



PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOCIENCIAS MOLECULARES

PAPEL DEL PERICITO EN LA INMUNIDAD INNATA
Y EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

TESIS DOCTORAL

ROCÍO NAVARRO ORTIZ

MADRID, 2019

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA



PAPEL DEL PERICITO EN LA INMUNIDAD INNATA
Y EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

TESIS DOCTORAL, presentada por

Rocío Navarro Ortiz

Licenciada en Biología

Para optar al Grado de Doctor

Directora de tesis

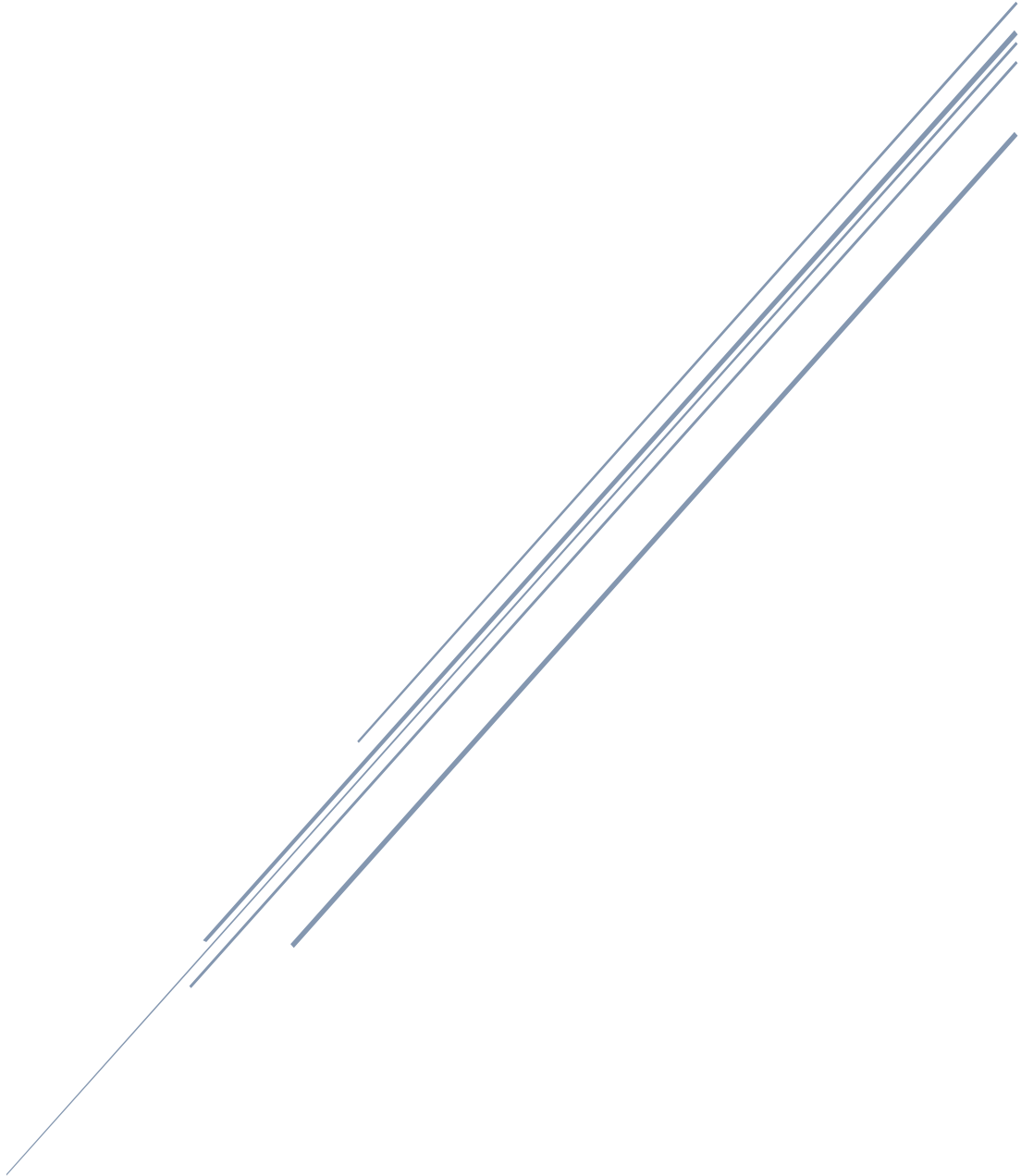
Laura Sanz Alcober

Universidad Autónoma de Madrid-

IIS Puerta de Hierro-Segovia de Arana del Hospital Puerta de Hierro

Esta tesis doctoral, realizada en la Unidad de Inmunología Molecular del IIS-Puerta de Hierro Segovia de Arana del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, ha sido financiada por la Comunidad de Madrid (S2010-BMD-2312), el Ministerio de Economía y Competitividad (RTC-2016-5118) y el Instituto de Salud Carlos III-Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI13/00090 y PI16/00357) con el apoyo del Consejo Regional Europeo Fondos FEDER para el desarrollo.

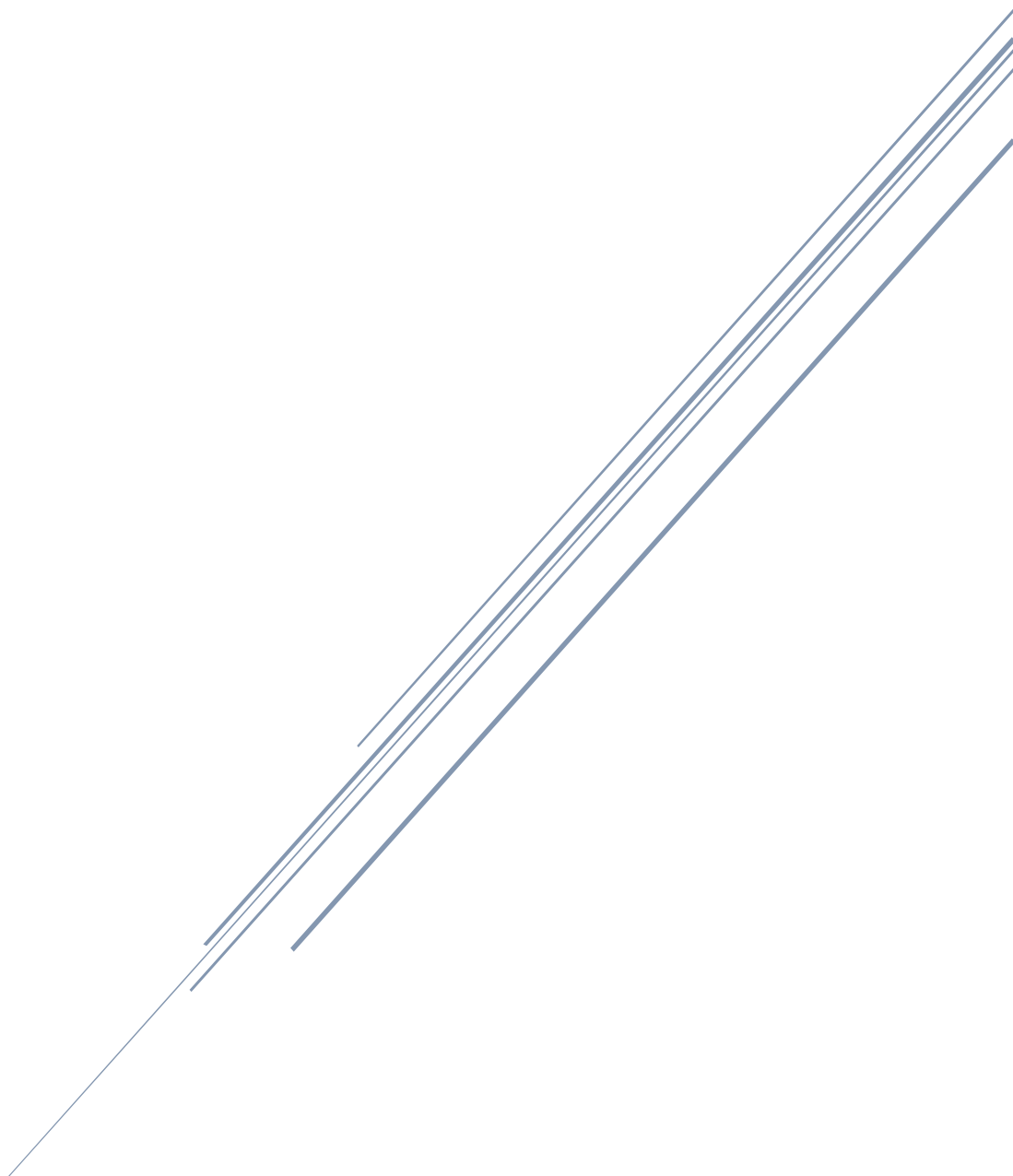
AGRADECIMIENTOS



A mis padres, hermano y marido...

“y a mi cuñi por su gran ayuda siempre ...”

RESUMEN



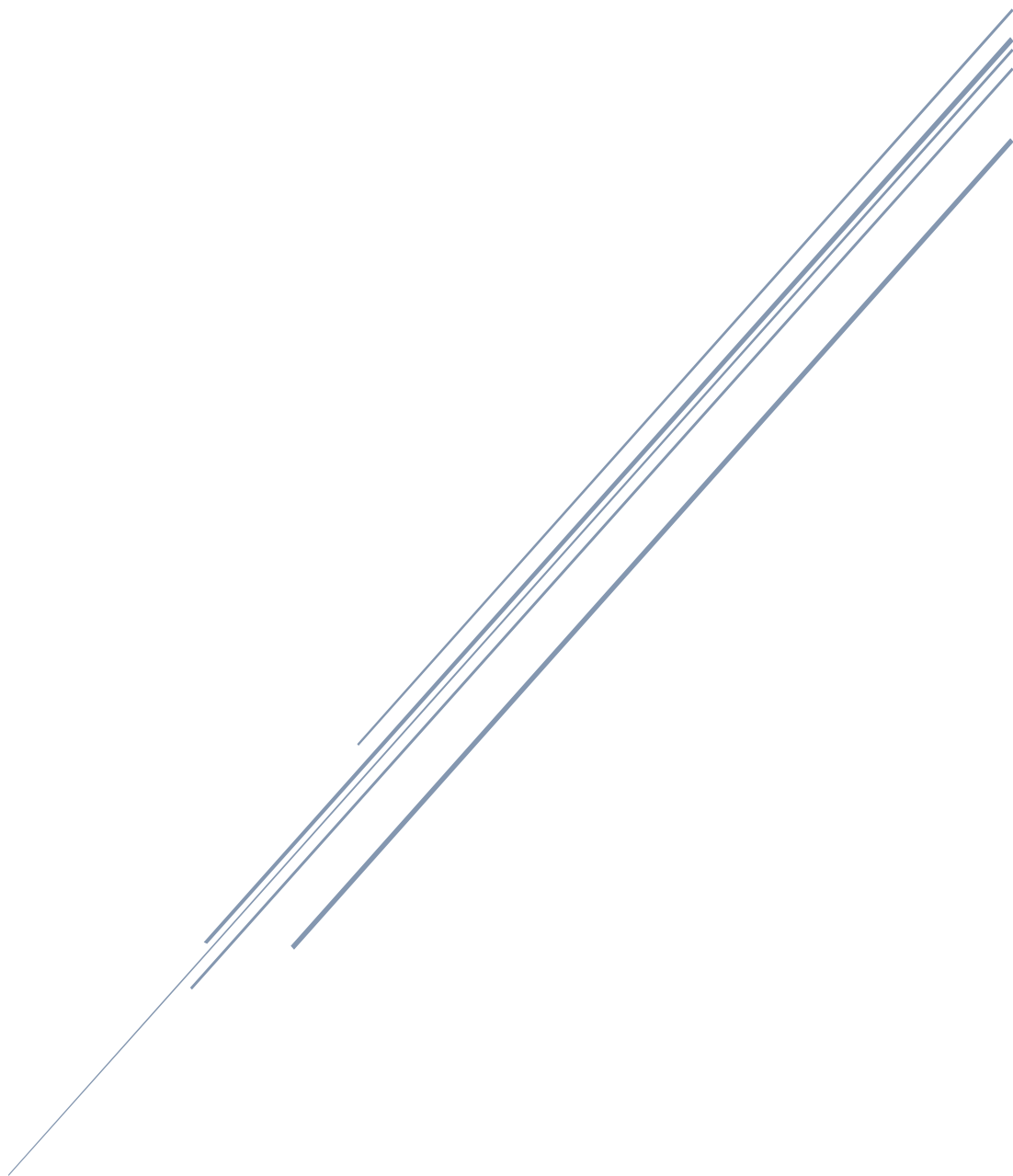
Los pericitos (PC) son células murales de soporte que se encuentran rodeando a las células endoteliales en la microvasculatura, participando en la estabilización de los vasos sanguíneos y la homeostasis vascular. En este trabajo se investiga en el papel funcional del pericito más allá del meramente estructural, en el contexto de la inmunidad innata y como componente importante del estroma tumoral. Previamente se había descrito en el laboratorio la expresión de TLR4 en PC humanos; aquí se profundiza en la caracterización de receptores de reconocimiento de patrones, describiéndose por primera vez la expresión del receptor NOD1 en PC. Además, se ha demostrado su respuesta al agonista C12-iE-DAP, que da lugar a la secreción de moléculas proinflamatorias como IL-6 e IL-8. Así mismo, se discriminó la vía de señalización de NOD1 de la de TLR4 mediante un inhibidor específico de NOD1 y se comprobó que ambas vías pueden actuar de manera sinérgica, evento descrito solo en monocitos y células dendríticas. En conjunto, estos resultados confirman que los PC desempeñan un papel activo en la respuesta inflamatoria.

Está ampliamente aceptado que el crecimiento tumoral y la metástasis están regulados en gran medida por células presentes en el microambiente, como los fibroblastos y diferentes tipos de células del sistema inmune. Sin embargo, el papel del PC como célula del estroma tumoral apenas se ha abordado. En este trabajo demostramos que el cocultivo de células humanas de cáncer colorrectal (CCR) con PC promueve una firma molecular asociada a TGF- β en los PC que se traduce en la secreción de diversas citoquinas y quimioquinas y que se asocia con el riesgo de recidiva tras la cirugía en pacientes de CCR. Los PC incrementan *in vitro* la proliferación, migración, invasión y quimiorresistencia de las células de CCR y promueven la progresión tumoral *in vivo*. Una de moléculas secretadas por PC e identificadas como responsable de parte de estos efectos es IGF-BP3, cuya función en este contexto era prácticamente desconocida. En resumen, demostramos por primera vez el papel “angiocrino” de los PC en la promoción de las propiedades tumorigénicas del CCR.


Pericytes (PC) are supporting mural cells that surround the endothelial cells in the microvasculature, taking part in the stabilization of blood vessels and vascular homeostasis. In this study, we investigate the functional role of PC beyond the purely structural one, in the context of innate immunity and as a component of the tumor stroma. The expression of TLR4 in human PCs had previously been described in this laboratory; here, the characterization of pattern recognition receptors in PC is further explored, describing for the first time the expression of the NOD1 receptor in PC. In addition, its response to the C12-iE-DAP agonist has been demonstrated, which results in the secretion of proinflammatory molecules such as IL-6 and IL-8. Likewise, the NOD1 signaling pathway was discriminated against that of TLR4 by means of a specific inhibitor of NOD1 and it was found that both pathways can act synergistically, an event described only in monocytes and dendritic cells. Together, these results confirm that PCs play an active role in the inflammatory response.





It is widely accepted that cancer growth and metastasis are regulated to a great extent by stromal cells such as fibroblasts and different types of immune cells within the tumor microenvironment. However, the role of pericytes as tumor stroma cells had been hardly addressed. In this work we demonstrate that coculture of human CCR cells with PC promotes a molecular signature associated with TGF- β in PCs, that results in the secretion of various cytokines and chemokines and is associated with the risk of recurrence after surgery in CCR patients. PCs increase the proliferation, migration, invasion and chemoresistance of CCR cells in vitro and promote tumor progression in vivo. One of the molecules secreted by PC and identified as responsible for part of these effects is IGF-BP3, whose function in this context was practically unknown. In summary, we demonstrate for the first time the "angiocrine" role of PCs in promoting the tumorigenic properties of CRC cells.

ÍNDICE



✚	ÍNDICE	17
✚	ABREVIATURAS	25
✚	INTRODUCCIÓN	31
	INTRODUCCIÓN	33
1.	PERICITOS.....	33
1.1	Introducción histórica y ontogenia	33
1.2	Morfología y distribución	34
2.	PAPEL FUNCIONAL DEL PERICITO.....	36
2.1	Pericito y angiogénesis.....	36
2.2	Pericito e inmunidad innata	37
2.2.1	Expresión de receptores de reconocimiento de patrones.....	38
2.2.1.1	Receptores TLR y su expresión en pericitos	39
2.2.1.2	Receptores NOD y su expresión en pericitos	40
2.3	Pericitos e inmunidad adaptativa	41
3.	PERICITO Y MICROAMBIENTE TUMORAL.....	42
3.1	El pericito como parte del estroma tumoral.....	44
3.2	Papel del pericito en la angiogénesis tumoral	45
3.3	Modulación de la respuesta inmune en pericitos.....	46
3.4	Regulación “angiocrina” del crecimiento tumoral.....	48
3.4.1	Crecimiento tumoral y metástasis	49
3.4.2	<i>Cancer stem cell</i> y quimiorresistencia	50
3.4.3	Papel del TGF- β estromal	50
✚	OBJETIVOS	53
✚	MATERIALES Y MÉTODOS	57
1.	LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS	59
2.	ANTICUERPOS.....	59
3.	CONDICIONES Y MEDIOS ESPECIALES DE CULTIVO.....	61
3.1.	Medio de formación de esferas	61
3.2.	Medios condicionados	61
4.	CONSTRUCCIONES GÉNICAS	62
4.1.	Generación de vectores plasmídicos.....	62
4.2.	Generación y titulación de sobrenadantes lentivirales.....	62
4.3.	Transducción de líneas celulares humanas con partículas lentivirales.....	63
4.3.1.	Generación de células que expresan Luciferasa	63

4.3.2.	Silenciamiento génico	63
5.	CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL	64
5.1.	Aislamiento de ARN total	64
5.2.	Síntesis de ADNc por transcripción reversa	64
5.3.	Microarrays de ADN	64
5.4.	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	65
6.	ESTUDIOS DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS	66
6.1.	<i>Arrays</i> de anticuerpos inmovilizados en membrana.....	66
6.2.	ELISA.....	66
6.3.	Cuantificación de TGF- β 1 mediante inmunosensor amperométrico.....	66
7.	TRANSFERENCIA <i>WESTERN</i>	67
8.	CITOMETRÍA DE FLUJO	68
8.1.	Análisis de proteínas intracelulares	68
8.2.	Separación de poblaciones celulares	68
9.	MICROSCOPIA CONFOCAL.....	69
10.	ENSAYOS FUNCIONALES <i>in vitro</i>	69
10.1.	Ensayos de proliferación tumoral	69
10.2.	Ensayos de migración celular	70
10.3.	Ensayos de invasión.....	70
10.4.	Ensayos de formación de colonoesferas	71
10.5.	Ensayos de quimiorresistencia	71
11.	ENSAYOS <i>in vivo</i>	72
11.1.	Ensayos de crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	72
11.2.	Ensayos de imagen molecular (implantación tumoral).....	72
12.	ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	73
13.	ANÁLISIS DE LOS DATOS DE <i>MICROARRAYS</i> DE ADN	73
14.	ESTUDIOS ESTADÍSTICOS.....	74
	 RESULTADOS	75
1.	PAPEL DEL PERICITO EN LA INMUNIDAD INNATA.....	77
1.1.	Expresión de receptores de la familia NOD en pericitos.....	77
1.1.1.	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	77
1.1.2.	Citometría de flujo	77
1.1.3.	Inmunofluorescencia.....	78
1.2.	Respuesta proinflamatoria de PC a ligandos de NOD1	78
1.2.1.	Expresión de <i>IL6</i> e <i>IL8</i> mediante qRT-PCR.....	78

1.2.2.	Expresión de IL-8 mediante ELISA	79
1.2.3.	Efecto sinérgico de TLR4 y NOD1	79
1.3.	Estudio de la vía de señalización de NOD1	80
1.3.1.	Silenciamiento de <i>NOD1</i>	80
1.3.2.	Inhibición farmacológica de la vía de señalización de NOD1.....	81
1.3.3.	Mediadores de la vía de señalización de NOD1	82
2.	PAPEL DEL PERICITO EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL.....	83
2.1.	Efecto funcional <i>in vitro</i> del pericito sobre células de CCR.....	83
2.1.1.	Estudios de proliferación.....	83
2.1.2.	Estudios de migración	84
2.1.3.	Estudios de invasión	85
2.2.	Modulación del fenotipo <i>cancer stem cell</i> de las células de CCR.....	86
2.2.1.	Enriquecimiento en <i>cancer stem cell</i>	86
2.2.1.1.	Expresión del marcador aldehído deshidrogenasa 1	86
2.2.1.2.	Formación de colonoesferas	87
2.2.2.	Efecto sobre la quimiorresistencia de las células de CCR	89
2.3.	Crecimiento tumoral <i>in vivo</i>	90
2.4.	Análisis del perfil transcripcional del pericito en cocultivos con células de CCR	93
2.5.	Análisis del secretoma de pericitos tratados con TGF- β 1.....	98
2.6.	Efecto <i>in vitro</i> de IGF-BP3 sobre las propiedades tumorigénicas y <i>stem</i> de las células HCT 116	100
	 DISCUSIÓN	103
1.	PERICITO, NUEVAS PERSPECTIVAS EN LA INMUNIDAD INNATA.....	105
2.	PERICITO, NUEVO PROTAGONISTA DEL MICROAMBIENTE TUMORAL.....	107
	 CONCLUSIONES	115
	 BIBLIOGRAFÍA	119
	 ANEXO	141

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Pericitos.....	35
Figura 2. Vías de señalización de TLR4, NO1 y NOD2.....	41
Figura 3. Microambiente tumoral.....	44
Figura 4. Imágenes de pericitos obtenidas con microscopio electrónico de barrido.....	46
Figura 5. Pericito y sistema inmune.....	48
Figura 6. Cuantificación de TGF- β 1 mediante inmunosensor amperométrico.....	67
Figura 7. Expresión de <i>NOD1</i> y <i>NOD2</i> en pericitos.....	77
Figura 8. Expresión de <i>NOD1</i> en pericitos y células Jurkat.....	78
Figura 9. Inmunofluorescencia de <i>NOD1</i>	78
Figura 10. Activación de <i>NOD1</i> en pericitos.....	79
Figura 11. Secreción de IL-8 por pericitos.....	79
Figura 12. Efecto sinérgico de los agonistas de <i>NOD1</i> y TLR4 sobre la expresión de <i>IL8</i> en pericitos.....	80
Figura 13. Expresión de <i>NOD1</i> en pericitos tras su silenciamiento.....	80
Figura 14. Expresión de <i>IL8</i> en pericitos silenciados para <i>NOD1</i>	81
Figura 15. Papel de RIPK2 en la respuesta mediada por <i>NOD1</i>	81
Figura 16. Expresión de <i>IL8</i> tras el tratamiento con diferentes inhibidores en pericitos.....	82
Figura 17. Efecto dosis-respuesta sobre la expresión de <i>IL8</i> en pericitos tras el tratamiento con inhibidores de NF- κ B y p38.....	82
Figura 18. Capacidad proliferativa de la línea celular HCT 116 en presencia de pericitos.....	83
Figura 19. Capacidad proliferativa de la línea celular HT-29 en presencia de pericitos.....	84
Figura 20. Los pericitos promueven la capacidad migratoria de las células de CCR.....	85
Figura 21. Ensayo de invasión de células HCT 116 en matrigel utilizando pericitos, HCT 116 o medio de cultivo como atrayente.....	86
Figura 22. Expresión de ALDH1 en células HCT 116.....	87
Figura 23. Formación de colonoesferas por la línea celular HCT 116.....	87
Figura 24. Ensayo de formación de colonoesferas en presencia o no de pericitos.....	88
Figura 25. Expresión de <i>NANOG</i> en colonoesferas de células HCT 116.....	89
Figura 26. IC ₅₀ de células HCT 116 tratadas con 5-FU.....	89
Figura 27. Ensayo de quimiorresistencia en células HCT 116.....	90
Figura 28. Efecto del pericito sobre la progresión tumoral de las células HCT 116.....	91
Figura 29. Ensayo de implantación tumoral.....	92

Figura 30. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de α SMA en tumores resecados.....93

Figura 31. Microscopía confocal del cocultivo de células HCT 116 y pericitos.....93

