44*, 683–693.
- Rothberg, J.M., Hartley, D.A., Walther, Z., and Artavanis-Tsakonas, S. (1988). slit: An EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* *55*, 1047–1059.
- Rouget C (1873) Memoire sur le developpement, la structure et les proprietes physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. *Arch Physiol Normale Pathol* 5:603–61.
- Rouget C (1879) Sur la contractilite des capillaires sanguins. *CR Acad Sci* 88:916–8.
- Ruan, J., Luo, M., Wang, C., Fan, L., Yang, S.N., Cardenas, M., Geng, H., Leonard, J.P., Melnick, A., Cerchiatti, L., et al. (2013). Imatinib disrupts lymphoma angiogenesis by targeting vascular pericytes. *Blood* *121*, 5192–5202.

- Ruchoux, M.M., Guerouaou, D., Vandenhaute, B., Pruvo, J.P., Vermersch, P., and Leys, D. (1995). Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol.* 89, 500–512.
- Rucker, H.K., Wynder, H.J., and Thomas, W.E. (2000). Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res. Bull.* 51, 363–369.
- Ruiter, D.J., Schlingemann, R.O., Westphal, J.R., Denijn, M., Rietveld, F.J., and De Waal, R.M. (1993). Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis. *Behring Inst. Mitt.* 258–272.
- Rutkowski, R., Mertens-Walker, I., Lisle, J.E., Herington, A.C., and Stephenson, S.A. (2012). Evidence for a dual function of EphB4 as tumor promoter and suppressor regulated by the absence or presence of the ephrin-B2 ligand. *Int.J.Cancer.* 131, E614–E624.
- Salvucci, O., Maric, D., Economopoulou, M., Sakakibara, S., Merlin, S., Follenzi, A., and Tosato, G. (2009). EphrinB reverse signaling contributes to endothelial and mural cell assembly into vascular structures. *Blood* 114, 1707–1716.
- Samaniego, R., Estecha, A., Relloso, M., Longo, N., L Escat, J., Longo-Imedio, I., A Avilés, J., A Del Pozo, M., Puig-Kröger, A., and Sánchez-Mateos, P. (2013). Mesenchymal Contribution to Recruitment, Infiltration, and Positioning of Leukocytes in Human Melanoma Tissues. *J. Invest. Dermatol.*
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., and Qin, Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376, 70–74.
- Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C.L., Wilkinson, G.A., Pitulescu, M.E., Acker, T., and Acker-Palmer, A. (2010). Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 465, 487–491.
- Sennino, B., Falcón, B.L., McCauley, D., Le, T., McCauley, T., Kurz, J.C., Haskell, A., Epstein, D.M., and McDonald, D.M. (2007). Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102. *Cancer Res.* 67, 7358–7367.
- Sennino, B., Kuhnert, F., Tabruyn, S.P., Mancuso, M.R., Hu-Lowe, D.D., Kuo, C.J., and McDonald, D.M. (2009). Cellular source and amount of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in tumors determine response to angiogenesis inhibitors. *Cancer Res.* 69, 4527–4536.
- Seth, P., Lin, Y., Hanai, J., Shivalingappa, V., Duyao, M.P., and Sukhatme, V.P. (2005). Magic roundabout, a tumor endothelial marker: Expression and signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332, 533–541.
- Sheldon, H., Andre, M., Legg, J.A., Heal, P., Herbert, J.M., Sainson, R., Sharma, A.S., Kitajewski, J.K., Heath, V.L., and Bicknell, R. (2009). Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors. *FASEB J.* 23, 513–522.
- Shepro, D., and Morel, N.M. (1993). Pericyte physiology. *FASEB J.* 7, 1031–1038.
- Da Silva Meirelles, L., Caplan, A.I., and Nardi, N.B. (2008). In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* 26, 2287–2299.
- Sims, D.E. (1986). The pericyte--a review. *Tissue Cell* 18, 153–174.