Figura 32. Vía de señalización de TGF- β95

Figura 33. Validación mediante qRT-PCR de genes sobreexpresados en pericitos.....96

Figura 34. Asociación entre la firma genética P-TBR5 de pericitos y el mal pronóstico en pacientes con CCR.....96

Figura 35. Efecto de las células HCT 116 sobre la fosforilación de SMAD3 y la expresión de α -SMA en pericitos.....97

Figura 36. Secreción de TGF- β 1 por pericitos y células HCT 116 en monocultivo y cocultivo.....98

Figura 37. Secretoma de pericitos tratados con TGF- β 1.....99

Figura 38. TGF- β 1 induce la expresión de IGF-BP3 en pericitos humanos.....100

Figura 39. IGF-BP3 promueve la migración e invasión de las células de CCR a través de la activación de AKT.....101

Figura 40. Efecto de IGF-BP3 en las propiedades *stem* de las células HCT 116.....102

Figura 41. Mecanismos moleculares implicados en la interacción entre pericitos y células de CCR.....113

TABLAS

Tabla I. Líneas celulares, líneas celulares modificadas y células primarias.....59

Tabla II. Anticuerpos monoclonales.....60

Tabla III. Anticuerpos policlonales.....60

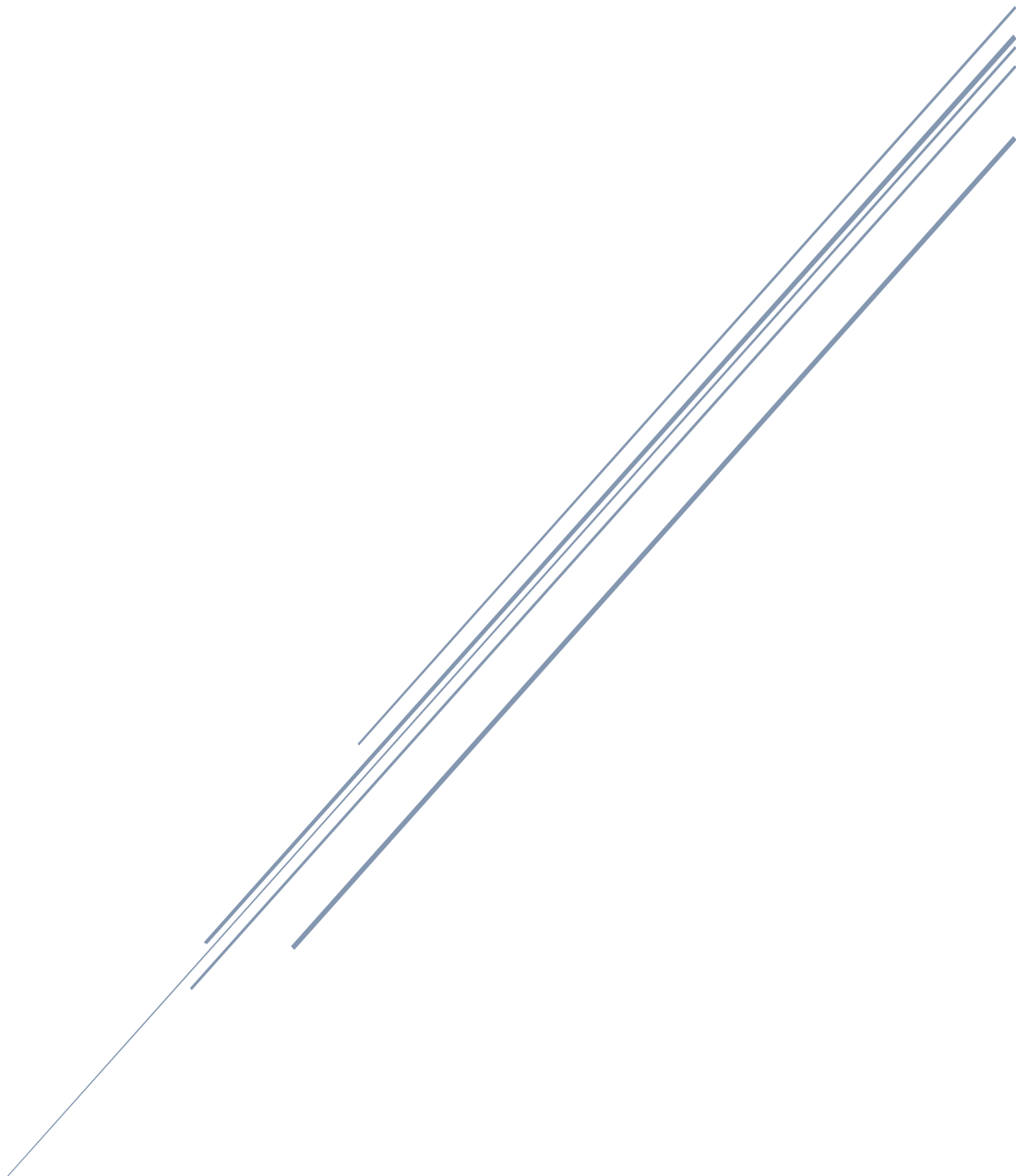
Tabla IV. Vectores plasmídicos para la generación de lentivirus.....62

Tabla V. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR.....65

Tabla VI. Análisis GO de genes significativamente sobreexpresados en PC cultivados con células de CCR.....94

Tabla suplementaria I......143

ABREVIATURAS

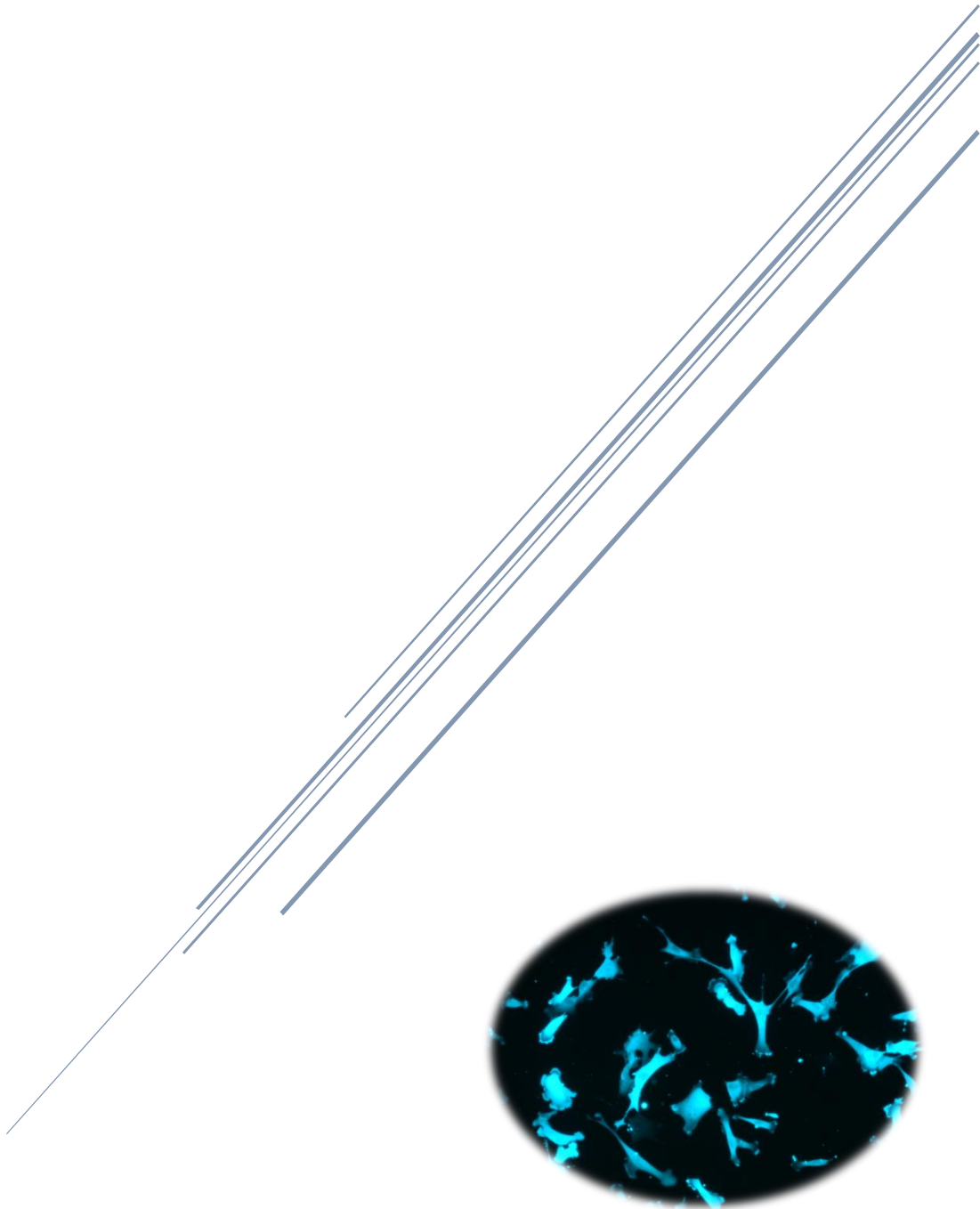


ALDH1	Aldehído deshidrogenasa 1
APC	Célula presentadora de antígeno (del inglés, <i>Antigen Presenting Cell</i>)
CAF	Fibroblasto asociado a cáncer (del inglés, <i>Cancer Associated Fibroblast</i>)
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas (del inglés, <i>Caspase Recruitment Domain</i>)
CDS	Sensores citosólicos de DNA (del inglés, <i>Cytosolic DNA Sensor</i>)
CE	Célula endotelial
CIC	Célula iniciadora de cáncer (del inglés, <i>Cancer Initiating Cell</i>)
CLR	Receptor de lectina tipo C (del inglés, <i>C-type Lectin Receptor</i>)
CSC	Células madre cancerosa (del inglés, <i>Cancer Stem Cell</i>)
DAMP	Patrón molecular asociado a daño celular (del inglés, <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>)
DAP	Ácido diaminopimélico (del inglés, <i>Diaminopimelic acid</i>)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>Epidermal Growth Factor</i>)
FGF	Factor de crecimiento de fibroblasto (del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor</i>)
HMGB1	Proteína 1 del grupo de alta movilidad (del inglés, <i>High Mobility Group Protein 1</i>)
HSP	Proteína de choque térmico (del inglés, <i>Heat Shock Protein</i>)
I.p.	Intraperitoneal
iE-DAP	Ácido γ -D-glutamil-meso-diaminopimélico
IFN- γ	Interferón gamma
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés, <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
LPS	Lipopolisacárido

LRRs	Repeticiones ricas en leucina (del inglés, <i>Leucine-rich Repeat</i>)
Luc	Luciferasa
LV	Vector lentiviral (del inglés, <i>Lentiviral Vector</i>)
MB	Bolas magnéticas (del inglés, <i>magnetic beads</i>)
MDP	Dipéptido muramilo (del inglés, <i>muramil dipeptide</i>)
MDSC	Célula mielóide supresora (del inglés, <i>Myeloid Suppressor Cell</i>)
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad II (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular (del inglés, <i>Matrix Metalloproteinases</i>)
MOI	Multiplicidad de infección (del inglés, <i>Multiplicity of Infection</i>)
MSC	Células madre mesenquimales (del inglés, <i>Mesenchymal Stem Cell</i>)
MT	Microambiente tumoral
NLR	Receptores NOD (del inglés, <i>NOD-like Receptor</i>)
NSCLC	Carcinoma de células pulmonares no pequeñas (del inglés, <i>Non-small-cell lung carcinoma</i>)
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno (del inglés, <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
PC	Pericito
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, <i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
PGN	Peptidoglicano
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones (del inglés, <i>Pattern Recognition Receptor</i>)
RLR	Receptores RIG (del inglés, <i>RIG-like Receptor</i>)
S.c.	Subcutáneo

SNC	Sistema nervioso central
TAM	Macrófago asociado a tumor (del inglés, <i>Tumor Associated Macrophage</i>).
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, <i>Transforming Growth Factor beta</i>)
TIR	Receptor Toll/IL-1 (del inglés, <i>Toll/interleukin-1 receptor</i>)
TLR	Receptor Toll (del inglés, <i>Toll-like Receptor</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés, <i>Tumor Necrosis alfa</i>)
Treg	Célula T reguladora
VSMC	Célula vascular lisa (del inglés, <i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>)
WH	Ensayo de cierre de herida (del inglés, <i>Wound Healing</i>)
α -SMA	Actina del músculo liso alfa (del inglés, <i>α-Smooth Muscle Actin</i>)

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

El funcionamiento normal de los tejidos depende del adecuado suministro de nutrientes y oxígeno, así como de la eliminación de los residuos metabólicos generados en ellos. El sistema circulatorio es el encargado de realizar este transporte, garantizando así el correcto funcionamiento de dichos tejidos. Mediante el proceso denominado vasculogénesis, este sistema comienza a formarse en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Ya en el adulto, ocurre el proceso denominado angiogénesis, que consiste en la generación de nuevos vasos por la ramificación y extensión de otros preexistentes. La neovascularización en adultos como respuesta a estímulos proangiogénicos se producen tanto en condiciones fisiológicas (ciclo reproductor femenino, cicatrización de heridas) como patológicas (crecimiento tumoral, enfermedades inflamatorias crónicas, degeneración macular asociada a la edad) (Hanahan and Folkman, 1996; Hanahan and Weinberg, 2011, 2000).

Los vasos sanguíneos están formados por células endoteliales (CE), rodeadas en los vasos maduros por células murales de soporte que los estabilizan y cuya naturaleza depende del tipo de vaso y de su localización anatómica (Jain, 2003). Las células murales que se encuentran en los capilares son los pericitos (PC), mientras que, en los vasos de mayor calibre, se localizan las células de músculo liso vasculares (VSMC, del inglés *Vascular Smooth Muscle Cells*). En realidad, las células murales de la microvasculatura son una población heterogénea que forma un continuo a lo largo del lecho microvascular, con fenotipos de transición entre los capilares y las arteriolas precapilares y vénulas postcapilares (Holm et al., 2018). En un trabajo reciente se han estudiado mediante *RNA-seq* los perfiles de expresión génica de células individuales que representaban todos los tipos celulares de la microvasculatura cerebral de ratón. Estos datos sugieren la existencia de dos subgrupos de células murales: los PC formarían un continuo con las VSMC de las vénulas a través de la pérdida gradual de marcadores de PC y adquisición de los marcadores de VSMC, y por otro lado estarían las VSMC de arterias y arteriolas, que tendrían una transición más abrupta con los PC (Vanlandewijck et al., 2018).

1. PERICITOS

1.1 Introducción histórica y ontogenia

Los PC fueron descritos por primera vez hace casi 150 años por Carl Joseph Eberth, pero fue Karl Wilhelm Zimmermann quien introdujo posteriormente el término de PC y el que mediante microscopía electrónica demostró su presencia alrededor de los capilares de numerosas especies, postulando que la permeabilidad de los vasos era modificada por la contracción de los PC (Zimmermann, 1923).

Mientras que el origen de las CE está ampliamente aceptado, a partir de un precursor denominado angioblasto que surge del mesodermo durante la vasculogénesis (Swift and Weinstein, 2009), el de las células murales es más controvertido. En realidad, los PC tienen una ontogenia compleja, ya que se pueden desarrollar a partir de diferentes linajes durante el desarrollo embrionario.

La cresta neural, derivada del ectodermo, daría origen a los PC del sistema nervioso central (SNC) y del timo, pero los que se encuentran en órganos como el pulmón, corazón, hígado e intestino procederían del mesotelio (el epitelio escamoso que recubre las cavidades celómicas y sus órganos). En el resto de órganos, los PC derivarían del mesodermo (Armulik et al., 2011; Harrell et al., 2018). Esto indicaría un origen tejido-específico de los PC, pero recientemente se ha observado que algunos PC de la piel y el cerebro tienen un origen hematopoyético, lo que implica que dentro de un mismo tejido también puede tener una procedencia heterogénea (Dias Moura Prazeres et al., 2017). En el adulto, se ha comprobado que las células murales pueden ser reclutadas a partir de la médula ósea durante el proceso de angiogénesis (Rajantie et al., 2004), e incluso se ha sugerido su posible transdiferenciación a partir de CE (DeRuiter et al., 1997; Jain, 2003).

Numerosos trabajos han relacionado ontogénicamente los PC con las células progenitoras mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cell*), células multipotentes derivadas del mesodermo con capacidad de diferenciación en osteoblastos, condroblastos y adipocitos, y propuestas también como precursores de PC (Dhar et al., 2010; Díaz-Flores et al., 2006; Ergün et al., 2011; Howson et al., 2005). De hecho, durante casi una década se asumió que las MSC de los tejidos eran células perivasculares que se identificaron con los PC (Corselli et al., 2010; Crisan et al., 2008). *In vitro*, PC de diferentes orígenes demostraron no solo potencial osteo-, condro- y adipogénico (Chen et al., 2015), sino que también podían diferenciarse hacia fibras musculares (Dellavalle et al., 2011), lo que ha planteado su utilidad en terapias regenerativas (Harrell et al., 2018). De hecho, se demostró que tanto los PC como las MSC eran capaces de rescatar fracturas óseas atróficas (Tawonsawatruk et al., 2016). Sin embargo, un estudio reciente cuestiona esa plasticidad *in vivo* (Guimarães-Camboa et al., 2017). PC de diferentes tejidos, aislados de ratones transgénicos, se comportaron efectivamente como MSC *in vitro*, diferenciándose a hueso, cartílago y grasa. Pero el seguimiento de su progenie *in vivo* en modelos de lesión tisular o envejecimiento reveló que mantenían su identidad en cerebro, corazón, músculo y grasa, sin dar lugar a otros tipos celulares.

1.2 Morfología y distribución

Los PC están en contacto íntimo con las CE, embebidos en la membrana basal vascular que es compartida y mantenida por ambos tipos celulares (Stratman et al., 2009). Son células

elongadas con un núcleo prominente y extensiones citoplasmáticas que se extienden rodeando los capilares por su cara abluminal (**Figura 1**). La densidad de PC varía dependiendo del tipo de vaso y del tejido, siendo muy abundantes en el SNC y mucho más escasos en músculo esquelético (Díaz-Flores et al., 1991). Dependiendo del órgano en el que se encuentren pueden recibir diferentes nombres al realizar funciones específicas de tejido, como las células hepáticas estrelladas en el hígado (Suematsu and Aiso, 2001) y las células mesangiales en el riñón (Betsholtz, 2004).

Los PC no sólo sirven de soporte físico como se pensaba históricamente, sino que se comunican con la CE mediante contacto directo en puntos donde la membrana basal se interrumpe y a través de señales paracrinas. Estos contactos son de diferente naturaleza; por un lado, las uniones gap comunican directamente el citoplasma de los PC y de las CE permitiendo el intercambio de iones y moléculas pequeñas (Fujimoto, 1995). A su vez, los contactos tipo “*peg-socket*” consisten en una extensión del citoplasma del PC que se introduce en una invaginación de la CE (Armulik et al., 2011). Las placas de adhesión son áreas que conectan el citoesqueleto de PC con el de CE ayudando a la transmisión de las fuerzas mecánicas contráctiles y que están formadas por diferentes proteínas como N-cadherinas, β -cateninas y fibronectina (Gerhardt and Betsholtz, 2003).

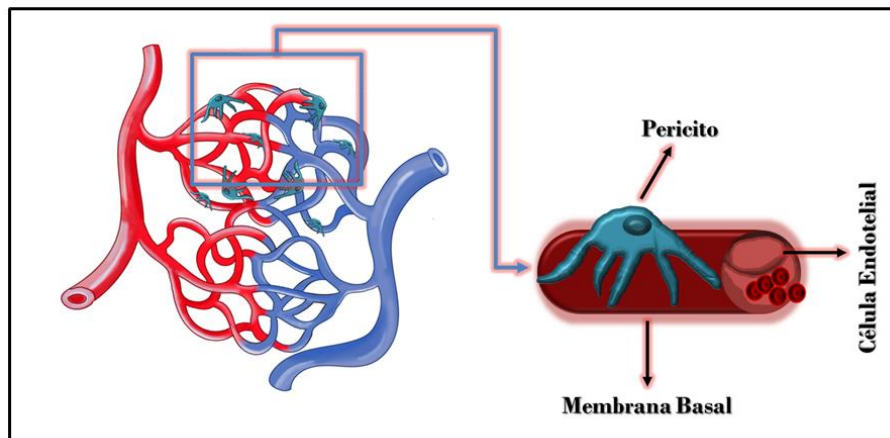


Figura 1. Pericitos. Red de capilares y vénulas dónde los pericitos se encuentran rodeando a las CE (células endoteliales) compartiendo con éstas la membrana basal.

No existe un marcador molecular específico de PC, de modo que para su identificación se utiliza una serie de marcadores positivos y negativos, que, en su conjunto, definiría a este tipo celular. Los marcadores más utilizados son el receptor para PDGF (del inglés, *platelet derived growth factor*) PDGFR- β , NG2 (del inglés, *Neural/glial antigen 2*), RGS5 (del inglés, *regulator of G protein signaling-5*), α -SMA (del inglés, α -smooth muscle actin), desmina, aminopeptidasa

N (CD13), endoglina (CD105) y la molécula de adhesión CD146, entre otros (Díaz-Flores et al., 2009a; Guijarro-Muñoz et al., 2014; Navarro et al., 2016).

Aunque ha sido ampliamente utilizado como marcador de PC, α -SMA parece estar restringido a PC activados o transdiferenciados a miofibroblastos. De hecho, los PC analizados en el trabajo de *Vanlandewijck et al.* (Vanlandewijck et al., 2018) se caracterizaban por una expresión nula o muy baja de *Acta2*, el gen que codifica α -SMA, en contraste con la alta expresión en VSMC de arteriolas. Sin embargo, la expresión de *Cspg4* (que codifica NG2) y *Pdgfrb* era mucho más constante a lo largo del espectro de células murales. Estudios posteriores han identificado como marcadores novedosos de PC a los factores de transcripción Gli1 (Kramann et al., 2015) y Tbx18 (Guimarães-Camboa et al., 2017). En definitiva, ninguno de los marcadores anteriores es exclusivo de PC ni todos los PC los expresan; su expresión es dinámica, varía dependiendo de la especie, el tejido, la localización dentro del árbol microvascular y el estado de diferenciación. También puede verse alterada en determinadas situaciones fisiológicas y patológicas y en diferentes etapas de desarrollo (Armulik et al., 2011; Díaz-Flores et al., 2009a). Actualmente, se consideran criterios suficientes para identificar a esta célula la expresión de al menos dos de estos marcadores, generalmente PDGFR- β y NG2, así como la morfología característica y la ubicación de la célula en contacto íntimo con la CE compartiendo la misma membrana basal. El rastreo del linaje celular en ratones transgénicos, que expresan genes reporteros bajo el control transcripcional de promotores “específicos” de células murales, aportará una valiosa información sobre el origen y la participación en diferentes procesos de los PC *in vivo* (Birbrair et al., 2013; Hill et al., 2015; Schallek et al., 2013; Whitesell et al., 2014).

2. PAPEL FUNCIONAL DEL PERICITO

2.1 Pericito y angiogénesis

Los PC tienen un papel bien conocido en la angiogénesis y la homeostasis vascular, participando en la maduración y la estabilización de los vasos. En las fases iniciales del proceso angiogénico, los PC se disocian del endotelio y la membrana basal es degradada por la acción de metaloproteasas de matriz extracelular (MMP, del inglés *Matrix Metalloproteinases*) (Carmeliet and 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 las CE y los PC (Nagy et al., 2012). Después, algunas CE forman el extremo del brote vascular y las adyacentes proliferan para extenderlo. Finalmente, tiene lugar el ensamblaje de nuevo de las CE y el reclutamiento de PC que estabilizan los vasos. Sin embargo, algunos estudios dan mayor protagonismo a los PC en este proceso, ya que sugieren

que serían éstos los que iniciarían el brote vascular y posteriormente servirían de guía a las CE en su migración para formar el nuevo vaso (Ozderdem and Stallcup, 2003; Virgintino et al., 2007).

Los PC tienen también un papel fundamental en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Armulik et al., 2010) y hematorretiniana (Park et al., 2017). Por el contrario, su capacidad de regular el tono vascular y el flujo sanguíneo es más controvertida (Cai et al., 2018; Hall et al., 2014; Hill et al., 2015), aunque estas discrepancias pueden ser más aparentes que reales y deberse al uso de diferentes criterios para definir qué es un PC (Attwell et al., 2016).

La íntima relación anatómica de CE y PC sugiere una estrecha interacción través de señalización paracrina y yuxtacrina. Varias vías de señalización se han implicado en la comunicación CE-PC, incluyendo PDGF-B/PDGFR- β , TGF- β /ALK1/5, angiopoyetina-1/ Tie-2 y Jag1/Notch3 (Gaengel et al., 2009).