- Singh, S., Wu, S., Varney, M., Singh, A.P., and Singh, R.K. (2011). CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation. *Microvasc. Res.* 82, 318–325.
- Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z., and Bergers, G. (2005). PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat. Cell Biol.* 7, 870–879.
- Soriano, P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 8, 1888–1896.
- Spiegel, S., and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 397–407.
- Stallcup, W.B. (2002). The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J. Neurocytol.* 31, 423–435.
- Stamatovic, S.M., Keep, R.F., Mostarica-Stojkovic, M., and Andjelkovic, A.V. (2006). CCL2 Regulates Angiogenesis via Activation of Ets-1 Transcription Factor. *J Immunol* 177, 2651–2661.
- Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., Von Brühl, M.-L., Gärtner, F., Khandoga, A.G., Legate, K.R., Pless, R., et al. (2013). Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and “instruct” them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* 14, 41–51.
- Stephenson, S.A., Slomka, S., Douglas, E.L., Hewett, P.J., and Hardingham, J.E. (2001). Receptor protein tyrosine kinase EphB4 is up-regulated in colon cancer. *BMC.Mol.Biol.* 2:15. *Epub; %2001 Dec 21.*, 15.
- Stratman, A.N., Malotte, K.M., Mahan, R.D., Davis, M.J., and Davis, G.E. (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 114, 5091–5101.
- Suchting, S., Heal, P., Tahtis, K., Stewart, L.M., and Bicknell, R. (2005). Soluble Robo4 receptor inhibits in vivo angiogenesis and endothelial cell migration. *FASEB J.* 19, 121–123.
- Sundberg, C., Kowanetz, M., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, H.F. (2002). Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab. Invest.* 82, 387–401.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., and Yancopoulos, G.D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171–1180.
- Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123–1133.
- Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A.G., Dodd, J., and Jessell, T.M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336, 775–778.
- Thomas, W.E. (1999). Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31, 42–57.

- Thurston, G., Wang, Q., Baffert, F., Rudge, J., Papadopoulos, N., Jean-Guillaume, D., Wiegand, S., Yancopoulos, G.D., and McDonald, D.M. (2005). Angiopoietin 1 causes vessel enlargement, without angiogenic sprouting, during a critical developmental period. *Development* 132, 3317–3326.
- Treutiger, C.J., Mullins, G.E., Johansson, A.-S.M., Rouhiainen, A., Rauvala, H.M.E., Erlandsson-Harris, H., Andersson, U., Yang, H., Tracey, K.J., Andersson, J., et al. (2003). High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J. Intern. Med.* 254, 375–385.
- Tu, Z., Li, Y., Smith, D.S., Sheibani, N., Huang, S., Kern, T., and Lin, F. (2011). Retinal pericytes inhibit activated T cell proliferation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 9005–9010.
- Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda, Y., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D., and Nishikawa, S.-I. (2002). Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clin. Invest.* 110, 1619–1628.
- Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., Da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Häcker, H., and Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31332–31339.
- Verbeek, M.M., Westphal, J.R., Ruiters, D.J., and De Waal, R.M. (1995). T lymphocyte adhesion to human brain pericytes is mediated via very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1 interactions. *J. Immunol.* 154, 5876–5884.
- Vikkula, M., Boon, L.M., Carraway, K.L., 3rd, Calvert, J.T., Diamonti, A.J., Goumnerov, B., Pasyk, K.A., Marchuk, D.A., Warman, M.L., Cantley, L.C., et al. (1996). Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 87, 1181–1190.
- Vimtrup, B. S. 1922. Beiträge zur Anatomie der Kapillaren: über kontraktile Elemente in der Gefäßwand der Blutkapillaren. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 65:150-182.
- Wang, B., Xiao, Y., Ding, B.-B., Zhang, N., Yuan, X., Gui, L., Qian, K.-X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y., et al. (2003a). Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 4, 19–29.
- Wang, B., Xiao, Y., Ding, B.B., Zhang, N., Yuan, X. bin, Gui, L., Qian, K.X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y., et al. (2003b). Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* 4, 19–29.
- Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741–753.
- Wang, S., Cao, C., Chen, Z., Bankaitis, V., Tzima, E., Sheibani, N., and Burridge, K. (2012). Pericytes Regulate Vascular Basement Membrane Remodeling and Govern Neutrophil Extravasation during Inflammation. *PLoS ONE* 7, e45499.
- Wang, Y., Nakayama, M., Pitulescu, M.E., Schmidt, T.S., Bochenek, M.L., Sakakibara, A., Adams, S., Davy, A., Deutsch, U., Luthi, U., et al. (2010). Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*. 465, 483–486.