2.2 Pericito e inmunidad innata

Estudios pioneros atribuyeron a los PC murinos características de células presentadoras de antígeno (APC, del inglés *Antigen Presenting Cell*) que expresaban marcadores tales como CD11b, CD68, CD163, moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II, del inglés *Major Histocompatibility Complex*), CD45, receptores para la región Fc de las inmunoglobulinas y receptores *scavenger*, entre otros (Balabanov et al., 1999, 1996; Nyland and Nilsen, 1982). También se les atribuyeron funciones propias de macrófagos como pinocitosis y fagocitosis (Balabanov et al., 1996; Pardridge et al., 1989). Sin embargo, algunos de estos hallazgos se cuestionan actualmente ya que la identificación de los PC utilizados en estos estudios no es concluyente, pudiéndose atribuir dichos resultados a la presencia en el cultivo de macrófagos perivasculares (Krueger and Bechmann, 2010). Según estudios más recientes, los PC de cerebro humano no expresan MHC-II en condiciones basales, aunque el tratamiento con IFN- γ induce su expresión; no así la de CD80 y CD86 (Domev et al., 2014).

Se ha demostrado que las CE secretan un gran número de citoquinas y quimioquinas en respuesta a diversos estímulos proinflamatorios *in vitro* (Mai et al., 2013), que median el reclutamiento de leucocitos *in vivo* en diversas condiciones inflamatorias (Speyer and Ward, 2011). De manera similar, PC de diferentes orígenes secretan gran variedad de quimioquinas y citoquinas en respuesta a estímulos tales como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , que también promueven la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS, del inglés *inducible Nitric Oxide Synthase*) (Matsumoto et al., 2014; Pieper et al., 2014). De hecho, los PC humanos son más sensibles a la estimulación con IL-17 que las CE en lo que se refiere a la producción de factores proinflamatorios (Liu et al., 2016). Entre los factores proinflamatorios comúnmente regulados en PC destacan CXCL1, CXCL8 (IL-8), CXCL10, IL-6, CCL2, CCL3 y CCL5. En conjunto, estos

factores solubles producidos por los PC son capaces de modular el tráfico de neutrófilos, monocitos, células CD8 y NK.

Además de potenciar la respuesta inflamatoria, estas moléculas también pueden tener un papel clave en la angiogénesis asociada a la inflamación. CXCL1 y CXCL8 pertenecen al grupo de quimioquinas que promueven la migración y proliferación de las CE. Además, CCL2 es un conocido mediador de neovascularización (Keeley et al., 2011). Este patrón de producción de quimioquinas sugiere un doble rol para los PC según su estado de activación; en condiciones fisiológicas, mantienen las CE en un estado quiescente, pero los PC activados podrían actuar como promotores de angiogénesis durante procesos inflamatorios.

Durante mucho tiempo los PC han sido ignorados en el contexto del tráfico leucocitario a través de los vasos, sin embargo, trabajos recientes les atribuyen un papel clave en el reclutamiento y extravasación de leucocitos a los sitios de inflamación. Estudios de microscopía intravital han mostrado cómo las células inmunes infiltrantes atraviesan la membrana basal y la cobertura de PC después de su migración transendotelial, y cómo esta interacción modula su comportamiento (Nourshargh et al., 2010; Weninger et al., 2014). Así, se ha observado que los PC facilitan la transmigración de neutrófilos en un modelo de músculo de ratón tratado con TNF- α o IL-1 β *in vivo*, proporcionando un soporte físico para los neutrófilos que se desplazan a lo largo de sus procesos celulares hasta encontrar un espacio libre entre PC adyacentes (Proebstl et al., 2012; Wang et al., 2012). Estos espacios aumentan cuando los PC se relajan, favoreciendo la extravasación de los neutrófilos (Pellowe et al., 2018).

La expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en PC de cerebro humano tratados con lipopolisacárido (LPS) se incrementa considerablemente, promoviendo un aumento significativo de la adhesión de células mononucleares de sangre periférica a los PC (Guijarro-Muñoz et al., 2014). Otro factor quimiotáctico producido por PC es CXCL8, cuya expresión aumenta tras el tratamiento con LPS, TNF- α o IL-1 β , y promueve la migración de neutrófilos en un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica (Pieper et al., 2013).

2.2.1 Expresión de receptores de reconocimiento de patrones

Varios tipos de receptores, denominados conjuntamente receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*), son responsables de detectar patrones moleculares conservados asociados a patógenos (PAMP, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) o a daño celular (DAMP, del inglés *Damage-Associated Molecular Pattern*) (Brubaker et al., 2015). Al primer grupo pertenecen productos bacterianos o virales y al segundo grupo, ligandos endógenos como la citoquina HMGB1 (del inglés, *High Mobility Group Protein 1*) (Park et al., 2004) o las proteínas HSP (del inglés, *Heat Shock Protein*) (Vabulas et al., 2001). Cinco familias de PRR se han identificado en mamíferos, TLR (del inglés, *Toll-like Receptor*),

NLR (del inglés, *NOD-like Receptor*), RLR (del inglés, *RIG-like Receptor*), CDS (del inglés, *Cytosolic DNA Sensor*) y CLR (del inglés, *C-type Lectin Receptor*); siendo las dos primeras las más estudiadas y mejor caracterizadas. Se expresan en diferentes compartimentos celulares, como la superficie celular, el endosoma, el lisosoma o el citoplasma, y activan vías de señalización específicas que conducen a la expresión de genes que adaptan las respuestas inmunitarias a estímulos concretos.

2.2.1.1 Receptores TLR y su expresión en pericitos

Los TLR son glicoproteínas de membrana que contienen un dominio extracelular con módulos LRR (del inglés, *Leucine-rich Repeat*) responsables del reconocimiento de componentes estructurales en la superficie de microorganismos, un dominio transmembrana y un dominio TIR (del inglés, *Toll/interleukin-1 Receptor/resistance protein*) clave para la transducción de la señal. El miembro prototipo de esta familia es TLR4, el receptor de LPS. LPS es un componente principal de la membrana externa de las bacterias Gramnegativas que actúa como un potente inmunoestimulador, responsable del shock séptico. La respuesta a LPS requiere un complejo multi-receptor que involucra TLR4, MD-2, LBP (proteína de unión a LPS) y CD14 (Miyake, 2007). La activación de TLR4 pone en marcha una cascada de señalización intracelular que a través de las proteínas adaptadoras MyD88 and TRIF activa al factor de transcripción NF- κ B (**Figura 2**). Una vez activado, NF- κ B migra al núcleo y se une a regiones promotoras de un conjunto de genes que codifican citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión entre otros. La expresión de TLR4 ha sido descrita en células del sistema inmune innato como monocitos, macrófagos y células dendríticas, así como en algunos tipos de células epiteliales y CE (Kumar et al., 2004; Lu et al., 2012).

Sin embargo, la expresión de PRR en PC apenas había sido estudiada hasta fechas recientes. Una serie de trabajos pioneros mostraron la respuesta a LPS de PC de pulmón de rata, caracterizada por un incremento en la producción de IL-1 β , HSP60 y HSP70 (Edelman et al., 2007a, 2007b, 2006a). Posteriormente, también se observó la liberación de óxido nítrico y varias citoquinas y quimioquinas por parte de PC cerebrales de ratón tratados con LPS (Kovac et al., 2011). Pero fue en nuestro laboratorio donde se documentó por primera vez la expresión de TLR4 por parte de PC cerebrales humanos y su capacidad de respuesta tanto a LPS como al ligando endógeno HMGB1 (Guijarro-Muñoz et al., 2014). En este estudio, el perfil transcripcional de los PC tratados con LPS se caracterizó mediante *microarrays* de ADN, y la secreción de una serie de citoquinas y quimioquinas (incluyendo IL-6, CXCL1, CXCL8 y CCL2) se demostró usando *arrays* de anticuerpos, siendo poco después confirmada por otro grupo (Jansson et al., 2014). Recientemente, se ha estudiado el efecto proinflamatorio de los PC *in vivo* en un modelo de lesión pulmonar por administración de LPS, observando un incremento significativo de la expresión de

ICAM-1, IL-6, CXCL1 y CCL2. Es más, la eliminación de PC disminuía el infiltrado leucocitario en el lavado broncoalveolar tras la administración de bleomicina (Hung et al., 2017).

2.2.1.2 Receptores NOD y su expresión en pericitos

Los NLR se identificaron por primera vez en plantas en las que desempeñan una función crítica en la resistencia a enfermedades frente a patógenos microbianos y parásitos. Sus homólogos están presentes en vertebrados y en los organismos filogenéticamente más primitivos, por lo que su conservación evolutiva sugiere que desempeñan una función importante en la defensa del huésped. Los NLR se expresan en muchos tipos de células, incluidas las células inmunitarias y las células epiteliales, aunque ciertos miembros de la familia de los NLR se expresan principalmente en fagocitos que incluyen macrófagos y neutrófilos (Franchi et al., 2009).

NOD1 y NOD2, los miembros más conocidos de la familia NLR, son un grupo especializado de proteínas intracelulares que desempeñan un papel crítico en la regulación de la respuesta inmune innata del huésped a través del reconocimiento citosólico de motivos peptidoglicano (PGN) (Caruso et al., 2014). Ambos son proteínas compuestas por múltiples dominios que contienen una serie de LRR en el extremo C-terminal que detectan los PAMP responsables de la unión al ligando, un dominio central NOD (también conocido como NACHT) y uno o dos dominios CARD (del inglés, *Caspase Recruitment Domain*) en el extremo N-terminal que conforman la región efectora. NOD1 reconoce el ácido γ -D-glutamil-meso-diaminopimélico (iE-DAP), que se encuentra formando parte de los PGN de todas las bacterias Gramnegativas, así como en ciertas bacterias Grampositivas como *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes* (Chamaillard et al., 2003). Por otro lado, NOD2 reconoce el dipéptido muramil (MDP, del inglés *Muramyl Dipeptide*) de los PGN, que también está presente en las bacterias Gramnegativas y Grampositivas (Girardin et al., 2003). A través de la interacción vía CARD con la serina-treonina quinasa RICK (también llamada Ripk2 o RIP2) y la activación de la quinasa TAK1 (Inohara et al., 2005), los receptores NOD activan MAPK y NF- κ B que conduce la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa (**Figura 2**).

NOD1 se expresa en diferentes tipos celulares de origen tanto hematopoyético como no hematopoyético, incluidas las CE, donde se ha demostrado que es crítico en la detección de patógenos (Gatheral et al., 2012) y en la mediación de la inflamación vascular (Nishio et al., 2011). Por su parte, la expresión de NOD2 está más restringida a células especializadas de la inmunidad innata. A pesar de su interés y su importante función, la expresión de estos PRR en PC no había sido estudiada con anterioridad.

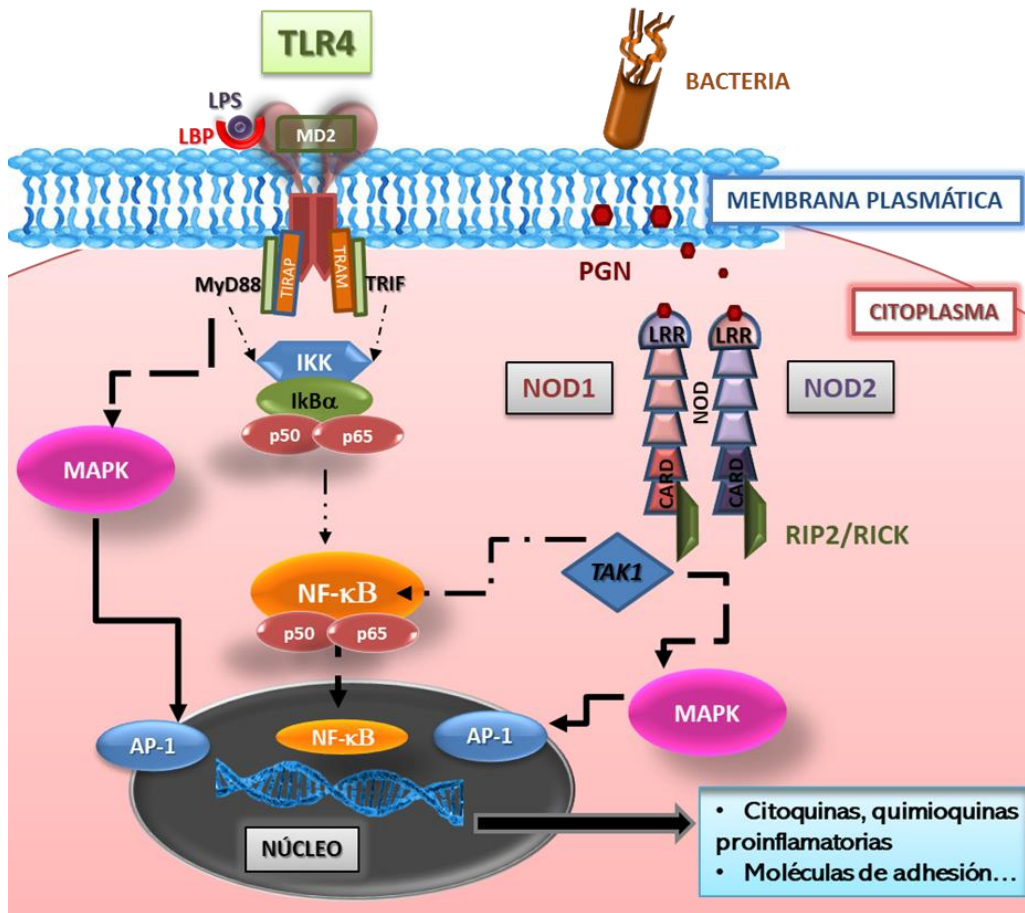


Figura 2. Vías de señalización de TLR4, NOD1 y NOD2. La respuesta a LPS requiere un complejo que involucra TLR4, MD-2 y LBP (proteína de unión a LPS) y que pone en marcha una cascada de señalización intracelular activando el factor de transcripción NF-κB o alternativamente MAPK. Los receptores NOD tienen LRR en el extremo C-terminal, responsables de la unión al ligando, y dominios CARD que se unen a RIP2/RICK señalizando también a través de MAPK y NF-κB.

2.3 Pericitos e inmunidad adaptativa

La ubicación estratégica de los PC les permite no solo regular el tráfico de células T, si no también modular su activación (Pober and Tellides, 2012). Así, se ha observado que el cocultivo de PC humanos de placenta tratados con IFN-γ y células T convierte a éstas en anérgicas, efecto atribuido al menos en parte a la secreción de TGF-β e IL-10 por parte de los PC estimulados (Maier and Pober, 2011). El tratamiento de los PC con IFN-γ también induce la expresión de PD-L1, PD-L2 e indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO), lo que también podría justificar la inactivación de las células T (Liu et al., 2018; Pober et al., 2017).

En otro estudio con PC de retina se demostró también este efecto inmunosupresor, atribuido tanto a factores solubles como a contactos intercelulares, ya que anticuerpos bloqueantes anti-PD-L1 o anti-IL-10 solo lo revertían parcialmente (Tu et al., 2011).

Existe también algún estudio que relaciona a los PC de diferentes orígenes con la generación de células T reguladoras (Tregs). Se ha demostrado que el cocultivo de PC con células T de sangre periférica no activadas aumentaba el porcentaje de CD25⁺ FoxP3⁺, y este efecto estaba mediado tanto por PD-L1/2 como por TGF- β (Domev et al., 2014).

3. PERICITO Y MICROAMBIENTE TUMORAL

El cáncer es causado por una acumulación de alteraciones genéticas, epigenéticas y transcripcionales que confieren propiedades clave a las células cancerosas como proliferación sostenida, invasión, metástasis, inmortalidad replicativa y angiogénesis, así como la capacidad de evadir la supresión del crecimiento y la apoptosis. Estas propiedades son descritas colectivamente como las señas de identidad de las células cancerosas (Hanahan and Weinberg, 2011).

El cáncer colorrectal (CCR), modelo en el que está basado este estudio, es el tercer tipo de cáncer más común en el mundo y se define como un carcinoma o cáncer de células epiteliales cuya afectación se encuentra en el colon o el recto. Comienza con la transformación del epitelio normal en un pólipo adenomatoso benigno que progresa a adenoma avanzado y finalmente a carcinoma. Los tratamientos actuales para el CCR siguen siendo la cirugía y la quimioterapia clásica (como los regímenes basados en el 5-Fluorouracilo (5-FU), FOLFOX y FOLFIRI) y el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) (como cetuximab y panitumumab) o frente a VEGF (como bevacizumab).

El crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis son procesos regulados estrechamente por las células presentes en el microambiente tumoral (MT), constituido por células no malignas como las que forman los vasos sanguíneos y linfáticos, fibroblastos asociados a cáncer (CAF, del inglés, *Cancer Associated Fibroblast*), células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cell*) y diversos tipos de células inmunes infiltrantes, así como por la matriz extracelular (**Figura 3**) (Hui and Chen, 2015; Pietras and Ostman, 2010). Las células tumorales explotarían su microambiente liberando factores solubles que activan a las células normales en su entorno inmediato, iniciando una cascada de eventos que se retroalimenta y rápidamente escapa a cualquier tipo de regulación (Dvorak et al., 2011).

Una de las células más estudiadas en este contexto son los CAF, que depositan proteínas de matriz extracelular y producen proteasas en un intento de “reparar” el tejido, favoreciendo así el crecimiento y la invasión tumorales (Levental et al., 2009; Spaeth et al., 2009). La firma molecular expresada por CAF se asocia a peor pronóstico tanto en carcinoma de células pulmonares no pequeñas (NSCLC) (Navab et al., 2011) como en CCR (Herrera et al., 2013). Los CAF influyen en la capacidad migratoria y proliferativa de las células tumorales mediante la expresión del factor de transcripción SNAI1, clave en la transición epitelio-mesenquimal (Alba-Castellón et al., 2016; Herrera et al., 2014). La secreción de diversas citoquinas por parte de los

CAF influye también de manera directa en la modulación del cáncer. Así, la IL-6 y la IL-32 promueven la transición epitelio-mesénquima en células de CCR (Rokavec et al., 2014) y en cáncer de mama (Wen et al., 2018). Por otro lado, la IL-11 secretada por las células estromales ha sido relacionada con quimiorresistencia. En un modelo de cáncer de pulmón, la exposición de CAF a cisplatino inducía la secreción de IL-11, que a su vez aumentaba la expresión de Bcl-2 y survivina vía STAT3 en células cancerosas, incrementando así finalmente su resistencia al tratamiento *in vivo* e *in vitro* (Tao et al., 2016). Los CAF también producen IL-6, que se ha asociado a la resistencia a cisplatino de células de cáncer de pulmón a través de la vía de señalización IL-6/STAT3 (Shintani et al., 2016; L. Wang et al., 2017) y de la vía de señalización IL6/CXCR7 en pacientes con carcinoma esofágico, relacionándose con peor pronóstico (Qiao et al., 2018). Recientemente, en un ensayo de invasión, se ha observado como los CAF coinvaldan junto con las células cancerosas, lo que podría tener lugar en los tejidos diana que serán posteriormente metastatizados. Este evento tiene lugar implicando una invasión dirigida por los propios CAF al inducir la apoptosis de las células cancerosas en contacto no permitiendo que proliferen, pero sí instruyendo su invasión. Las células cancerosas apoptóticas liberan vesículas que estimulan la invasión de los CAF y por tanto acelera la propagación de células cancerígenas dirigidas por éstos (Itoh et al., 2017).

Las células inmunes también responden activamente a las señales producidas por el tumor, lo infiltran y producen a su vez factores solubles (Zumsteg and Christofori, 2009) que pueden tener un papel pro- o antitumorigénico. Un ejemplo de función protumorigénica sería el efecto causado por los TAM (del inglés, *Tumor Associated Macrophage*) que forman la mayor parte de infiltrado leucocitario. Los TAM expuestos a IL-4 sobreexpresan VEGF induciendo la angiogénesis, así como EGF, promoviendo la metástasis en un modelo de carcinoma mamario (Ruffell et al., 2012). Por otro lado, las células Treg son atraídas al tumor a través de la secreción de CCL22 por parte de las células tumorales y los macrófagos. Estas células son capaces de suprimir la función de varias de las células inmunes que se encuentran en el MT mediante la secreción de IL-10 y TGF- β previniendo así la destrucción del tumor (Tanaka and Sakaguchi, 2017). Curiosamente, las células Treg, que se presume que actúan principalmente de manera protumorigénica también pueden ejercer una función antitumorigénica en ciertas circunstancias en virtud de su capacidad para suprimir la inflamación que promueve el tumor (Erdman et al., 2005). En este trabajo, la inmunoterapia adoptiva con células reguladoras CD4⁺ CD25⁺ previene el desarrollo de adenomas intestinales en el modelo de ratón intestinal ApcMin/+, además de inducir la regresión de los adenomas establecidos, requiriendo IL-10 (una de las citoquinas antiinflamatorias más potente conocida) para el efecto terapéutico. En el desarrollo de tumores coexisten mecanismos antitumorigénicos y protumorigénicos inmunes e inflamatorios, pero si el tumor no es rechazado, el efecto protumorigénico predomina. Lo que hace que el mismo

subconjunto de células T sea antitumoral en un cáncer y protumorigénico en otro sigue siendo en gran parte desconocido y puede ser la clave para el desarrollo de una inmunoterapia exitosa (Grivennikov et al., 2010).

La inflamación también puede preceder y contribuir de manera directa a la aparición del tumor (Coussens et al., 2013). De hecho, la inflamación crónica puede promover el desarrollo del cáncer (Hussain and Harris, 2007), siendo un ejemplo de ello la enfermedad inflamatoria intestinal, uno de los factores de riesgo más importantes para el CCR (Terzić et al., 2010). Lo que sí parece evidente es que los tumores, relacionados o no con inflamación crónica, suelen contener un microambiente inflamatorio.

La producción de VEGF por parte de las células tumorales promueve la proliferación y migración de las CE de vasos próximos; y el PDGF recluta y activa células murales de soporte (Abramsson et al., 2003). A su vez, las células que constituyen los vasos tumorales modulan directamente el crecimiento tumoral, en lo que se ha llamado regulación “angiocrina”, que se tratará más adelante (Franses et al., 2011).

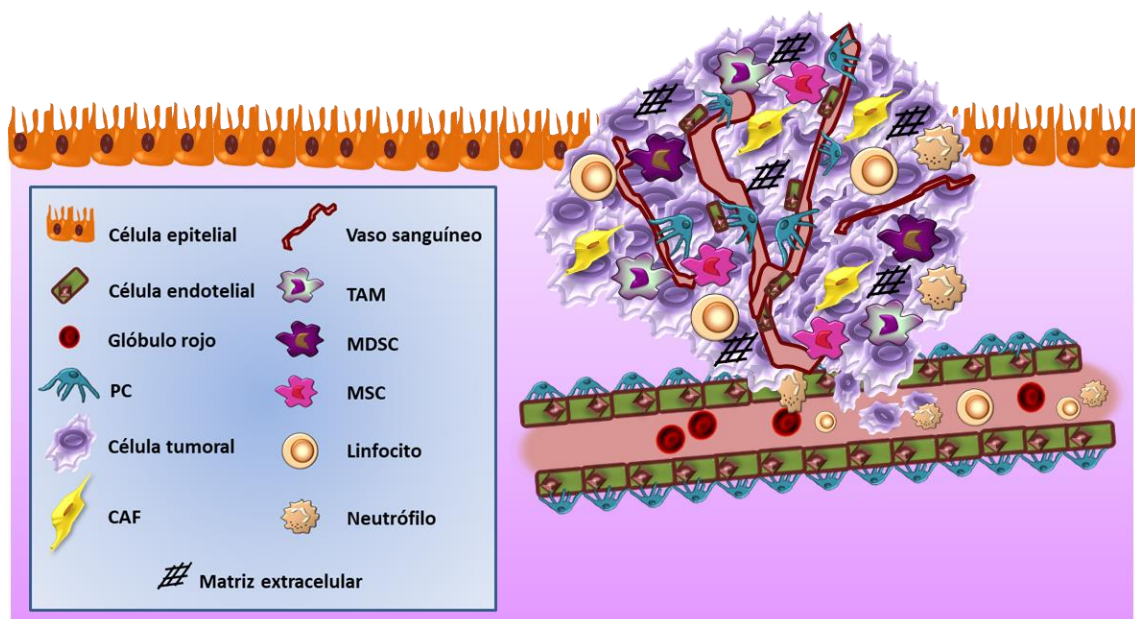


Figura 3. Microambiente tumoral. Esquema representativo de la composición del microambiente tumoral. Pericito (PC), fibroblasto asociado a tumor (CAF), macrófago asociado a tumor (TAM), célula madre mesenquimal (MSC), célula mieloidesupresora (MDSC).

3.1 El pericito como parte del estroma tumoral

Los PC son componentes genuinos del MT, pero su papel ha sido poco caracterizado en comparación con el de otros tipos celulares como los CAF. De hecho, existe controversia sobre hasta qué punto los PC están presentes en los vasos tumorales. Algunos estudios sugerían una escasa cobertura del endotelio tumoral por PC que se relacionaba con una vasculatura anómala y

un mal pronóstico en glioblastoma y carcinoma renal, donde habría menos PC que en sus tejidos homólogos sanos (Raza et al., 2010). Sin embargo, en otros tipos de cáncer se ha observado una cobertura de PC que oscila entre el 50% y el 95% de los vasos, como en melanomas y algunos tipos de carcinomas (Bose et al., 2016). Esta discrepancia puede deberse, al menos en parte, a las diferencias en la expresión de los marcadores utilizados para identificar a los PC. La mayoría de los estudios empleaban un solo marcador, identificando la falta de inmunorreactividad con la ausencia de PC. En realidad, apenas se conoce la variabilidad de expresión de marcadores de PC entre diferentes tipos de tumores, o incluso dentro de un mismo tumor, ya que pueden albergar PC de diferentes orígenes (Hasumi et al., 2007; Song et al., 2005).

Lo que sí parece claro es que la asociación de los PC con las CE en los vasos tumorales es anómala (**Figura 4**). En un estudio con ratones transgénicos RIP-Tag2 en el que los PC estaban presentes en más del 97% de los vasos tumorales, se observó que su asociación con el endotelio era laxa, con una separación anormal entre células SMA⁺ y CD31⁺. Los PC presentaban además procesos citoplasmáticos que penetraban en el parénquima tumoral (Morikawa et al., 2002).

Un estudio reciente ha revelado que el MT es más complejo y heterogéneo de lo que se consideraba hasta ahora en lo que se refiere a la naturaleza de las células estromales (Lambrechts et al., 2018). El análisis del transcriptoma de célula única mediante *RNA-seq* en más de 84.000 células estromales de cáncer de pulmón ha identificado 52 subtipos, incluyendo fibroblastos, CE y células inmunes que hasta ahora se consideraban homogéneos. En este trabajo, los PC colocalizaban con el subtipo de fibroblastos más activados y con los niveles más altos de *ACTA2*, en el que aparecen como un subgrupo de células caracterizadas por la expresión de *RGS5*.

3.2 Papel del pericito en la angiogénesis tumoral

La situación de hipoxia que se produce cuando los tumores crecen más allá de un tamaño crítico pone en marcha el proceso de angiogénesis, desencadenado fundamentalmente por la producción de VEGF, y que tiene como objetivo restaurar el suministro de oxígeno y nutrientes. La angiogénesis tumoral conduce a una vasculatura caótica, mal organizada, con vasos tortuosos e irregulares y con permeabilidad excesiva (Bergers and Benjamin, 2003; De Palma et al., 2017; Folkman, 2003). Estas anomalías se han atribuido a la disminución en el número de PC y/o a la pérdida de la estrecha asociación entre CE y PC en los vasos ya que, al igual que sucede en los vasos normales, los PC tiene un papel fundamental en la maduración y homeostasis de los vasos tumorales. Se ha propuesto que la “normalización” de los vasos tumorales con terapias antiangiogénicas supone restaurar la correcta asociación de los PC con el endotelio y mejorar el acceso de otros fármacos al tumor (Goel et al., 2011). Sin embargo, también se ha demostrado que la eliminación de los PC hace más sensibles a las CE a las terapias anti-VEGF, como ocurre con el anticuerpo monoclonal bevacizumab (Lu et al., 2010). De hecho, la inhibición combinada

de VEGF y PDGF produce una rápida regresión del tumor en modelos animales en los que la monoterapia anti-VEGF apenas tiene efecto (Erber et al., 2004).

Por otro lado, la pérdida de PC en la vasculatura tumoral puede tener efectos indeseados como el aumento de las metástasis, como se observó en un modelo de cáncer pancreático en animales deficientes en PDGFB (y por tanto en PC) (Xian et al., 2006). Este efecto también se ha demostrado en el tratamiento con sunitinib (inhibidor de los receptores tirosina-quinasa VEGFR y PDGFR) en modelos de cáncer de mama y melanoma (Ebos et al., 2014). Además, se sabe que la deficiencia en PC aumenta la presión del líquido intersticial (Armulik et al., 2011) que podría promover la metástasis permitiendo el flujo pasivo de células tumorales a través del endotelio fenestrado (Harrell et al., 2018). En pacientes de CCR también se ha demostrado una correlación inversa entre el contenido en PC de los vasos tumorales y el número de metástasis, caracterizados por microvasos inmaduros deficientes en PC α -SMA positivos (Yonenaga et al., 2005). En otro trabajo, esta vez en pacientes con cáncer de mama invasivo, se demostró que un número reducido de PC 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).

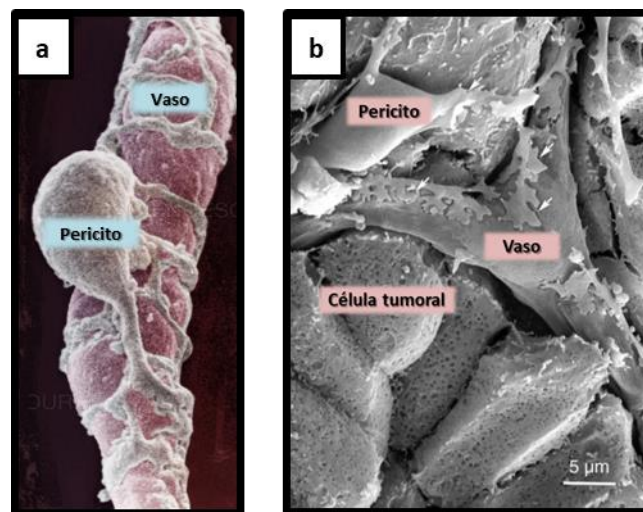


Figura 4. Imágenes de pericitos obtenidas con un microscopio electrónico de barrido. a) Pericito rodeando un endotelio normal (imagen modificada de Don W. Fawcett; <https://www.sciencesource.com>). b) Pericito localizado en la vasculatura tumoral de forma irregular (modificado de (Baluk et al., 2005)).

3.3 Modulación de la respuesta inmune en pericitos

Los linfocitos T infiltrantes se encuentran prácticamente en todos los tumores sólidos, pero con frecuencia no son capaces de orquestar una respuesta antitumoral eficaz. Esto es debido en parte a la expresión de moléculas inmunomoduladoras, solubles o de membrana, por parte del tumor y su entorno, el MT.

Los CAF, estudiados también en este aspecto, tienen un importante papel en la creación de un entorno inmunosupresivo en el MT. Se ha demostrado su papel en la modulación de células T infiltrantes en un modelo de CCR, vía IL-6 (Kato et al., 2018) y en cáncer de mama a través de CXCL12 (factor 1 derivado de células estromales, SDF-1) (Costa et al., 2018). Es más, los CAF son capaces de eliminar directamente células CD8⁺ infiltrantes vía PD-L2 y FASL (Lakins et al., 2018). También favorecen la polarización de los macrófagos de fenotipo M1 (proinflamatorio con actividad antitumoral) a M2 (inmunosupresor responsable de la progresión tumoral) (Chen et al., 2018).

Es indudable que las capacidades inmunomoduladoras de los PC, descritas en el apartado **2.2 y 2.3**, pueden tener un impacto en la respuesta inmune frente al tumor. Se ha observado que los PC en cultivo con medio condicionado procedente de células tumorales, elevan la expresión de PD-L1 e influyen negativamente en la activación y proliferación de células T CD4⁺ *in vitro*, promoviendo la anergia en células específicas de OVA en cultivo (Bose et al., 2013). Dicha capacidad inmunorreguladora dependía de la inducción de RGS5 y era mediada por IL-6. En otro trabajo, esta vez en glioma maligno humano, los PC fueron igualmente capaces de suprimir las respuestas de las células T alogénicas o activadas por mitógenos *in vitro* a través de la producción de PGE2, TGF- β y NO. Es más, la presencia de PC se correlacionaba de forma positiva con el grado de malignidad y de forma negativa con la presencia de leucocitos asociados a vasos sanguíneos y células T CD8⁺ (Ochs et al., 2013).

En línea con estos hallazgos, estrategias dirigidas frente a PC han mostrado efectos antitumorales *in vivo* debidos a la modulación de la respuesta inmune. Un estudio con el modelo de carcinoma pancreático RIP1-Tag5 mostró que la eliminación del gen RGS5 normaliza la vasculatura y mejora la infiltración de células T CD8⁺ después de su transferencia adoptiva, lo que resultó en una mejor supervivencia de los ratones portadores de tumores (Hamzah et al., 2008).

También se han desarrollado estrategias de vacunación dirigidas frente a PC. En un modelo de carcinoma de mama se demostró que la inmunización con una vacuna anti-NG2, basada en *Listeria monocytogenes*, promueve la infiltración de células T CD8⁺ y la regresión tumoral (Maciag et al., 2008). Igualmente, la vacunación con péptidos derivados de PDGFR- β y RGS5 también fue eficaz en la prevención del CCR (Zhao et al., 2012) y en la regresión de tumores establecidos.

Pero no hay que olvidar que el papel de los PC es complejo y que las terapias dirigidas frente a ellos deben ser cuidadosamente evaluadas. En un modelo murino deficiente en PC, la hipoxia derivada de la vasculatura deficiente promovió el aumento de expresión de IL-6 en las células cancerosas y el reclutamiento de MDSC (del inglés, *Myeloid Suppressor Cell*). La acumulación de MDSC tuvo como consecuencia un incremento del crecimiento tumoral mientras

que, al restaurar la cobertura de PC en los vasos tumorales, se anuló el tráfico de MDSC (Hong et al., 2015). Por otro lado, también se ha demostrado que los PC estimulados con PDGF-B producían IL-33, que a través del reclutamiento de TAM, promovía las metástasis en varios modelos de tumores (Yang et al., 2016).

Las relaciones establecidas entre el PC y el sistema inmune señaladas anteriormente se reflejan en el esquema representado a continuación (**Figura 5**).

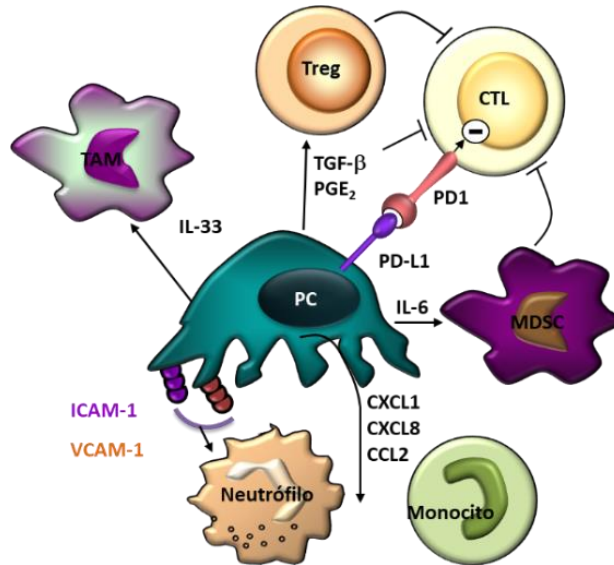


Figura 5. Pericitocito y sistema inmune. El esquema muestra comunicaciones que tienen lugar entre el PC (pericitocito) y diferentes células del sistema inmune. Linfocito T regulador (Treg); linfocito T citotóxico (CTL); célula mielóide supresora (MDSC); macrófago asociado a tumor (TAM).

3.4 Regulación “angiocrina” del crecimiento tumoral

Las CE que componen los vasos tumorales pueden influir directamente en la biología tumoral, que modulan de forma paracrina (“angiocrina”) independientemente de su papel vascular (Butler et al., 2010), favoreciendo el crecimiento del tumor, y no sólo estableciendo conductos pasivos y permisivos para suministrar O₂, nutrientes y liberar los tratamientos utilizados frente a los tumores como la quimioterapia. Esta idea surge al observar que ciertos tratamientos antiangiogénicos provocaban un incremento de la capacidad invasiva tumoral y metástasis (Ebos et al., 2014). Los factores angiocrinos comprenden factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, entre otros, que pueden participar en la reparación del tejido tumoral tras el tratamiento con terapias antiangiogénicas y quimioterapia (Butler et al., 2010). Así mismo, este nicho vascular que conforman las CE y los factores que expresan, generaría un microambiente favorable para la supervivencia de las CSC (del inglés, *Cancer Stem Cell*) que potenciaría la progresión tumoral, invasividad y metástasis (Butler et al., 2010).

Dada la localización de los PC respecto de las CE, los primeros pueden considerarse elementos clave de este nicho perivascular donde se conforma un microambiente en el que la liberación de factores angiocrinos favorece la protección y expansión de las CSC (Butler et al., 2010).

3.4.1 Crecimiento tumoral y metástasis

Franses et al., demostraron que el medio condicionado de las CE modula de forma significativa la capacidad proliferativa y metastásica de células de cáncer de mama y de pulmón tanto *in vitro* como *in vivo*. Es más, la modificación del secretoma de las CE tenía un profundo impacto sobre el crecimiento tumoral (Franses et al., 2011). En este trabajo, las CE quiescentes provocaban una disminución de la proliferación e invasión de las células tumorales de cáncer de mama y pulmón. Sin embargo, tras la inhibición de la expresión de perlecan (proteoglicano heparán sulfato) en las CE, este efecto se revertía debido al incremento de secreción de IL-6, citoquina con propiedades protumorales.

Por el contrario, otros estudios demuestran como la regulación angiocrina de las CE en el tumor es protumorigénica. Así, el receptor tirosín kinasa endotelial EphA2 reprime la expresión de Slit2 para facilitar el crecimiento y la motilidad de las células tumorales (Brantley-Sieders et al., 2011). La secreción de Jagged1 (ligando del receptor Notch) endotelial podría a su vez activar la vía Notch3/Hey1 en células tumorales, promoviendo la proliferación, supervivencia y transición epitelio-mesenquimal (Pedrosa et al., 2015).

Recientemente, un estudio ha revelado como la transición pericito-fibroblasto contribuye a la invasión tumoral y la metástasis *in vivo* e *in vitro* en varios modelos de cáncer como fibrosarcoma y carcinoma de pulmón. Los PC se disocian del vaso en función del gradiente de PDGF-BB derivado de las células tumorales y estimula su adquisición de marcadores propios de fibroblastos y miofibroblastos (Hosaka et al., 2016).

Un concepto interesante relativamente nuevo es el de nicho premetastásico. Los tumores primarios producirían un microambiente específico en órganos distales que ayudaría a la implantación de las células tumorales diseminadas, instruyendo a las células locales para favorecer la colonización del nuevo órgano (Paiva et al., 2018). Los primeros estudios sobre el nicho premetastásico indicaban que moléculas derivadas del tumor inducen el reclutamiento de células derivadas de la médula a órganos secundarios, donde tendría lugar más tarde la metastatización (Kaplan et al., 2005).

En un trabajo reciente, *Murgai et al.* han descrito la participación de los PC en el nicho premetastásico pulmonar. En respuesta a factores derivados del tumor primario, los PC sobreexpresan el factor de transcripción KLF4 y migran a través de la vasculatura pulmonar. Posteriormente, se expanden en el parénquima premetastásico del pulmón y se convierten en

células productoras de matriz que crean un ambiente adecuado para la colonización de células tumorales. Cuando la expresión de KLF4 es eliminada específicamente en los PC, se inhibe su expansión y disminuye la formación de metástasis, pero sin afectar al crecimiento del tumor inicial (Murgai et al., 2017).

3.4.2 *Cancer stem cell* y quimiorresistencia

Se ha propuesto la existencia de una subpoblación minoritaria dentro de los tumores, las CSC o CIC (del inglés, *Cancer Initiating Cell*). Las CSC tendrían las propiedades de autorrenovación y diferenciación asimétrica, así como capacidad iniciadora de tumor y quimiorresistencia.

El espacio perivascular se ha definido como un nicho que protege a las células tumorales durante la quimioterapia, basado en la observación de células reiniciadoras del tumor dispuestas a lo largo de los vasos tumorales (Calabrese et al., 2007). Este nicho vascular se propuso como un microambiente en el que la liberación de factores angiocrinos permitía la expansión de células madre tanto normales como malignas (Butler et al., 2010). Las CE pueden promover en este nicho un fenotipo *CSC-like* de las células de CCR a través de la forma soluble de Jagged1, aumentando la resistencia del tumor a la quimioterapia (Lu et al., 2013). En un modelo experimental de cáncer de cabeza y cuello se observó también que la gran mayoría de las CSC estaban localizadas en estrecha proximidad de los vasos tumorales (Krishnamurthy et al., 2010), y que la IL-6 producida por las CE determinaba su potencial tumorigénico (Krishnamurthy et al., 2014). En otro trabajo, éste más reciente, el medio condicionado de CE de mucosa de colon normal incrementó el número de CSC en diferentes líneas celulares de CCR. Este incremento se observó a través un aumento en la capacidad de formación de esferas, así como un aumento de los niveles de las proteínas NANOG y OCT4 y de la resistencia a 5-FU a través de la activación de AKT (R. Wang et al., 2017). A su vez, la quimioterapia activa a las CE, suprimiendo IGFBP7 y estimulando IGF1, lo que facilita la progresión tumoral (Cao et al., 2017).

Recientemente se ha propuesto que la transición epitelio-mesenquimal que sufren algunas células tumorales sería en realidad una transición epitelio-pericito, adquiriendo la expresión de PDGFR- β y N-cadherina y siendo reclutadas a la vasculatura por PDGF. Estas células estabilizan la vasculatura del tumor, permitiendo así que las células cancerosas reciban y respondan a los factores angiocrinos producidos por el nicho vascular y desarrollen resistencia a terapias antiangiogénicas, quimioterapia o terapias dirigidas (Lu and Shenoy, 2017).

3.4.3 Papel del TGF- β estromal

La familia TGF- β está formada por TGF- β 1, 2 y 3, tres isoformas con alta homología entre sí cuya señalización se inicia mediante la unión de TGF- β a los receptores de tipo I (T β RI) y tipo

II (T β RII) en la membrana celular. La unión del ligando lleva a la formación del heterocomplejo receptor, en el que T β RII fosforila a T β RI y lo activa. El T β RI activado recluta y fosforila a su vez a las proteínas R-Smad, Smad2/3, que luego forma un complejo con el Co-Smad, Smad4. Este complejo se transloca al núcleo para regular la transcripción de genes en cooperación con otros coactivadores, correpresores o factores de transcripción (David and Massagué, 2018; Heldin and Moustakas, 2016). El TGF- β es una molécula pleiotrópica, con funciones contradictorias en cuanto a la progresión tumoral se refiere (Massagué, 2012).

En etapas tumorales tempranas se ha observado que la vía de TGF- β promueve la detención del ciclo celular y la apoptosis (Drabsch and ten Dijke, 2012; Jakowlew, 2006). Por el contrario, en etapas avanzadas promueve la transición epitelio-mesenquimal, invasión, progresión tumoral y metástasis (Drabsch and ten Dijke, 2012; Jakowlew, 2006).

Otro de los papeles importantes del TGF- β es ayudar a eludir el control inmune en el tumor creando un microambiente inmunosupresor (Mariathasan et al., 2018; Tauriello et al., 2018; Thomas and Massagué, 2005). En un modelo de CCR, la inhibición del eje PD-1/PD-L1 que tenía un efecto muy limitado, desencadenaba una fuerte respuesta de células T citotóxicas antitumorales si se inhibía simultáneamente el TGF- β estromal (Mariathasan et al., 2018; Tauriello et al., 2018).

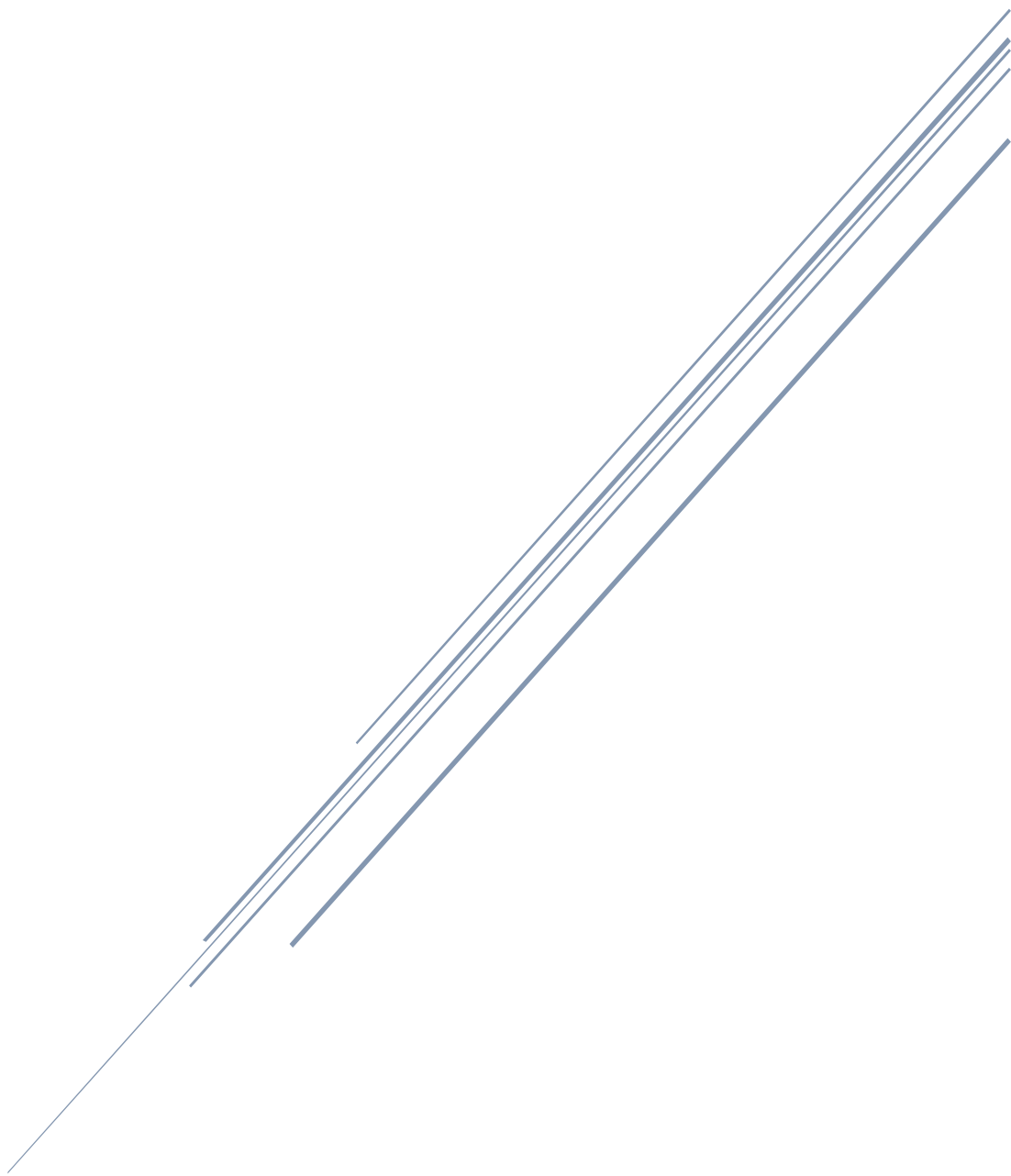
Gran parte de los tumores tienen la vía de señalización de TGF- β truncada para evadir principalmente las propiedades supresoras de éste. Este es el caso de la mayoría de los CCR, que presentan mutaciones que inactivan la vía de señalización autocrina (Jung et al., 2017). Se ha demostrado que el silenciamiento de TGF- β 1 mediante el uso de siARN (del inglés, *small interfering RNA*) en células de cáncer de mama disminuye las metástasis de pulmón (Moore et al., 2008). Cuando las células tumorales son coimplantadas junto a CAF, la progresión tumoral se ve mejorada. Esta mejora ocurre incluso cuando esas células tumorales están previamente silenciadas para TGF- β 1, ya que la coimplantación con CAF revierte de manera significativa el crecimiento del tumor que se había visto disminuido al silenciar TGF- β 1 en las células tumorales (Moore-Smith et al., 2017). Esta última observación sugiere una posible señalización en las células tumorales en respuesta al TGF- β proveniente del MT. Se ha llegado a observar que la activación de la vía de TGF- β ejerce la mayor parte de sus efectos protumorales al mediar en las interacciones tumor-estroma y remodelar el MT (Neuzillet et al., 2014).