- Watanabe, T., Komuro, Y., Kiyomatsu, T., Kanazawa, T., Kazama, Y., Tanaka, J., Tanaka, T., Yamamoto, Y., Shirane, M., Muto, T., et al. (2006). Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res.* *66*, 3370–3374.
- Wehland, M., Bauer, J., Magnusson, N.E., Infanger, M., and Grimm, D. (2013). Biomarkers for anti-angiogenic therapy in cancer. *Int J Mol Sci* *14*, 9338–9364.
- Weibel, E.R. (1974). On pericytes, particularly their existence on lung capillaries. *Microvasc. Res.* *8*, 218–235.
- Welén, K., Jennbacken, K., Tesan, T., and Damber, J.-E. (2009). Pericyte coverage decreases invasion of tumour cells into blood vessels in prostate cancer xenografts. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* *12*, 41–46.
- Wiese, A.H., Auer, J., Lassmann, S., Nahrig, J., Rosenberg, R., Hofler, H., Ruger, R., and Werner, M. (2007). Identification of gene signatures for invasive colorectal tumor cells. *Cancer Detect. Prev.* *31*, 282–295.
- Wilkinson-Berka, J.L., Babic, S., De Gooyer, T., Stitt, A.W., Jaworski, K., Ong, L.G.T., Kelly, D.J., and Gilbert, R.E. (2004). Inhibition of platelet-derived growth factor promotes pericyte loss and angiogenesis in ischemic retinopathy. *Am. J. Pathol.* *164*, 1263–1273.
- Wilm, B., Ipenberg, A., Hastie, N.D., Burch, J.B.E., and Bader, D.M. (2005). The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* *132*, 5317–5328.
- Wilson, B.D., Ii, M., Park, K.W., Suli, A., Sorensen, L.K., Larrieu-Lahargue, F., Urness, L.D., Suh, W., Asai, J., Kock, G.A.H., et al. (2006). Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science* *313*, 640–644.
- Xian, X., Håkansson, J., Ståhlberg, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., and Semb, H. (2006). Pericytes limit tumor cell metastasis. *J. Clin. Invest.* *116*, 642–651.
- Xiao, Z., Carrasco, R., Kinneer, K., Sabol, D., Jallal, B., Coats, S., and Tice, D.A. (2012). EphB4 promotes or suppresses Ras/MEK/ERK pathway in a context-dependent manner: Implications for EphB4 as a cancer target. *Cancer Biol. Ther.* *13*, 630–637.
- Xu, J., Woods, C.R., Mora, A.L., Joodi, R., Brigham, K.L., Iyer, S., and Rojas, M. (2007). Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *293*, L131–141.
- Yamaguchi, Y., and Pasquale, E.B. (2004). Eph receptors in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* *14*, 288–296.
- Yan, W., Zhao, K., Jiang, Y., Huang, Q., Wang, J., Kan, W., and Wang, S. (2002). Role of p38 MAPK in ICAM-1 expression of vascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide. *Shock* *17*, 433–438.
- Yang, H., Hreggvidsdottir, H.S., Palmblad, K., Wang, H., Ochani, M., Li, J., Lu, B., Chavan, S., Rosas-Ballina, M., Al-Abed, Y., et al. (2010a). A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 11942–11947.

- Yang, X.-M., Han, H.-X., Sui, F., Dai, Y.-M., Chen, M., and Geng, J.-G. (2010b). Slit-Robo signaling mediates lymphangiogenesis and promotes tumor lymphatic metastasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 571–577.
- Yazdani, U., and Terman, J.R. (2006). The semaphorins. *Genome Biol.* 7, 211.
- Yonenaga, Y., Mori, A., Onodera, H., Yasuda, S., Oe, H., Fujimoto, A., Tachibana, T., and Imamura, M. (2005). Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* 69, 159–166.
- Youn, J.H., Oh, Y.J., Kim, E.S., Choi, J.E., and Shin, J.-S. (2008). High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J. Immunol.* 180, 5067–5074.
- Young, M.R. (2012). Endothelial cells in the eyes of an immunologist. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 1609–1616.
- Zeuke, S., Ulmer, A.J., Kusumoto, S., Katus, H.A., and Heine, H. (2002). TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc. Res.* 56, 126–134.
- Zhang, Y., Singh, M.K., Degenhardt, K.R., Lu, M.M., Bennett, J., Yoshida, Y., and Epstein, J.A. (2009). Tie2Cre-mediated inactivation of plexinD1 results in congenital heart, vascular and skeletal defects. *Dev. Biol.* 325, 82–93.
- Zimmermann, K. W. 1923. Der feinere Bau der Blutkapillaren. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 68:29-109.
- Van der Zwaag, B., Hellemons, A.J.C.G.M., Leenders, W.P.J., Burbach, J.P.H., Brunner, H.G., Padberg, G.W., and Van Bokhoven, H. (2002). PLEXIN-D1, a novel plexin family member, is expressed in vascular endothelium and the central nervous system during mouse embryogenesis. *Dev. Dyn.* 225, 336–343.
- Van Zwieten, E.J., Ravid, R., Swaab, D.F., and Van de Woude, T. (1988). Immunocytochemically stained vasopressin binding sites on blood vessels in the rat brain. *Brain Res.* 474, 369–373.