En un trabajo pionero se observó que diferentes células del estroma tumoral en CCR responden a TGF- β , poniendo en marcha un programa prometastático mediado por IL-11 que implica a las CSC (Calon et al., 2012). Los autores identificaron una firma molecular de respuesta a TGF- β en fibroblastos, CE, macrófagos y linfocitos T aislados de muestras de CCR que se asociaba con el riesgo de recidiva. En otro modelo de CCR, *Hawinkels et al.*, comprobaron que la incubación de CAF con medio condicionado de células tumorales hiperactivaba la vía de

señalización de TGF- β y producía la transdiferenciación de los fibroblastos a CAF α -SMA⁺, que a su vez producían más TGF- β , generando así un bucle de retroalimentación positiva que favorecía la progresión tumoral (Hawinkels et al., 2014).

El efecto funcional del TGF- β producido por el PC en el MT no había sido explorado hasta que recientemente se ha documentado en carcinoma papilar de tiroides que los PC generan resistencia a la terapia dirigida con vemurafenib (inhibidor del oncogén BRAF^{V600E}) y sorafenib (inhibidor tirosina quinasa) a través de la secreción de TSP-1 y TGF- β , que inducen el incremento de los niveles de pERK1/2, pAKT y pSMAD3 y la supervivencia de las células tumorales (Prete et al., 2018).

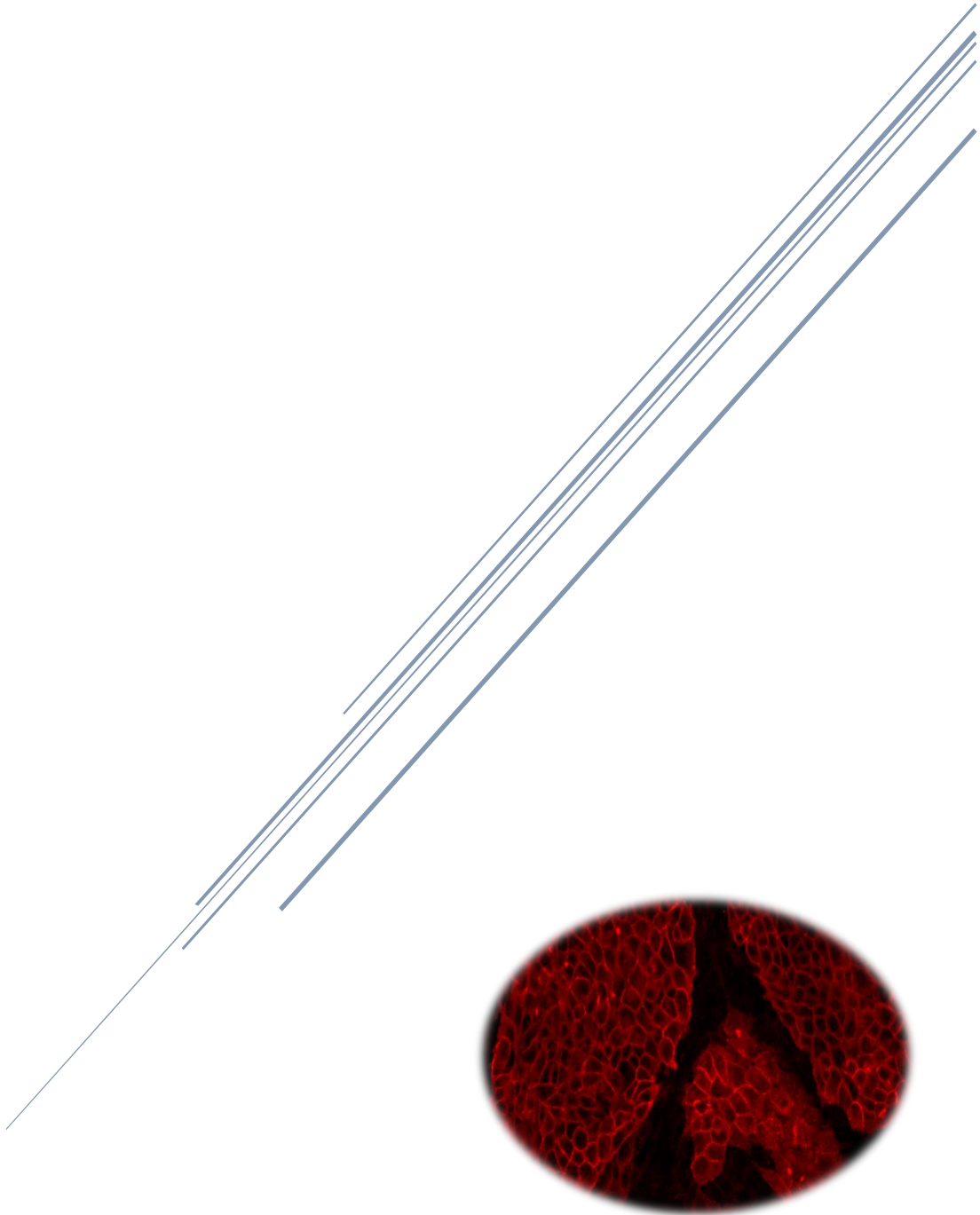
OBJETIVOS



Los objetivos generales de este trabajo son, profundizar en el papel del pericito como célula no profesional del sistema inmune innato y explorar su contribución como componente del microambiente tumoral. Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- I. Análisis de la expresión de receptores de reconocimiento de patrones en pericitos humanos primarios y de su funcionalidad mediante el análisis de la respuesta a agonistas.
- II. Discriminación de las vías de señalización de los receptores identificados.
- III. Establecimiento de cocultivos entre pericitos y líneas celulares humanas de cáncer colorrectal (CCR) como modelo de interacción entre el tumor y el estroma tumoral.
- IV. Estudio de la modulación de las propiedades tumorigénicas y capacidades *stem* de las células de CCR por parte de los pericitos.
- V. Establecimiento de un modelo animal para evaluar el efecto de los pericitos sobre la progresión tumoral *in vivo*.
- VI. Análisis del transcriptoma de pericitos tras el cocultivo con células de CCR para identificar genes diferencialmente expresados con un posible papel en la interacción con las células tumorales. Validación a nivel de proteína de su efecto funcional.
- VII. Estudio de la correlación entre la expresión de genes seleccionados y la respuesta al tratamiento en pacientes de CCR. Valoración como biomarcadores predictivos de respuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. LÍNEAS CELULARES Y CÉLULAS PRIMARIAS

En la tabla I se representan las líneas celulares, modificadas genéticamente en el laboratorio o no, y las células primarias utilizadas para la realización de este trabajo, así como su medio de cultivo óptimo.

Tabla I. Líneas celulares, líneas celulares modificadas y células primarias.

Línea celular	Origen	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo
<i>HCT 116</i>	ATCC (CCL-247)	Carcinoma colorrectal	Humano	DMEMc
<i>HT-29</i>	ATCC (HTB-29)	Carcinoma colorrectal	Humano	DMEMc
<i>Jurkat (clon E6-1)</i>	ATCC (TIB-152)	Leucemia T	Humano	RPMIc
<i>HL-60</i>	ATCC (CCL-240)	Leucemia promielocítica aguda	Humano	RPMIc
<i>293T</i>	ATCC (CRL-11268)	Fibroblasto de riñón embrionario	Humano	DMEMc
<i>Hela</i>	ATCC (CCL-2)	Carcinoma de cérvix	Humano	DMEMc
Línea celular modificada	Modificación	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo
<i>HCT 116^{Luc}</i>	Vector pRRL_Luc_IRES_EGFP	Carcinoma colorrectal	Humano	DMEMc
Célula primaria	Origen	Tipo celular	Especie	Medio de cultivo
<i>Pericitos</i>	ScienCell (#1200)	Pericitos de vasculatura de cerebro	Humano	PMc

ATCC: American Type Culture Collection. **DMEMc:** 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 µg/ml de sulfato de estreptomina (P/S). **RPMIc:** RPMI completo, medio RPMI (Lonza), suplementado con 10% (vol/vol) de FCS, 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomina. **PMc:** medio PM suplementado con un 2% (vol/vol) de FCS, factores de crecimiento específicos (ScienCell). **EGFP,** del inglés Enhanced Green Fluorescence Protein; **IRES,** del inglés Internal Ribosome Entry Site; **Luc,** luciferasa.

2. ANTICUERPOS

Los anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo se representan en la tabla II y los anticuerpos policlonales en la tabla III.

Tabla II. Anticuerpos monoclonales.

Antígeno	Clon	Isotipo	Conjugación	Proveedor	Procedimiento
α -SMA	1A4	IgG _{2A} ratón	-	DAKO	IHQ
α -SMA	1A4	IgG _{2A} ratón	-	R&D Systems	WB
α -Tubulina	DM1A	IgG ₁ ratón	-	Cell signaling	WB
β -Tubulina	AA2	IgG ₁ ratón	-	Sigma	WB
β -actina	8226	IgG ₁ ratón	-	Abcam	WB
EpCAM	Ber-EP4	IgG ₁ ratón	-	DAKO	IF
Fosfo-AKT	D9E	IgG conejo	-	Cell Signaling	WB
Fosfo-p44/42 MAPK	D13.14.4E	IgG conejo	-	Cell Signaling	WB
Fosfo-Stat3	D3A7	IgG conejo	-	Cell signaling	WB
Ki67	MIB-1	IgG ₁ ratón	-	DAKO	IHQ
N-Cadherina	D-4	IgG ₁ ratón	-	Santa Cruz Biotechnology	WB
PDGFR- β	PR7212	IgG ₁ ratón	PE	R&D Systems	CF
TGF- β 1,2,3	1D11	IgG ₁ ratón	-	R&D Systems	Neutralización

Tabla III. Anticuerpos policlonales.

Antígeno	Especie	Conjugación	Proveedor	Procedimiento
β -actina	Conejo	-	Abcam (ab8227)	WB
Fosfo-SMAD3	Conejo	-	Rockland Immunoc (600-401-919S)	IF/WB
IGF-BP3	Cabra	-	R&D Systems (AF675)	Ensayos funcionales
IgG conejo	Burro	IRDye800	Rockland Immunoc. (611-732-127)	WB
IgG conejo	Burro	IRDye700	Rockland Immunoc. (611-730-127)	WB
IgG conejo/ratón	Cabra	Alexa fluor 488	Invitrogen (A11008/A11029)	IF
IgG conejo/ratón	Cabra	Alexa fluor 546	Invitrogen (a11010)/A11030)	IF
IgG ratón (Fab') ₂	Burro	PE	Abcam (ab7007)	CF
NOD1	Conejo	-	Biorbyt (orb29777)	CF/IF/WB
PDGFR- β	Conejo	-	Abcam (ab10848)	IF

CF: citometría de flujo, **WB:** transferencia western, **IF:** inmunofluorescencia, **IHQ:** inmunohistoquímica

3. CONDICIONES Y MEDIOS ESPECIALES DE CULTIVO

Las células se cultivaron a 37 °C, 95% humedad y 5% CO₂. De forma rutinaria se analizó por PCR el medio de cultivo para descartar contaminación por *Mycoplasma* utilizando el sistema *Mycoplasma Gel Detection Kit* (Biotools). Los PC primarios se utilizaron entre pases 3-5. Estas células son positivas para α -SMA y expresan los marcadores de superficie NG2, PDGFR β , CD13, CD73 y CD105 (Díaz-Flores et al., 2009b; Guijarro-Muñoz et al., 2014, 2012), pero son negativas para CD31, CD34 y CD45 (Guijarro-Muñoz et al., 2014, 2012).

3.1. Medio de formación de esferas

Para realizar los ensayos de formación de esferas se utilizó un medio especial libre de suero compuesto por DMEM/F12, suplementado con B27 1x, EGF 20 ng/ml y FGF 20 ng/ml. Según los requerimientos de cada ensayo, a este medio se le añadieron los estímulos correspondientes que serán indicados en cada caso concreto.

3.2. Medios condicionados

a) Medios condicionados para ensayos funcionales

Para la generación de medios condicionados, las células HCT 116 y PC, 1*10⁶ células de cada tipo, fueron cultivadas en flask de 75 (Corning) y se mantuvieron en su medio de cultivo (**Tabla I**) hasta alcanzar el 60% de confluencia, se lavaron con PBS y se les añadió medio fresco (DMEM 1% FCS) durante otras 72h. Finalmente, el medio fue recogido, centrifugado durante 5 minutos a 2000 rpm y filtrado (filtro de PVDF de 0.22 μ m). Antes de congelar a -20°C, los medios se suplementaron con un 1% de FCS para compensar el desgaste del medio tras el cultivo.

b) Medios condicionados para el estudio del secretoma con *arrays* de anticuerpos

Las células (5*10⁵ de PC) fueron cultivadas en una placas Petri (Corning) de 60 mm, durante 24 horas en su medio de cultivo óptimo (**Tabla I**). A las 24 horas, el medio se retiró, las células se lavaron con PBS y se añadió medio fresco (DMEM 1% FCS), solo o con 10 ng/ml de TGF- β 1 (recombinante humano, Peprotech) durante 48 horas más.

Tras 48 horas, todos los medios condicionados fueron recogidos, centrifugados durante 5 minutos a 2000 rpm y filtrados (0.22 μ m) para utilizar directamente en los estudios posteriores.

c) Medios condicionados para cuantificación de TGF- β 1 en inmunosensor

Las células fueron cultivadas en sistema de insertos *transwell* (Corning), con poros de 0.4 μ m, que permiten el intercambio de factores solubles, pero no de células. La relación entre superficies de cultivo y número de células fue mantenida según el tipo de placa y de *transwell*

utilizado. En este caso, las células HCT 116 se sembraron en placas de cultivo (Biofilm) de 6 pocillos para realizar cocultivos y monocultivos. Los PC fueron cultivados en la cámara superior del *transwell* (50×10^3 células/pocillo) y en la parte inferior, correspondiente al pocillo de la placa, se añadieron las células HCT 116 (1.5×10^5 células/pocillo), cada tipo celular en su medio de cultivo (**Tabla I**). A las 24 horas, se retiró el medio y se añadió medio fresco (DMEM 1% FCS) durante 72 horas más. Los medios condicionados se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm y se filtraron ($0.22 \mu\text{m}$) antes de ser congelados a -20°C .

4. CONSTRUCCIONES GÉNICAS

4.1. Generación de vectores plasmídicos

Para propagar los vectores se transformaron bacterias *E. coli* Stbl3 (Life Technologies), que se cultivaron a 37°C en medio líquido 2xYT suplementado con $50 \mu\text{g/ml}$ de ampicilina (ambos de Life Technologies). Todas las técnicas generales de ADN recombinante se llevaron a cabo según métodos estándar (Sambrook and Russell, 2006). El ADN plasmídico se purificó empleando el kit de aislamiento *Qiagen Midi-Prep kit* (Qiagen). Las construcciones génicas se revisaron mediante digestiones con enzimas de restricción (New England Biolabs).

Tabla IV. Vectores plasmídicos para la generación de lentivirus.

Vector	Vector de origen	Inserto	Características	Proveedor [Referencia]
pMD.G	-	Proteína G del VSV	Promotor CMV	D. Trono ¹
pMDLg/pRRE	-	gag y pol VIH-1	Promotor CMV Elemento RRE	D. Trono ¹
pRSVrev	-	Rev VIH-1	Promotor CMV	D. Trono ¹
pRRL_Luc_IRES_EGFP	pRRL-IRES-EGFP	Luciferasa/ <i>p.piralis</i>	Señal de Ψ empaquetamiento Elemento RRE	L. Álvarez Vallina ²

EGFP, del inglés *Enhanced Green Fluorescence Protein*; *IRES*, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*; *Luc*, del inglés *Luciferase*; *VSV-G*, proteína G de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular.

¹, (Naldini et al., 1996)

², (Sanz et al., 2008)

4.2. Generación y titulación de sobrenadantes lentivirales

Para la generación de sobrenadantes lentivirales se utilizaron células 293T como células empaquetadoras, y un sistema de vectores de tercera generación derivados del VIH-1, sin capacidad de generar virus replicativos. Este sistema está compuesto por cuatro vectores: dos vectores empaquetadores pMDLg/RRE y pRSVrev para la expresión de los genes *gag*, *pol* y *rev*;

el vector pMD.G para la expresión de la proteína G de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G); y un vector de transferencia génica, pRRL_Luc_IRES_EGFP (**Tabla IV**), para la expresión de los genes reporteros F-Luc (luciferasa de *P. Piralis*) y EGFP (del inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*).

Para la obtención de los sobrenadantes lentivirales se transfectaron células 293T en placas Petri de 100 mm (5×10^6 células/placa) mediante precipitación con fosfato cálcico. Las cantidades de ADN plasmídico necesarias por placa fueron: 14,1 μg del vector de transferencia, 9 μg del vector pMDLg/pRRE, 3,45 μg del vector pRSVrev y 4,71 μg del vector pMD.G. Tras 8 horas de incubación se retiró el medio de cultivo, se realizaron dos lavados con PBS y se añadió medio completo fresco. A las 48 horas se recogió el sobrenadante que contenía las partículas lentivirales, se filtró (0.45 μm) y se concentró aproximadamente 100 veces por ultracentrifugación (24.500 rpm, 4 °C, 2 horas). El *pellet* viral se resuspendió en PBS y se almacenó a -80 °C.

La titulación biológica de partículas infectivas (Unidades transductoras, UT/ml) de la preparación lentiviral (LV^{Luc}) se realizó mediante la transducción de células Hela, en placas de 24 pocillos (2.5×10^5 células/pocillo), con diluciones seriadas de las preparaciones virales. A las 48 horas de la transducción, se determinó mediante CF (citometría de flujo) el porcentaje de células que expresaban la proteína verde fluorescente (EGFP). El título en UT/ml se calculó mediante la siguiente fórmula: (porcentaje de células EGFP positivas/100) x factor de dilución.

La expresión de luciferasa fue comprobada en células Hela transducidas con las partículas virales cultivadas en placas blancas opacas de 96 pocillos (Biofilm) con diluciones seriadas. Después, se añadió la sal de potasio D-Luciferina (Promega), sustrato de F-Luc (20 μg por pocillo) y se cuantificó la señal en el luminómetro para placas Infinite 1200 (Tecan).

4.3. Transducción de líneas celulares humanas con partículas lentivirales

4.3.1. Generación de células que expresan Luciferasa

Para la transducción de la línea celular humana HCT 116 se incubaron 2.5×10^5 células en crecimiento exponencial durante 12 horas, en placas de 24 pocillos, con LV^{Luc} a una MOI de 10 (MOI, del inglés *Multiplicity of Infection*). A continuación, las células HCT 116^{Luc} se lavaron con PBS, se mantuvieron en cultivo durante 48 horas y se analizó el porcentaje de células transducidas positivas para EGFP y la expresión de Luciferasa como se determina en el apartado **4.2**.

4.3.2. Silenciamiento génico

Para silenciar la expresión de NOD1 en PC, las células fueron infectadas con partículas lentivirales que codifican tres construcciones diferentes de *NOD1* ARNsh (*shRNA*, del inglés RNA *short hairpin*) (Santa Cruz) de 19-25 nt. Por otro lado, se usaron vectores lentivirales que

codifican shRNA control, que no dirigen la degradación de ningún ARN específico, junto con el gen reportero EGFP, sirviendo de control positivo de la eficiencia de transducción mediante la expresión de EGFP y control negativo de silenciamiento de *NOD1*.

Los PC (80×10^3 células) fueron cultivados en una placa de 24 pocillos en PMc y a las 24 horas las partículas lentivirales fueron añadidas a una MOI de 7. Las partículas se mantuvieron durante toda la noche y al día siguiente se añadió medio fresco. A las 48 horas en cultivo, se analizó la eficiencia de transducción de las células HCT 116^{EGFP} mediante citometría de flujo (alrededor de un 90% de células positivas) y se inició la selección de las células HCT 116^{NOD1sh} con 250 ng/ml de puromicina (Santa Cruz).

5. CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL

5.1. Aislamiento de ARN total

El ARN total de las células fue aislado con el sistema *RNeasy Micro Kit* (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro *NanoDrop* (ThermoScientific) y la integridad del ARN se analizó usando un *Bioanalyzer 2100B* (Agilent Technologies).

5.2. Síntesis de ADNc por transcripción reversa

El ADNc se sintetizó a partir de 500 ng de ARN total aislado de las células de interés mediante transcripción reversa usando el sistema *NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Nzytech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.3. Microarrays de ADN

Tras la separación de las poblaciones celulares procedentes del cocultivo o monocultivo de células HCT 116 y PC mediante *Cell Sorting* (**apartado 8.3**), y la posterior extracción de ARN (**apartado 5.1**), se procedió al análisis de los perfiles transcripcionales de las células de interés en el Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. El *microarray* de ADN empleado para el análisis fue el *GeneChip Human Gene 2.0 ST* (Affymetrix). Para 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 una ratio/incremento > 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 el número de acceso GSE108988.

5.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para determinar la expresión de los genes de interés utilizando el programa *Primer Express oligo design* (AppliedBioSystems) (**Tabla V**), que fueron sintetizados por Roche Diagnostics. Para amplificar el gen IGF-BP3 se utilizaron oligonucleótidos prediseñados obtenidos de Sigma (**Tabla V**). En todos los casos, estos oligonucleótidos generaban un amplicón de entre 80-120 pb. La reacción de qRT-PCR se realizó utilizando el sistema *Lightcycler DNA Master SYBR Green I kit* (Roche Diagnostics) en un equipo *Lightcycler 480*.

Tabla V. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para qRT-PCR.

Gen	Secuencia oligonucleótido (5'-3')
<i>HES-1</i>	(F) GGAAATGACAGTGAAGCACCT (R) CAGCACACTTGGGTCTGTG
<i>HEY-1</i>	(F) TCTGAGCTGAGAAGGCTGGT (R) AGGTGATCCACGGTCATCTG
<i>HEY-2</i>	(F) GAGAAGACTTGTGCCAACTGCT (R) CCTGTTGCCTGAAGCATCTTC
<i>IGF-BP3</i>	(F) AATCATCATCAAGAAAGGGC (R) GAACTTCAGGTGATTCAGTG
<i>IL6</i>	(F) GTGCCTCTTTGCTGCTTTACA (R) GGTACATCCTCGACGGCATCT
<i>IL8</i>	(F) TCTGGACCCCAAGGAAAAC (R) TTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC
<i>NANOG</i>	(F)CCGACTGTAAAGAATCTTCACC (R)GACAGAAATACCTCAGCCTCC
<i>NOD1</i>	(F)AAGCGAAGAGCTGACCAAATAC (R)TCCCAGTTTAAGATGCGTGAG
<i>NOD2</i>	(F)ATCGAGCTGTACCTGAGGAAG (R)GACACCATCCATGAGAAGACAG
<i>RANKL</i>	(F) ACCAGCATCAAAATCCCAAGTTC (R) ATTTCTCTCCAGACCGTAACTT
<i>SDHA</i>	(F) TGGGAACAAGAGGGCATCTG (R) CCACCACTGCATCAAATTCATG
<i>SMAD-7</i>	(F) ACTGGTGCCTGGTGGCATA (R) AGCCATTCCCCTGAGGTAGAT
<i>SNAI1</i>	(F) CACTATGCCGCGCTCTTTC (R) GGTCGTAGGGCTGCTGGAA
<i>VCAN</i>	(F)GTGTCACTGACTGTGGAT (R)CAAACAAGCCTTCTGAGC
<i>ZEB-2</i>	(F) TTTCTGCCCTCTCTGTAGC (R) GCTCCTGGGTTAGCATTGG

El programa utilizado fue: 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 (SDHA), empleando la fórmula $2^{-\Delta Ct} = (2^{-Ct(\text{gen de interés})} / 2^{-Ct(\text{genes control})})$ y la diferencia entre condiciones se determinó calculando la ratio/incremento entre la expresión relativa del gen en cada una de ellas de acuerdo con la fórmula $2^{-\Delta Ct(\text{Condición 1})} / 2^{-\Delta Ct(\text{Condición 2})}$.

6. ESTUDIOS DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS

6.1. Arrays de anticuerpos inmovilizados en membrana.

El medio condicionado de PC, tratados o no con 10 ng/ml de TGF- β 1 (**apartado 3.2.b**), se analizó con el sistema *Human XL Cytokine Array kit* (R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, esta técnica se basa en un inmunoensayo en membrana que permite una valoración relativa de múltiples citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y otras proteínas solubles en el sobrenadante celular. Los anticuerpos de captura fijados en membranas de nitrocelulosa se unen a las proteínas diana específicas presentes en el sobrenadante (1.5 ml de muestra por membrana), que, tras una incubación durante 12 horas a 4°C en agitación, se detectan con los correspondientes anticuerpos biotinilados y 10 ng/ml de estreptavidina conjugada con IRDye800 (Rockland Immunoc., #S000-45#). La señal fluorescente se detectó con el sistema *Odyssey Infrared Imaging* (Li-COR Biosciences) y se cuantificó usando un software específico *Image Studio Lite* (Li-COR Biosciences) representándose como ratio/incremento respecto al control no tratado.

6.2. ELISA

La secreción de IL-8 por parte de PC fue detectada por ELISA utilizando el *kit Human CXCL8/IL8 DuoSet* (R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.3. Cuantificación de TGF- β 1 mediante inmunosensor amperométrico

Medios condicionados de PC y células HCT 116 en monocultivo y cocultivo (**apartado 3.2.c**) fueron utilizados para cuantificar la concentración de TGF- β 1. La determinación se llevó a cabo en el Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid. Las partículas/bolas magnéticas (MB, del inglés *magnetic beads*) carboxiladas (HOOC) se incubaron con un anticuerpo anti-TGF- β 1 (6 μ g/ml) durante 60 minutos a 25°C en agitación. Tras varios lavados, se bloquearon los grupos reactivos con etanolamina 2 M y se añadieron las muestras de interés o TGF- β 1 a diferentes concentraciones para realizar la curva estándar durante 60 minutos a 25°C en agitación. A continuación, se añadieron 25 μ l de un

segundo anticuerpo anti-TGF- β 1 biotinilado (2mg/ml) durante 60 minutos a 25°C, seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (poly-HRP-Strept) durante otros 15 minutos.

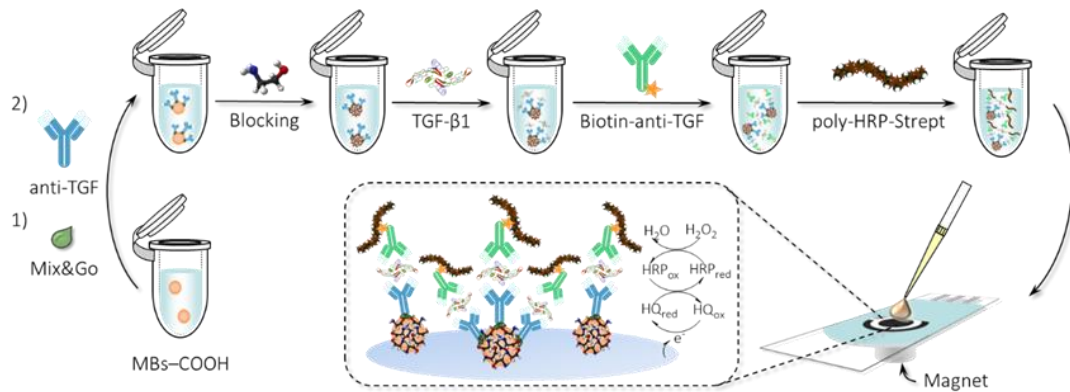


Figura 6. Cuantificación de TGF- β 1 mediante inmunosensor amperométrico. Esquema representativo de cuantificación de TGF- β 1 en muestras de medios condicionados de pericitos y HCT 116 en monocultivo y cocultivo. MB, del inglés magnetic beads.

El conjugado poly-HRP-Strep/Biotin-anti-TGF- β 1/TGF- β 1/anti-TGF- β 1-MBs-COOH, se resuspendió en hidroquinona para depositarlo sobre la superficie de un electrodo serigrafado de carbono. La cuantificación se llevó a cabo a través de medidas amperométricas empleando un potenciostato INBEA registrando la corriente obtenida tras aplicar un potencial constante de -200 mv. Una vez la corriente se estabiliza, se le añade a la muestra la disolución de peróxido de hidrógeno y se mide la corriente durante 200 segundos, tiempo suficiente para que tenga lugar la reacción. Los datos se analizan con el software IbGraph y se representan como concentración en pg/ml de TGF- β 1.

7. TRANSFERENCIA WESTERN

Las muestras celulares se lisaron con un tampón de lisis compuesto por Laemmli- β -mercaptoetanol 5% en hielo y se hirvieron para analizar las proteínas en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente, se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) utilizando geles de gradiente 4-12% o 10-20% (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) según el tamaño de cada proteína. A continuación, las proteínas fueron transferidas por *electroblotting* a una membrana de nitrocelulosa utilizando el *iBlot Western Blotting System* (Invitrogen Thermo Fisher Scientific) y los reactivos del kit *iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose* (Invitrogen Thermo Fisher Scientific). La membrana fue bloqueada con *Odyssey Blocking Buffer* (Li-COR Biosciences) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla II, III**)

durante toda la noche a 4 °C. Como control de carga se utilizaron los anticuerpos anti- β -actina, anti- α -tubulina o anti- β -tubulina (**Tabla II, III**) a una dilución 1/2000. 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 o anti-IgG de conejo conjugados con IRDye800 y/o IRDye700 (**Tabla III**) diluidos en solución de bloqueo *Odyssey Blocking Buffer* 1/5000. 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* y cuantificaron por densitometría con el programa *Image Studio Lite*.

8. CITOMETRÍA DE FLUJO

8.1. Análisis de proteínas intracelulares

Las células se marcaron intracelularmente usando el *kit IntraCell* (Inmunostep) siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, esta técnica incluye la fijación de las células con formaldehído para preservar su morfología. El uso de saponina genera poros de aproximadamente 8nm en la membrana celular permitiendo la difusión del anticuerpo dentro y fuera de la célula. En concreto, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-NOD1 (**Tabla III**) con una dilución 1:40 durante 30 minutos, seguido de un anticuerpo secundario marcado con PE anti-conejo IGg (**Tabla III**) durante 45 minutos. Finalmente, tras los lavados oportunos, el marcaje fue analizado en el citómetro *Epics XL* (Beckman Coulter) utilizando el programa *Expo32* (Beckman Coulter) para realizar las representaciones.

El *kit ALDEFLUOR* (StemCell Technologies), se utilizó para detectar la actividad enzimática del aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), que se ha relacionado con las células madre normales o tumorales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se resuspendieron en el tampón de ensayo ALDEFLUOR que contiene un sustrato de ALDH1 y se incubaron durante 45 min a 37°C. En paralelo se incubó otra muestra en las mismas condiciones en presencia de dietilaminobenzaldehído (DEAB), un inhibidor específico de la actividad enzimática de ALDH1, como control negativo. Las células que expresan ALDH1 convierten el sustrato en un producto fluorescente que se acumula a nivel intracelular. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo analizador *MACSQUANT* (MILTENYI-BIOTEC) en la Unidad de Citometría del IIS Puerta de Hierro-Segovia de Arana del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda y los resultados se editaron con el programa *FLOWJO*.

8.2. Separación de poblaciones celulares

Para la separación de las células HCT 116 y PC, los cocultivos se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se marcaron con el anticuerpo anti-PDGFR β -PE (**Tabla II**). Este marcador es

expresado por los PC, pero no por las células HCT 116, lo que nos permite diferenciar las dos poblaciones celulares.

Para separar dichas poblaciones se utilizó un equipo *FACSAria II* (BD Bioscience) de la Unidad de Citometría del IIS Puerta de Hierro-Segovia de Arana del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda, utilizando en este caso el láser 633nm. Las poblaciones celulares se identificaron como positiva (PC, células que expresan PDGFR β) y negativa (HCT 116, células sin expresión de PDGFR β). La eficiencia de separación fue analizada con el software *FACSDiva* (BD Bioscience).

9. MICROSCOPIA CONFOCAL

La localización de proteínas de interés en diferentes compartimentos celulares fue realizada por inmunofluorescencia. Para ello, las células se sembraron en cámaras de cultivo de 8 pocillos sobre portaobjetos (Nunc) en medio completo y cuando alcanzaron la confluencia adecuada, fueron fijadas con un 4% de paraformaldehído y permeabilizadas con 0.1% Tritón X-100 durante 10 minutos. Posteriormente, las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla II, III**) durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, seguidos de una incubación de una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo marcado con Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 546 a una dilución 1:500 (**Tabla III**). Finalmente, los núcleos fueron marcados con TO-PRO (Invitrogen) y las muestras se montaron con el medio *Vectashield H-1200* (Vector Laboratories). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron en un microscopio confocal *TCS-SP5* (Leica Microsystems CMS GmbH) con los láseres de Argón (488 nm) y Helio-Neón (543 nm) en la Unidad de Microscopía Confocal del IIS Puerta de Hierro-Segovia de Arana del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda. Las imágenes se adquirieron con el programa *LAS AF SP5* (Leica Microsystems).

10. ENSAYOS FUNCIONALES *in vitro*

10.1. Ensayos de proliferación tumoral

Para analizar la modulación de la capacidad proliferativa de líneas celulares de CCR por parte del PC, se realizaron dos tipos de ensayos, cocultivos con contacto y cocultivos sin contacto en insertos *transwell*.

a) Cocultivos con contacto

Se cultivaron HCT 116^{Luc} en placas blancas de fondo opaco de 96 pocillos con fondo plano por triplicado (2×10^3 células/pocillo) en monocultivo o en cocultivo junto a PC en proporción 1:1 en DMEM 1% FCS. Tras 48 horas en cultivo se determinó la capacidad proliferativa de las células

HCT 116^{Luc} añadiendo 20 µg/pocillo de D-Luciferina y se cuantificó la señal en el luminómetro para placas *Infinite 1200 Tecan*.

b) Cocultivos sin contacto

Las células de CCR HCT 116 y HT-29 fueron cultivadas en placas de 24 pocillos por triplicado (30×10^3 células/pocillo) en monocultivo o en cocultivo con PC. Para los cocultivos, 10^4 PC fueron sembrados en la cámara superior de *transwells* y 24 horas después se colocaron encima de los pocillos donde se encontraban las células de CCR. El medio de cultivo fue remplazado por medio fresco DMEM 1% FCS y las células se cultivaron durante otras 96 horas antes de añadir *CellTiter-Glo* (Promega) y añadirlas a placas blancas de 96 pocillos para proceder a su cuantificación. El reactivo *CellTiter-Glo* contiene luciferasa recombinante termoestable y su sustrato, y permite medir la viabilidad de las células a través de la cuantificación indirecta del ATP presente, necesario para la catálisis de la luciferina. La señal bioluminiscente se midió en un luminómetro *Infinite 1200 Tecan* a los 10 minutos de incubación.

10.2. Ensayos de migración celular

Para evaluar la capacidad migratoria de las células HCT 116 y HT-29 en presencia de PC se realizó un ensayo de cierre de “herida” (*WH*, del inglés, *wound healing*) utilizando unos insertos comerciales (Ibidi) que constan de dos cámaras separadas por 500 µm. Los insertos se colocaron en el fondo de una placa de 24 pocillos y se añadieron 50×10^3 células en cada una de las cámaras en DMEMc (**Tabla I**). Por otro lado, se sembraron 10×10^3 PC en la cámara superior de *transwells* en medio PMc (**Tabla I**). A las 24 horas, cuando las células HCT 116 habían alcanzado un 90-100% de confluencia, se retiró el inserto creándose una brecha libre de células de 500 µm de anchura. Se lavó el pocillo con PBS para retirar los restos celulares, se añadió DMEM 1% FCS y se colocó encima de cada pocillo un *transwell* con PC, también con DMEM 1% FCS. Como control negativo se utilizaron pocillos con “herida” en la monocapa de HCT 116 que no contenían PC en el *transwell* o en los que se habían sembrado las mismas células de CCR.

Las células se mantuvieron en cultivo hasta el cierre completo de la “herida” y se monitorizó la migración adquiriendo imágenes a tiempos concretos utilizando un microscopio invertido *Eclipse TS100-F* (Nikon). El área libre de células en cada momento fue cuantificada con el software *HoKaWo* (Hamamatsu) y los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de superficie libre de células respecto al inicio del ensayo.

10.3. Ensayos de invasión

Para analizar la capacidad invasiva de las células de CCR a través de una matriz extracelular en presencia o no de PC, se utilizaron cámaras de invasión (BD Bioscience) que consisten en *transwell* recubiertos con una capa de MatrigelTM y poros de 8 µm que permiten el paso de las

células, colocados en una placa de 24 pocillos. Las células HCT 116 se añadieron en la cámara superior (25×10^3 células/cámara) y se colocaron encima de pocillos en los que se había sembrado 24 horas antes PC o HCT 116 (80×10^3 células/pocillo) en el fondo. Tras un periodo de incubación de 48 horas, las células que no habían migrado se retiraron de la parte superior de los insertos mediante raspado y se extrajeron los filtros en cuya cara inferior habían quedado adheridas las células que habían migrado. Estos filtros se depositaron en placas blancas de 96 pocillos con fondo plano en DMEMc. Se cuantificó la bioluminiscencia en el luminómetro de placas *Infinite F200* tras añadir *CellTiter-Glo* y se calculó la migración relativa de las células HCT 116 en presencia o no de PC.

10.4. Ensayos de formación de colonoesferas

Para analizar la capacidad de formación de colonoesferas de las células HCT 116, 3×10^3 células fueron sembradas en el fondo de placas de 24 pocillos de baja adherencia (Corning) en su medio específico (**apartado 3.1**). Se sembraron 10×10^3 PC en la cámara superior de *transwells* de $0.4 \mu\text{m}$, a las 24 horas se sustituyó el medio por el de formación de esferas y se colocaron los *transwells* en los pocillos donde se encontraban las células HCT 116. Tras 96 horas en cultivo, las células fueron procesadas con *CellTiter-Glo* y la señal luminiscente fue cuantificada como ya se ha descrito anteriormente.

10.5. Ensayos de quimiorresistencia

A las CSC se les atribuye una mayor resistencia a los agentes quimioterápicos estándar, por lo que estarían en el origen de las recidivas tras el tratamiento. En el caso del CCR, los regímenes más utilizados (FOLFOX y FOLFIRI) contienen 5-FU. Para conocer la IC_{50} de las células HCT 116 tratadas con 5-FU, éstas se incubaron durante 72 horas en placas de 96 pocillos (2×10^3 células/pocillo), en presencia de diferentes concentraciones (0-20 μM) de 5-FU.

- Efecto del cocultivo sobre la viabilidad celular en adherencia

Una vez establecida la IC_{50} ($5 \mu\text{M}$), las células HCT 116 se cultivaron en placa de 24 pocillos (30×10^3 HCT 116/pocillo) de forma aislada o en cocultivo con PC, en presencia o no de 5-FU ($5 \mu\text{M}$). Los PC fueron sembrados 24 horas antes en *transwell* (10×10^3 células/transwell) que se colocaron encima de los pocillos que contenían las células HCT 116. En el momento de iniciar el ensayo se sustituyeron los medios por DMEM 1% FCS con o sin 5-FU ($5 \mu\text{M}$). Tras 72 horas en incubación con el agente quimioterápico, se procesó el ensayo con el reactivo *CellTiter-Glo* y se analizó en el luminómetro. Los resultados se representaron como porcentaje de

supervivencia de las células HCT 116 en cocultivo con respecto a las células tratadas con 5-FU en monocultivo.

- Efecto del cocultivo sobre la viabilidad celular en colonoesferas

En algunos ensayos de quimiorresistencia se utilizaron placas de 24 pocillos de baja adherencia para estudiar el efecto del cocultivo con PC en *transwell* sobre la quimiorresistencia a 5-FU de las colonoesferas formadas por células HCT 116. Las células fueron cultivadas como se indica en el apartado **10.4**, y, se añadió 5-FU (5 μ M) a los pocillos correspondientes. Tras 72 horas en incubación con el agente quimioterápico, se procesó el ensayo con el reactivo *CellTiter-Glo* y se analizó en el luminómetro.

11. ENSAYOS *in vivo*

Los protocolos utilizados para la manipulación de animales que a continuación se detallan, han sido aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda y la Comunidad de Madrid (PROEX 066/14).

En este trabajo se utilizaron ratones hembra atímicos desnudos (Hsd: Athymic Nude-Foxn1nu) de cinco semanas de edad (Harlan Ibérica). Para su manipulación, se anestesiaron por vía inhalatoria con isoflurano (Abbott Laboratories) y se mantuvieron en ambiente estéril para la realización de los protocolos de implantación de tumores por vía subcutánea (s.c).

11.1. Ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*

Las células HCT 116 (500 células/ratón), fueron implantadas o coimplantadas junto con a PC (3×10^3 células) en proporción 1:6. Para ello, las células fueron resuspendidas en PBS con un 30% de matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced Phenol Red Free) e inoculadas por vía s.c. en la zona dorsal del animal (n=5 animales/grupo). En el caso de las células coimplantadas, éstas fueron cultivadas previamente en cocultivo en sistema de *transwell* durante 72 horas antes de la inoculación.

En todos los ensayos realizados, los tumores se midieron cada dos días y el volumen tumoral se determinó según la fórmula: ancho² x largo x 0,52 (tomándose la medida más pequeña como ancho). El análisis estadístico de las medidas de crecimiento tumoral entre los diferentes grupos se realizó utilizando la prueba t-Student. El nivel de significación estadística se situó en $p < 0.05$.

11.2. Ensayos de imagen molecular (implantación tumoral)

Para estos ensayos, se utilizaron las células transducidas con el vector lentiviral LV^{Luc} (HCT 116^{Luc}). Las células HCT 116^{Luc} (500 células) se implantaron s.c. en el flanco derecho de

ratones atímicos desnudos de forma aislada o junto con 3×10^3 PC (n=6 animales/grupo). Al cabo de 4 días, se comenzaron a adquirir imágenes de bioluminiscencia (BLI, del inglés *Bioluminescence Imaging*) *in vivo*, que se repitieron los días 8, 12 y 16 postinoculación. Las imágenes de adquirieron utilizando un sistema Hamamatsu dotado de una cámara digital de alta resolución con dispositivos de cargas acopladas (CCD) *ORCA-2BT* (Hamamatsu Photonics). Diez minutos antes de cada sesión, los animales recibieron una inyección intraperitoneal (i.p) de D-Luciferina a una dosis de 125 mg/kg (150-200 μ l/ratón). En un ensayo típico se adquiere primero una imagen de BLI con un tiempo de exposición de 1 minuto y un agrupamiento de píxeles (*binning*) en formato de 8 x 8. A continuación se toma una imagen con luz visible y un tiempo de exposición de 20 milisegundos, en formato de 1x1. Por último, las imágenes se superponen con una escala en pseudocolor que refleja la intensidad de señal. Para la cuantificación de la señal, las regiones de interés fueron acotadas y se determinó la intensidad máxima de luz. Para el análisis y procesamiento de las imágenes se empleó el software Wasabi (Hamamatsu Photonics).

12. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Al final del experimento *in vivo* de crecimiento tumoral, los tumores se extrajeron, se fijaron en formol tamponado y se embebieron en parafina. Posteriormente, se hicieron cortes histológicos de 4 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina para analizar la histología.

La caracterización mediante inmunohistoquímica (IHC) se realizó en la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Puerta de Hierro siguiendo el protocolo habitual. Brevemente, las secciones de 4 μ m de tejido se montaron en portas pretratados FLEX IHC (Dako-Agilent). La IHQ se procesó en un teñidor automatizado Dako-Omnis (DAKO), con el sistema de detección Envision Plus y utilizando los siguientes anticuerpos y condiciones:

- Ki67 (**Tabla II**): usando para el desenmascaramiento Target Retrieval Low pH en tampón citrato pH 6.1.

- α SMA (**Tabla II**): usando para el desenmascaramiento con Target Retrieval, High pH TRIS/EDTA pH 9.

La cuantificación de la expresión de Ki67 y α SMA se llevó a cabo por dos observadores independientes mediante el conteo de células positivas a través de un microscopio óptico. El porcentaje de células positivas se determinó por cada 1000 células, contadas en 4 campos al azar en cinco secciones de tejido de cada grupo.

13. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE MICROARRAYS DE ADN

Para la anotación funcional de los genes sobreexpresados significativamente en la firma molecular de PC se usó el modelo de ontología génica (*GO*, del inglés, *Gene Ontology*)

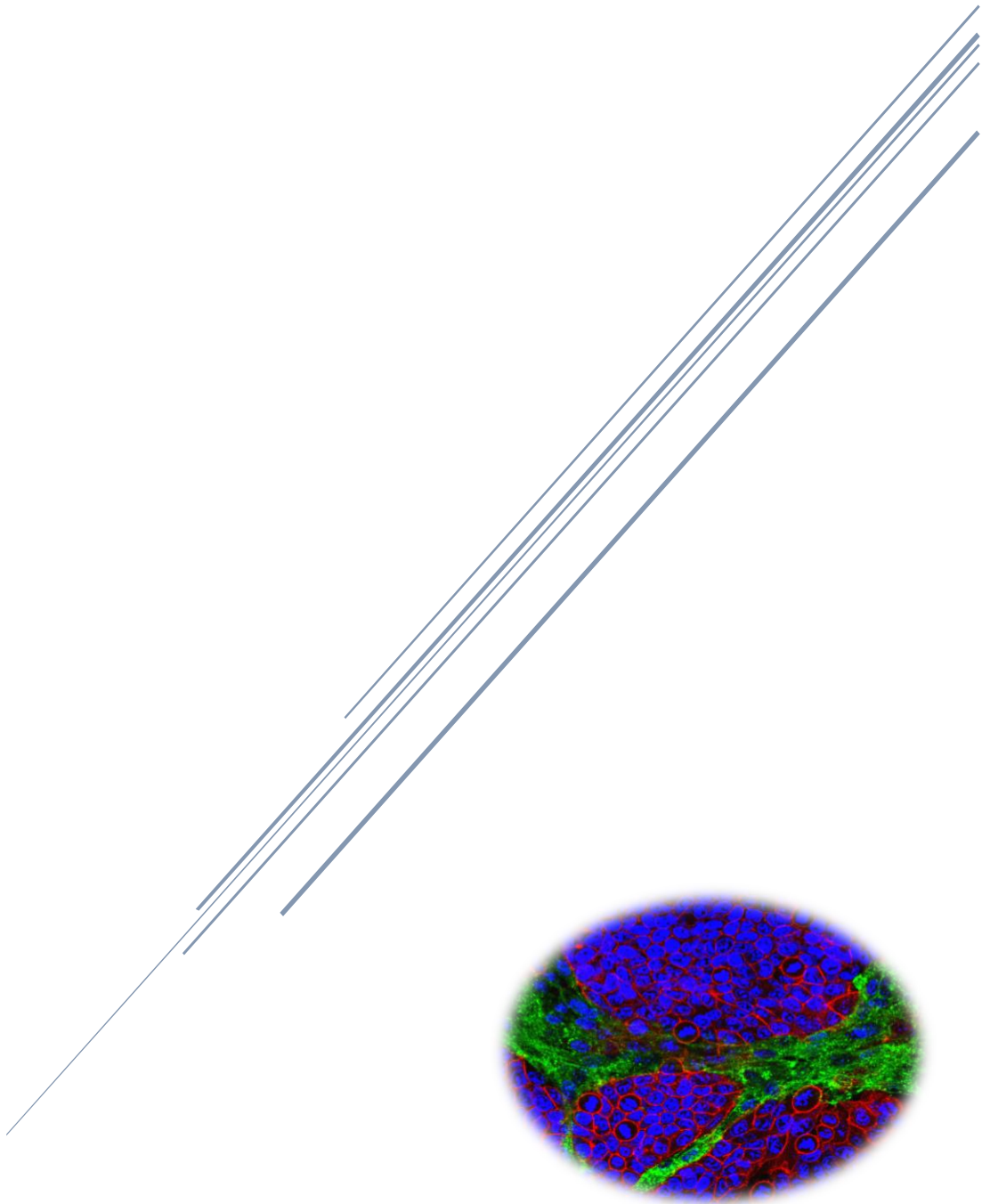
(Ashburner et al., 2000) organizado en tres categorías: proceso biológico, función molecular y compartimento celular. La asignación de términos GO se realizó mediante la herramienta DAVID 6.7 (Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery, (Huang et al., 2009)) así como el análisis de enriquecimiento funcional de términos GO sobrerrepresentados. 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.

El programa IPA (Ingenuity Pathways Analysis, Qiagen) se usó para confirmar los datos de GO y para generar un gráfico con las vías de señalización en las que estaban implicados los genes sobreexpresados. El valor predictivo de la firma molecular del PC “tumoral” se estudió en la Unidad de Bioinformática del CNIO en 226 pacientes de CCR sometidos a cirugía de la cohorte GSE14333 (Jorissen et al., 2009) de los que se dispone información pública sobre el perfil transcripcional del tumor y la evolución clínica. El método Kaplan-Meier se utilizó para determinar la supervivencia libre de recidiva en los pacientes estratificados en cuartiles de expresión de la firma molecular.

14. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

La media y la desviación estándar se calcularon mediante el programa Prism VII (Graphpad Software). Para calcular la significación estadística se utilizó el test paramétrico t de Student, considerándose un valor de $p < 0.05$ estadísticamente significativo. Todos los experimentos *in vitro* fueron realizados al menos como triplicados independientes. Las curvas de supervivencia generadas con el método Kaplan-Meier se compararon con el estadístico log-rank (Mantel-Cox).

RESULTADOS



1. PAPEL DEL PERICITO EN LA INMUNIDAD INNATA

1.1. Expresión de receptores de la familia NOD en pericitos

Recientemente, se ha caracterizado en este laboratorio la expresión del receptor TLR4 y su cascada de señalización en PC primarios humanos, así como su perfil transcripcional tras la estimulación con LPS, ligando de TLR4, que se encuentra en la pared de las bacterias Gramnegativas (Guijarro-Muñoz et al., 2014). Pero estas bacterias contienen otros PAMP, como los PGN, detectados por receptores NOD, cuya expresión en PC no se había descrito previamente. Para completar la caracterización del repertorio de PRR en PC, se decidió estudiar la expresión de NOD1 y NOD2 en este tipo celular y su respuesta a los ligandos correspondientes.

1.1.1. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

En primer lugar, se analizó la expresión génica de *NOD1* y *NOD2* por qRT-PCR. *NOD1* es claramente detectable, pero *NOD2* se expresa a niveles muy bajos comparativamente (**Fig. 7**). Como control positivo de expresión de *NOD2* se utilizaron células HL60 (**Fig. 7**). Se ha descrito que *NOD1* y *NOD2* pueden ser inducidos en diferentes tipos celulares como células epiteliales intestinales y queratinocitos por $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ (Harder and Núñez, 2009). Tras la estimulación durante 20 horas de PC con $TNF\alpha$ (50 ng/ml), *NOD1* incrementó su expresión significativamente ($p < 0.01$), siendo este aumento más evidente en los PC tratados con $IFN\gamma$ (100 ng/ml) ($p < 0.001$) (**Fig. 7**). En cuanto a *NOD2*, sólo se observó un leve incremento de la expresión en presencia de $IFN\gamma$ (**Fig. 7**).

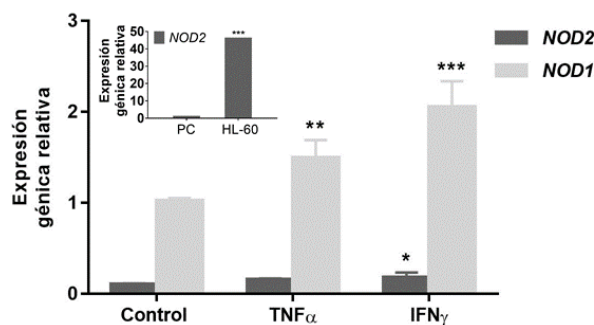


Figura 7. Expresión de NOD1 y NOD2 en pericitos. Los pericitos fueron estimulados con $TNF\alpha$ (50 ng/ml) o $IFN\gamma$ (100 ng/ml) durante 20 horas y se analizó la expresión de *NOD1* y *NOD2* mediante qRT-PCR. Los resultados representan tres ensayos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Las células HL60 se usaron como control positivo de expresión de *NOD2*.

1.1.2. Citometría de flujo

A continuación, se analizó la expresión basal de NOD1 a nivel de proteína con un marcaje intracelular y utilizando como control positivo células Jurkat. El análisis mediante CF reveló que NOD1 es expresado en PC a niveles ligeramente inferiores que en las células Jurkat (**Fig. 8**).

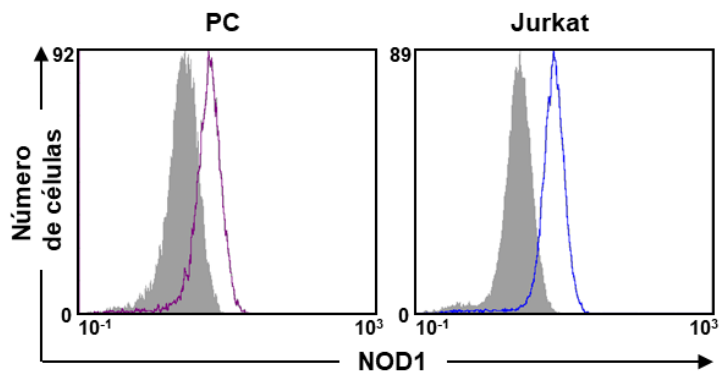


Figura 8. Expresión de NOD1 en pericitos y células Jurkat. Expresión basal intracelular de NOD1 mediante citometría de flujo en pericitos y células Jurkat (control positivo). Las curvas en color gris corresponden a los controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario.

1.1.3. Inmunofluorescencia

Finalmente, se analizó la distribución subcelular de NOD1 en los PC mediante inmunofluorescencia y visualización por microscopía confocal. Las imágenes mostraron un patrón citoplasmático difuso de NOD1, ausente en los controles negativos (**Fig. 9**).

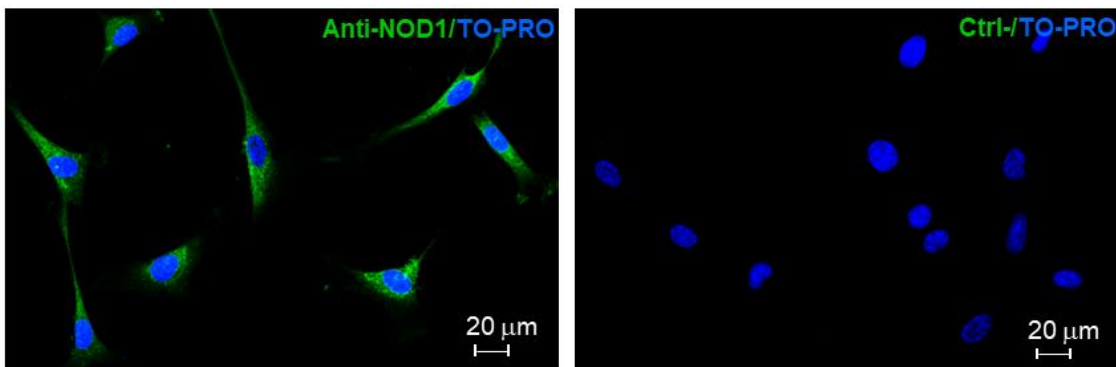


Figura 9. Inmunofluorescencia de NOD1. En la imagen de la izquierda se observa NOD1 en el citoplasma de pericitos (verde), con los núcleos teñidos en azul. A la derecha, control negativo en el que se ha omitido el anticuerpo primario.

1.2. Respuesta proinflamatoria de PC a ligandos de NOD1

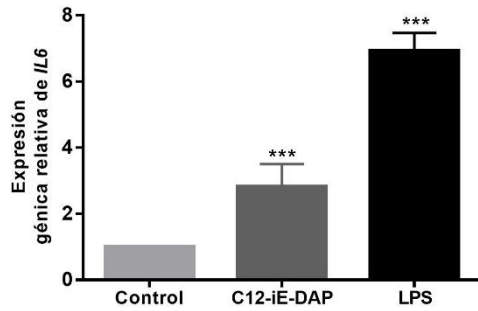
Una vez comprobada la expresión de NOD1 en PC, el siguiente paso fue analizar si la vía de señalización estaba activa en estas células. Para ello se trataron los PC con un agonista de NOD1 (C12-iE-DAP) y se analizó la expresión de diferentes mediadores proinflamatorios.

1.2.1. Expresión de *IL6* e *IL8* mediante qRT-PCR

Los PC fueron estimulados con C12-iE-DAP (5 µg/ml) durante 6 horas, posteriormente se aisló el ARNm y se comparó la modulación de la expresión de *IL6* e *IL8* respecto a los PC no tratados, utilizando como control positivo LPS ultrapuro (100 ng/ml), sin trazas de otros PAMP.

Tanto C12-iE-DAP como el LPS ultrapuro indujeron significativamente la expresión génica de *IL6* (**Fig. 10.a**) e *IL8* (**Fig. 10.b**), siendo este incremento mayor para *IL8* como ya se había demostrado anteriormente con LPS (Guijarro-Muñoz et al., 2014).

a) *IL6*



b) *IL8*

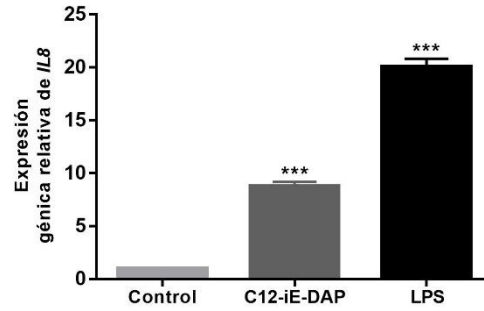


Figura 10. Activación de NOD1 en pericitos. Expresión génica de *IL6* (a) e *IL8* (b) analizada mediante qRT-PCR tras la estimulación de pericitos con C12-iE-DAP (5 µg/ml) o LPS ultrapuro (100 ng/ml) durante 6 horas. Los resultados representan tres ensayos independientes (***p* < 0.001).

1.2.2. Expresión de IL-8 mediante ELISA

A continuación, se analizó la secreción de IL-8 en el sobrenadante de PC estimulados o no con C12-iE-DAP (5 µg/ml) y LPS ultrapuro (100 ng/ml) durante 6 horas.

De acuerdo con los resultados de ARNm, ambos, C12-iE-DAP y LPS ultrapuro indujeron significativamente la secreción de IL-8 (**Fig. 11**), observándose una secreción basal de IL-8 en PC no estimulados.

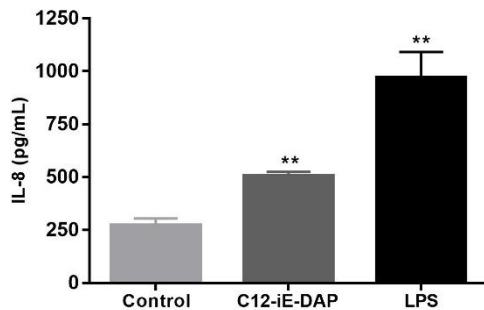


Figura 11. Secreción de IL-8 por pericitos. Cuantificación de IL-8 mediante ELISA en el sobrenadante de pericitos no estimulados (secreción basal) y estimulados con C12-iE-DAP (5 µg/ml) y LPS (100 ng/ml) durante 6 horas. Los resultados representan tres ensayos independientes (***p* < 0.01).

1.2.3. Efecto sinérgico de TLR4 y NOD1

Ya que tanto NOD1 como TLR4 son funcionalmente activos en PC, se evaluó si existía un efecto sinérgico entre ambas vías de señalización.

Para ello, se combinaron los agonistas respectivos de cada receptor, C12-iE-DAP y LPS, a dosis subóptimas. Cuando los PC fueron tratados de manera independiente con C12-iE-DAP (1 µg/ml) o LPS (5 ng/ml) durante 6 horas hubo un aumento moderado, pero estadísticamente significativo, de los niveles de ARNm de *IL8*. Sin embargo, cuando los PC fueron coestimulados con C12-iE-DAP y LPS a las mismas concentraciones, tuvo lugar un efecto claramente sinérgico en la expresión génica de *IL8* (**Fig. 12**). De hecho, el tratamiento simultáneo de PC con 1 µg/ml

C12-iE-DAP y 5 ng/ml LPS produjo una sobreexpresión de *IL8* mayor (**Fig. 12**) que la obtenida al tratar PC con 100 ng/ml de LPS (**Fig. 10.b**).

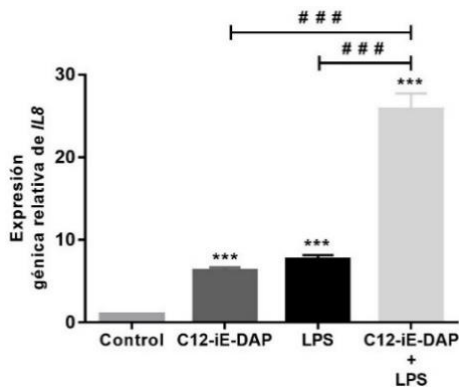


Figura 12. Efecto sinérgico de los agonistas de NOD1 y TLR4 sobre la expresión de IL8 en pericitos. El tratamiento de pericitos con C12-iE-DAP (1 µg/ml) y LPS (5 ng/ml) durante 6 horas produjo un aumento en la expresión del gen *IL8* en pericitos mayor que el de la suma de cada estímulo por separado. Los resultados muestran tres ensayos independientes (***) $p < 0.001$ respecto al control no tratado; ### $p < 0.001$ respecto estímulos individuales o simultáneos).

1.3. Estudio de la vía de señalización de NOD1

1.3.1. Silenciamiento de NOD1

Para demostrar inequívocamente que el efecto de C12-iE-DAP en PC está mediado por NOD1, se silenció la expresión de *NOD1* usando la tecnología del ARN de interferencia. Para ello, los PC fueron transducidos con vectores lentivirales que codifican un *pool* de ARNsh específicos para NOD1. Según el análisis mediante qRT-PCR, la expresión del gen *NOD1* disminuyó en torno a un 70% en comparación con los PC transducidos con lentivirus que expresan ARNsh de control (**Fig. 13.a**).

La disminución de expresión de NOD1 fue analizada también a nivel de proteína mediante *western blot* (WB). En la **figura 13.b** se puede observar, en el carril izquierdo, la expresión de NOD1 en PC control y en el derecho, su expresión en PC silenciados para NOD1. El análisis densitométrico de las bandas muestra una disminución en la expresión de NOD1 con respecto al control de mayor del 63%.

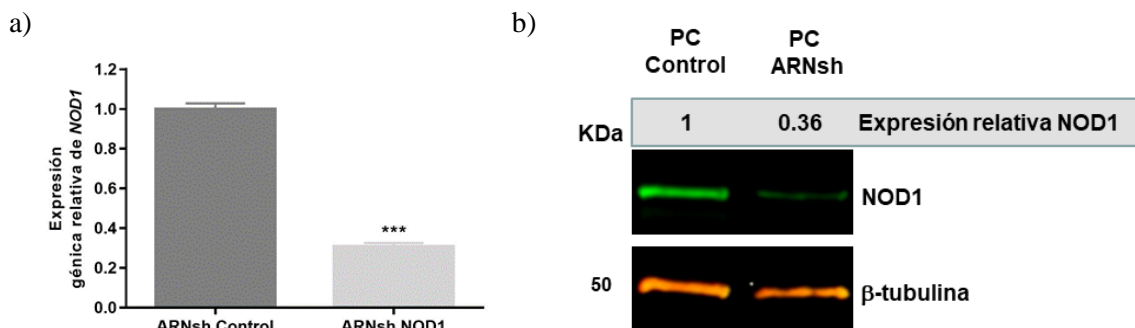


Figura 13. Expresión de NOD1 en pericitos tras su silenciamiento. a) Expresión génica de *NOD1* analizada por qRT-PCR tras el silenciamiento con partículas lentivirales ARNsh para *NOD1*. b) Análisis mediante WB mostrando la expresión relativa de *NOD1* en pericitos silenciados con respecto a los pericitos control. Un anticuerpo anti-β-tubulina fue utilizado como control de carga.

Una vez demostrado el silenciamiento de NOD1, se procedió a estimular los PC con C12-iE-DAP (1 µg/ml) durante 6 horas y se estudió la modulación de *IL8* mediante qRT-PCR. Como se observa en la **figura 14**, la expresión de *IL8* sufrió una disminución estadísticamente significativa en los PC con NOD1 silenciado (> 62%, $p < 0.001$), confirmando que el agonista C12-iE-DAP media la regulación positiva de *IL8* a través de NOD1.

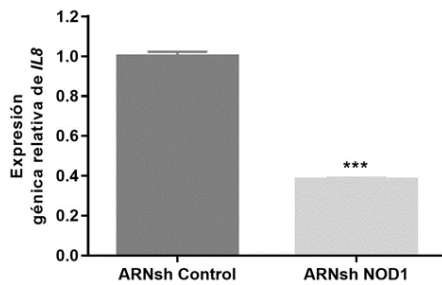


Figura 14. Expresión de *IL8* en pericitos silenciados para NOD1. Expresión de *IL8* mediante qRT-PCR en pericitos control y silenciados con ARNsh para NOD1 y posterior estimulación con C12-iE-DAP (1 µg/ml) durante 6 horas. Los resultados representan tres ensayos independientes (***) $p < 0.001$.

1.3.2. Inhibición farmacológica de la vía de señalización de NOD1

La señalización del receptor NOD1 tiene lugar mediante la interacción con RIPK2 (Kobayashi et al., 2002) tras la unión con el ligando, pero la funcionalidad de esta vía no ha sido estudiada en PC. Para discriminar las respuestas observadas en PC mediadas por NOD1 y TLR4, se utilizó PP2, un potente inhibidor farmacológico de RIPK2 (Windheim et al., 2007).

Los PC fueron tratados durante 30 minutos con el inhibidor PP2 en concentraciones desde 0.01 µM a 10 µM, antes de ser estimulados con C12-E-DAP (1 µg/ml) o LPS ultrapuro (50 ng/ml) durante 6 horas.

El tratamiento de PC con PP2 dio como resultado una inhibición dosis-dependiente de la expresión génica de *IL8* inducida por C12-iE-DAP. Sin embargo, la inhibición de RIPK2 no tuvo efecto sobre la modulación de la expresión de *IL8* mediada por LPS, lo que demuestra una inhibición selectiva de la cascada de señalización de NOD1 (**Fig. 15**).

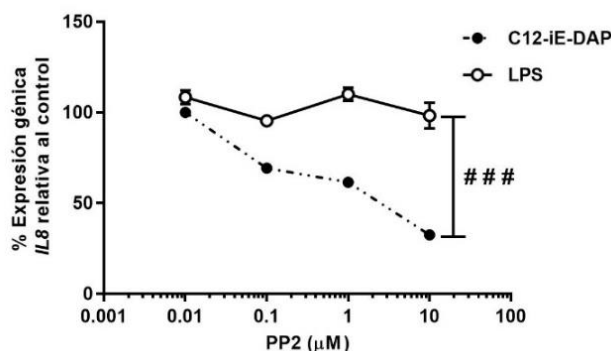


Figura 15. Papel de RIPK2 en la respuesta mediada por NOD1. Pericitos incubados con diferentes concentraciones de PP2 [0.01 a 10µM] durante 30 minutos antes del tratamiento con LPS (50 ng/ml) o C12-iE-DAP (1 µg/ml) durante 6 horas y posterior análisis de la expresión de *IL8* mediante qRT-PCR. Los resultados se representan como el porcentaje de respuesta a C12-iE-DAP o LPS respecto a las células no tratadas con el inhibidor PP2. Los resultados representan tres ensayos independientes (###) $p < 0.001$.

1.3.3. Mediadores de la vía de señalización de NOD1

En la cascada de señalización de NOD1, y por debajo de RIPK2, puede haber diferentes mediadores. Para identificar los implicados en la respuesta a C12-iE-DAP, los PC se trataron con SC-514 (inhibidor de NF- κ B), SB203580 (inhibidor de p38), SP600125 (inhibidor de JNK 1-2) o PD98059 (inhibidor de MEK-1) a una concentración de 10 μ M durante 30 minutos antes de estimularlos con 1 μ g/ml C12-iE-DAP durante 6 horas.

Como puede observarse en la **figura 16**, la preincubación de PC con SP600125 o PD98059 antes del estímulo, no afectó a la expresión de *IL8*. Sin embargo, el tratamiento con los inhibidores de SC-514 o de SB203580, tuvo como resultado una reducción estadísticamente significativa de la expresión de *IL8* inducida por C12-iE-DAP ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente) (**Fig. 16**).

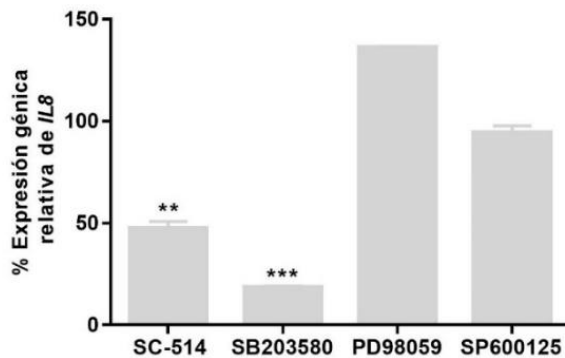


Figura 16. Expresión de *IL8* tras el tratamiento con diferentes inhibidores en pericitos. Expresión de *IL8* tras la preincubación con los diferentes inhibidores, SC-514, SB203580, PD98059, SP600125 (10 μ M) durante 30 minutos y posterior estímulo con 1 μ g/ml C12-iE-DAP durante 6 horas. El resultado representa tres ensayos independientes (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Para comprobar si la inhibición mediada por SC-514 o SB203580 era dosis-dependiente, se utilizó un rango de concentraciones de 0.1-10 μ M de cada uno de ellos, estimulado posteriormente los PC con 1 μ g/ml C12-iE-DAP durante 6 horas. El aumento de la expresión de *IL8* mediada por C12-iE-DAP sólo disminuyó significativamente con la concentración más alta del inhibidor de NF- κ B (SC-514) (**Fig. 17**). Sin embargo, se observó un potente efecto inhibitor con SB203580 a concentraciones más bajas ($p < 0.001$ a 1 μ M), lo que sugiere que p38 tiene un papel fundamental en la respuesta mediada por NOD1 (**Fig. 17**).

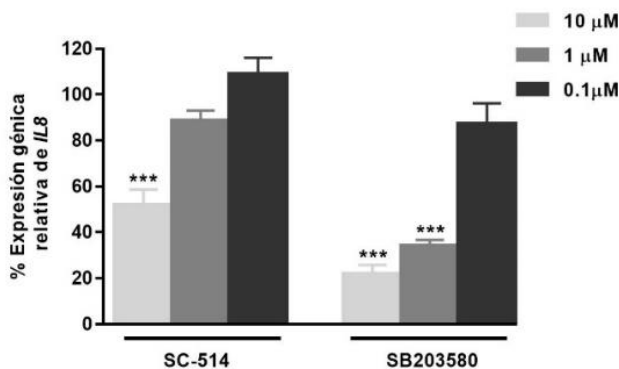


Figura 17. Efecto dosis-respuesta sobre la expresión de *IL8* en pericitos tras el tratamiento con inhibidores de NF- κ B y p38. Expresión de *IL8* tras la preincubación con los inhibidores SC-514 y SB203580 en un rango de concentraciones de 0.1-10 μ M y posterior estímulo con 1 μ g/ml C12-iE-DAP durante 6 horas. El resultado representa tres ensayos independientes (***) ($p < 0.001$).

2. PAPEL DEL PERICITO EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

2.1. Efecto funcional *in vitro* del pericito sobre células de CCR

2.1.1. Estudios de proliferación

En primer lugar, se estudió la influencia de los PC sobre la proliferación de las células HCT 116. Para poder valorarla en cocultivos con contacto, se generó la línea celular HCT 116^{Luc} que expresa F-Luc, mediante la infección con partículas lentivirales producidas en el laboratorio (**apartado 4.3.1**). Las células HCT 116^{Luc} permiten el seguimiento del crecimiento tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* mediante detección de bioluminiscencia en presencia del sustrato de luciferasa (D-Luciferina).

Las células HCT 116^{Luc} se mezclaron con PC en proporción 1:1, y tras 48 horas en cocultivo, se añadió 20 µg de D-Luciferina por pocillo, y se comparó la emisión de luz de las células HCT 116^{Luc} en cocultivo y en monocultivo.

Las células de CCR cocultivadas con PC mostraron un aumento estadísticamente significativo en su tasa de crecimiento ($p < 0.001$) (**Fig. 18.a**). Para comprobar si este efecto dependía parcial o totalmente de factores solubles, se utilizaron cocultivos sin contacto en soportes permeables tipo *transwell*. Las células HCT 116 se cultivaron en la cámara inferior y los PC se añadieron a la cámara superior del *transwell*, separados por una membrana con poros de 0.4 µm de diámetro. A los tres días, se retiraron los PC y se añadió *CellTiter-Glo* a las células HCT 116 para cuantificar su número relativo/viabilidad mediante bioluminiscencia. Con este diseño experimental también se observó un aumento significativo en la proliferación de las células HCT 116, lo que sugiere la implicación de factores solubles secretados por los PC en el aumento de la capacidad proliferativa de las células HCT 116 (**Fig. 18.b**).

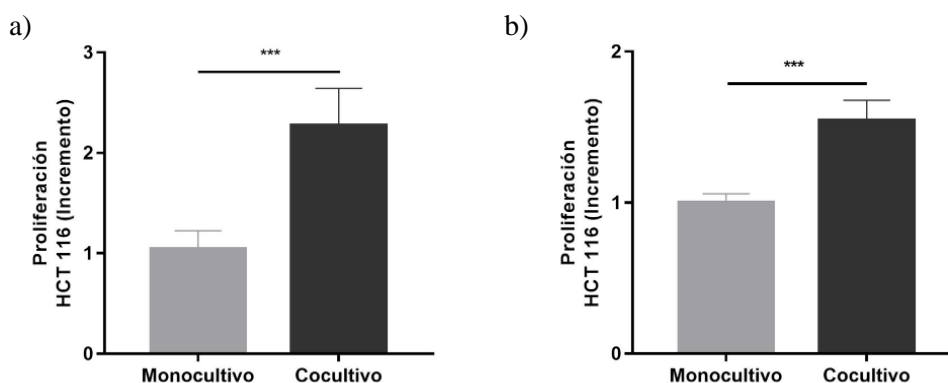


Figura 18. Capacidad proliferativa de la línea celular HCT 116 en presencia de pericitos. a) El cocultivo de pericitos y HCT 116^{Luc} con contacto promueve la proliferación de las células HCT 116. b) El cocultivo de pericitos y HCT 116 sin contacto, en sistema de *transwell*, también promueve la proliferación de las células HCT 116. Los resultados representan tres ensayos independientes en cada caso (***) $p < 0.001$.

Para validar este resultado en otra línea celular, se repitió el ensayo con la línea de CCR HT-29. Como puede observarse en la **figura 19**, el cocultivo con PC promueve la capacidad proliferativa de las células HT-29 de manera estadísticamente significativa ($p < 0.001$), igual que ocurría con las células HCT 116, descartando que el efecto de los PC sobre las células de CCR sea específico de una línea celular concreta.

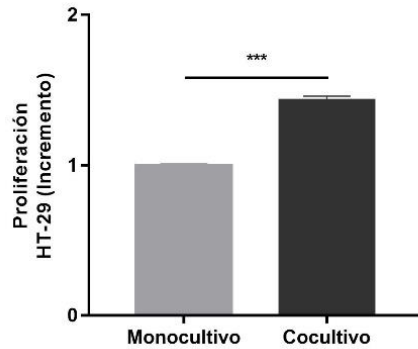


Figura 19. Capacidad proliferativa de la línea celular HT-29 en presencia de pericitos. El cocultivo de pericitos y células HT-29 promueve la proliferación de la línea celular HT-29. Los resultados representan tres ensayos independientes (***) $p < 0.001$.

2.1.2. Estudios de migración

Otra de las características más relevantes de las células tumorales es su capacidad migratoria. Una vez observado que los PC aumentaban la proliferación de células de CCR, se decidió analizar si éstos eran también capaces de modular su capacidad migratoria mediante WH. Las células HCT 116 se sembraron hasta alcanzar confluencia y una vez creada la “herida” se colocaron *transwell* en la parte superior, que contenían PC o HCT 116. Pocillos sin *transwell* (monocultivos) fueron usados también como control negativo.

Al cabo de 22h, las células HCT 116 que migraban en pocillos control no habían cubierto ni el 50% del área libre de células. Sin embargo, en los pocillos que contenían *transwell* con PC, tan solo un 13% de la superficie permanecía descubierta, y el cierre fue completo a las 32h (**Fig. 20.a y b**). Estos datos demuestran que los PC promueven de forma significativa la capacidad migratoria *in vitro* de las células HCT 116 a través de factores solubles.

El efecto de los PC sobre la migración de las células HCT 116 no es específico de esta línea, ya que se reprodujo con las células HT-29. Como se puede observar en la **figura 20.c**, el cocultivo de HT-29 con PC en *transwell*, aumentó la capacidad migratoria de las células HT-29, aunque a tiempos más tardíos, siendo el cierre de la herida completo a las 72h.

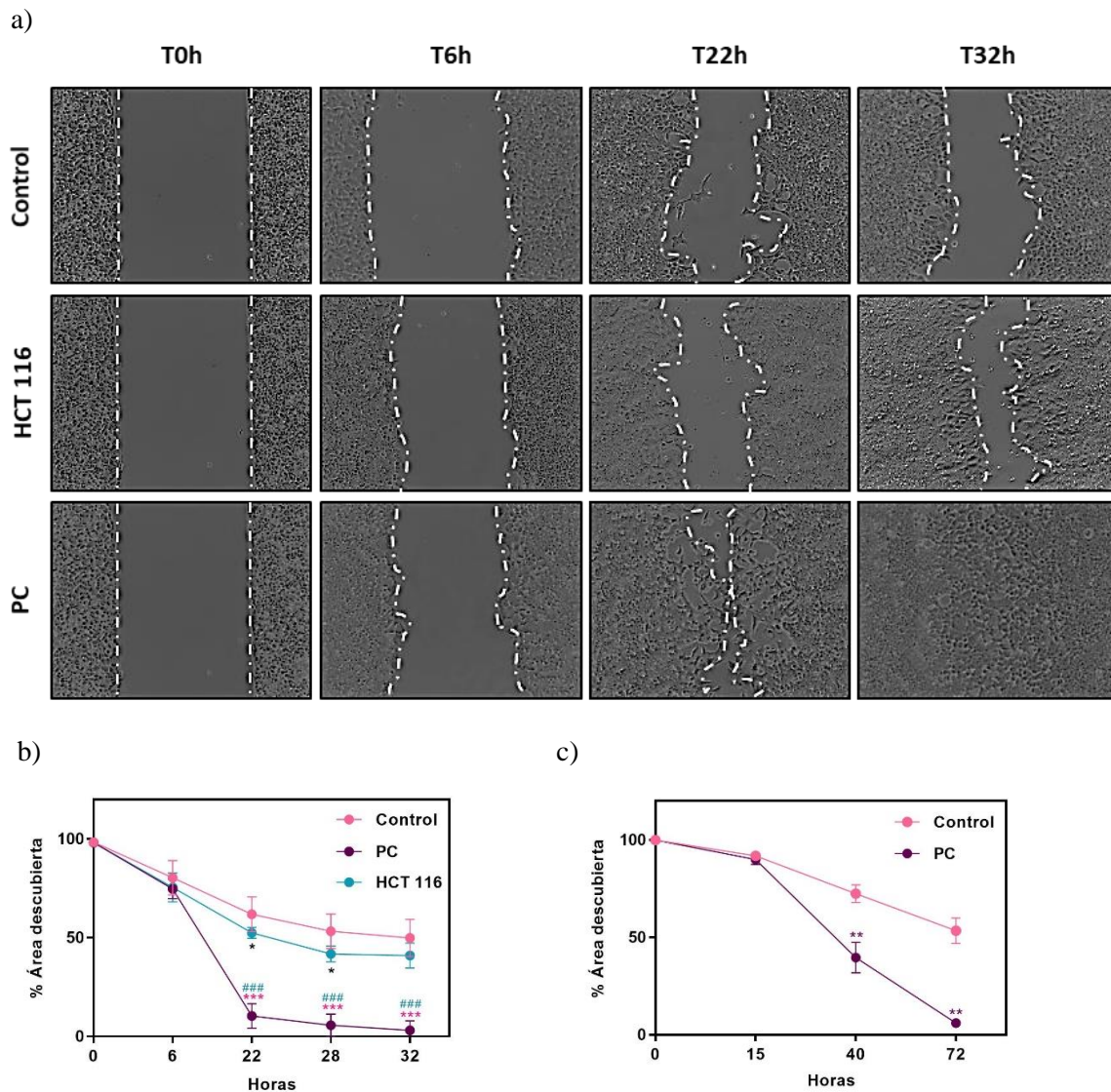


Figura 20. Los pericitos promueven la capacidad migratoria de las células de CCR. a) Imágenes representativas del ensayo wound healing en cocultivo con células HCT 116 y pericitos. b) Representación gráfica del ensayo de wound healing en cocultivo con células HCT 116 y pericitos. c) Representación gráfica del ensayo wound healing en cocultivo de células HT-29 con pericitos. Los resultados representan tres ensayos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

2.1.3. Estudios de invasión

Por último, se analizó la capacidad invasiva de las células de CCR en presencia de PC usando *transwell* con poros de 8 μm cubiertos con matrigel, una preparación de matriz extracelular. Las células HCT 116 se sembraron en la cámara superior y como atrayente en el pocillo inferior se utilizaron cultivos de PC o HCT 116. Pocillos sin células fueron utilizados también como control negativo de invasión.

Tras 48 horas en cultivo, se realizaron fotos de los *transwell* antes de su manipulación, donde pueden observarse las células HCT 116, pero no se aprecia si están en la parte superior o inferior del filtro (**Fig. 21.a., condición PRE**). A continuación, la parte superior del *transwell*

donde fueron añadidas las células HCT 116 fue raspada para eliminar las células que no habían migrado. Por último, se toman de nuevo fotografías en las que puede apreciarse las células HCT 116 que han invadido el matrigel y se encuentran en la parte inferior del *transwell* (**Fig. 21.b., condición POS**). Para realizar un análisis cuantitativo de las células que han sido capaces de invadir el matrigel, se añade *CellTiter-Glo* al filtro antes de su valoración en un luminómetro de placas. Tanto en la **figura 21.a** como en la **figura 21.b**, se puede observar que las células HCT 116 tienen una capacidad invasiva mucho mayor cuando los PC son el atrayente en la cámara inferior, implicando factores solubles en la modulación de este efecto.

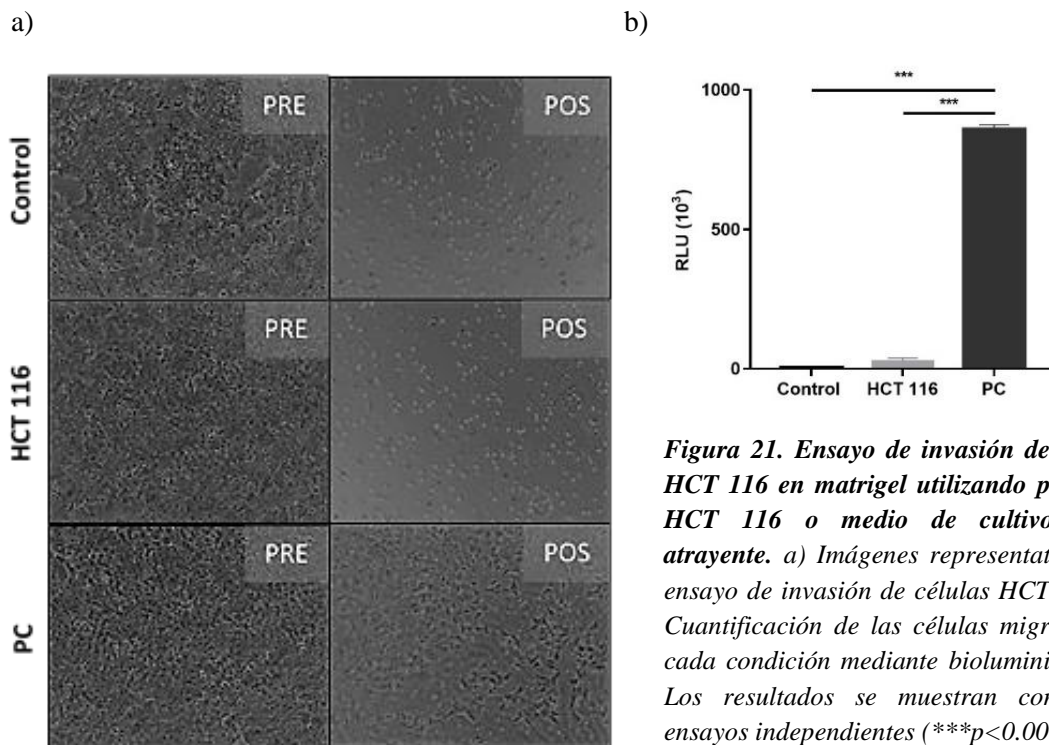


Figura 21. Ensayo de invasión de células HCT 116 en matrigel utilizando pericitos, HCT 116 o medio de cultivo como atrayente. a) Imágenes representativas del ensayo de invasión de células HCT 116. b) Cuantificación de las células migradas en cada condición mediante bioluminiscencia. Los resultados se muestran como tres ensayos independientes ($p < 0.001$).**

2.2. Modulación del fenotipo *cancer stem cell* de las células de CCR

Se ha propuesto en varios tipos de cancer humano la existencia de una subpoblación de células tumorales capaces de iniciar y mantener el crecimiento tumoral. Estas células conocidas como CSC tendrían capacidad de autorrenovación, podrían eludir el tratamiento con quimioterapia y jugarían un importante papel en la metástasis.

2.2.1. Enriquecimiento en *cancer stem cell*

2.2.1.1. Expresión del marcador aldehído deshidrogenasa 1

La aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) es un marcador utilizado habitualmente para identificar CSC. Para comprobar si los PC tenían algún efecto sobre esta subpoblación, la

actividad enzimática de ALDH1 se estudió en células HCT 116 en monocultivo y en cocultivo con PC durante 48 horas mediante CF.

Como puede observarse en la **figura 22**, un 27.8 % de las células HCT 116 en monocultivo presentan actividad ALDH1, que corresponderían a la subpoblación de CSC. En el caso del cocultivo con PC, el porcentaje de células HCT 116 ALDH1 positivas se ve incrementado hasta un 47.2%, lo que nos sugiere que los PC son capaces de modular el enriquecimiento en CSC dentro de la población celular de HCT 116. Como control negativo se incubaron las células HCT 116 con un inhibidor de la actividad ALDH1 (DEAB).

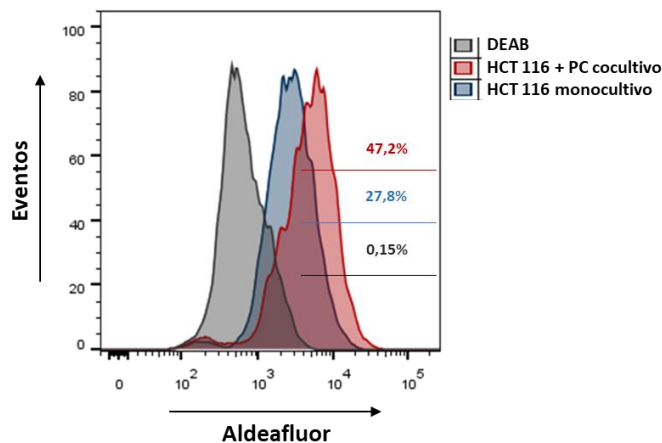


Figura 22. Expresión de ALDH1 en células HCT 116. Citometría de flujo de células HCT 116 en monocultivo (azul) y cocultivo con pericitos (rojo) en la que se analiza la expresión del marcador ALDH1. El control negativo (en gris) corresponde a las células HCT 116 incubadas con un inhibidor de ALDH1 (DEAB).

2.2.1.2. Formación de colonoesferas

Una de las propiedades de las CSC es la capacidad de crecer en forma de esferas en un medio libre de suero (FCS), a partir de un número limitante de células y en placas de cultivo de baja adherencia (Lim et al., 2011). Tras observar la presencia de CSC en la población celular HCT 116 se decidió optimizar un ensayo funcional de formación de colonoesferas. La **figura 23** muestra como las células HCT 116 son capaces de crecer en suspensión formando colonoesferas, siendo detectables a los 3 días de cultivo en estas condiciones y aumentando en número y/o tamaño con el tiempo.

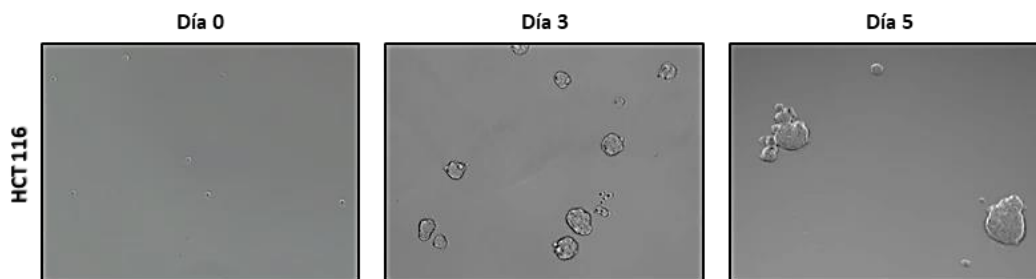


Figura 23. Formación de colonoesferas por la línea celular HCT 116. Las células se cultivaron en medio libre de suero y bajo condiciones de no adherencia para observar la formación de esferas. Imágenes de microscopio representativas del crecimiento de las colonoesferas en la línea celular HCT 116 a día 0, 3 y 5 días de cultivo (Objetivo 10x).

Para comprobar si los PC eran capaces de modular la formación de colonoesferas en línea con lo observado en la expresión de ALDH1, se sembraron PC en *transwells* y cuando alcanzaron aproximadamente el 80% de confluencia se colocaron encima de los pocillos con células HCT 116 en condiciones de formación de colonoesferas durante cinco días.

Para cuantificar la formación de colonoesferas se utilizaron dos métodos diferentes. En primer lugar, se realizaron fotografías de tres pocillos por condición y se midieron las áreas ocupadas por colonoesferas en píxeles con el programa *Image J*. En segundo lugar, se procesaron las colonoesferas con *CellTiter-Glo* y la emisión de luz se midió en un luminómetro de placas.

El cocultivo de las células HCT 116 con PC incrementa la formación de colonoesferas tanto en tamaño (área ocupada, píxeles) (**Fig. 24a**) como en número relativo/viabilidad (**Fig. 24.b**), con un incremento aproximado de 3.5 veces con respecto al monocultivo en ambos casos. Esto apoya la observación previa de que factores solubles derivados de PC promueven el fenotipo CSC de las células HCT 116.

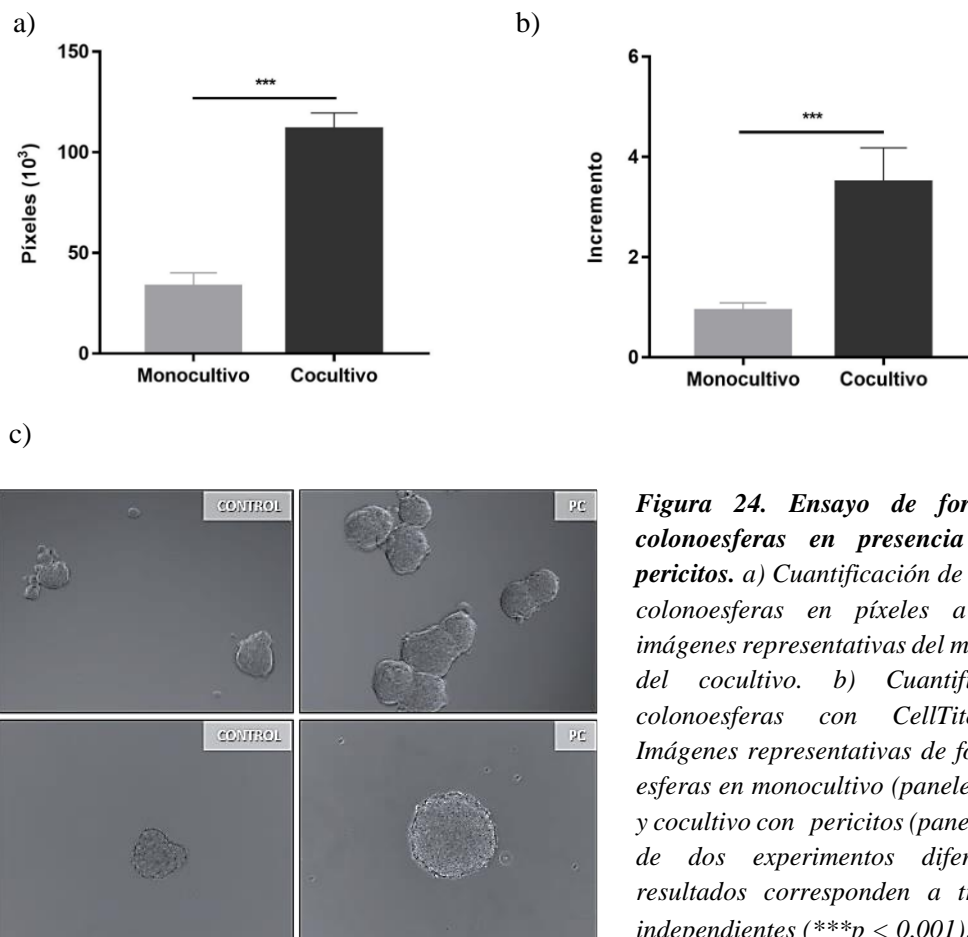


Figura 24. Ensayo de formación de colonoesferas en presencia o no de pericitos. a) Cuantificación de las áreas de colonoesferas en píxeles a partir de imágenes representativas del monocultivo y del cocultivo. b) Cuantificación de colonoesferas con *CellTiter-Glo*. c) Imágenes representativas de formación de esferas en monocultivo (paneles izquierda) y cocultivo con pericitos (paneles derecha) de dos experimentos diferentes. Los resultados corresponden a tres ensayos independientes (** $p < 0.001$).

Un regulador muy importante en las CSC relacionado con la capacidad de autorrenovación es NANOG, factor de transcripción normalmente sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer y utilizado como marcador característico de CSC. Por ello, se estudió la expresión de *NANOG* mediante qRT-PCR en las colonoesferas formadas en condiciones basales, tratadas con medio condicionado (MC) de HCT 116 y con MC de PC (**apartado 3.2.a.**).

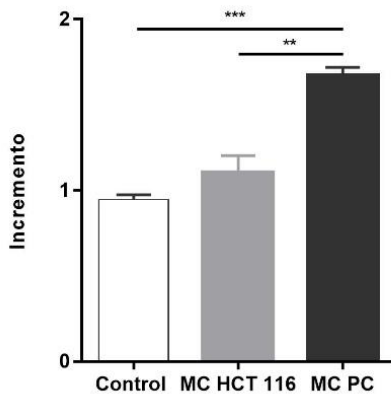


Figura 25. Expresión de NANOG en colonoesferas de células HCT 116. Expresión de NANOG mediante qRT-PCR en colonoesferas tratadas con MC de HCT 116, MC de pericitos y DMEM como control del ensayo, representado como incremento de las condiciones respecto del control. Los resultados corresponden a tres ensayos independientes (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Como puede observarse en la **figura 25**, el MC de PC incrementa la expresión de este marcador característico de CSC, lo que estaría en línea con los ensayos anteriores que muestran como factores secretados por PC incrementan las propiedades *stem* de las células HCT 116.

2.2.2. Efecto sobre la quimiorresistencia de las células de CCR

Otra de las propiedades de las CSC sería la quimiorresistencia. Los regímenes de quimioterapia más utilizados en CCR (FOLFOX y FOLFIRI) incluyen 5-Fluorouracilo (5-FU), por lo que se decidió utilizar este quimioterápico para estudiar el efecto de los PC sobre la resistencia de las células HCT 116.

Inicialmente, se calculó la IC_{50} de las células HCT 116 en presencia de 5-FU tras 96 horas en cultivo. Como se observa en la **figura 26**, la concentración a la que mueren aproximadamente el 50 % de células HCT 116 en presencia de 5-FU es de $5\mu M$, por lo que esta dosis fue la elegida para la realización de los estudios posteriores.

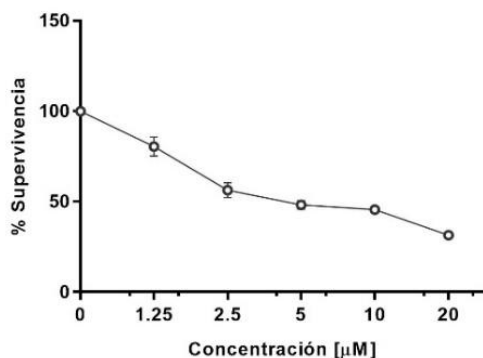


Figura 26. IC_{50} de células HCT 116 tratadas con 5-FU. Las células HCT 116 fueron expuestas a varias concentraciones de 5-FU [0-20 μM] durante 96 h. Posteriormente se analizó el porcentaje de supervivencia con CellTiter-Glo. Los datos representan tres experimentos independientes.

A continuación, las células HCT 116 fueron expuestas a 5 μ M 5-FU, en monocultivo o en cocultivo con PC sembrados en *transwell*. A las 96 horas, la viabilidad de las células HCT 116 en monocultivo en relación con las células no tratadas estaba en torno al 50%, pero dicha viabilidad se incrementaba a un 85% en presencia de PC ($p < 0.001$) (**Fig. 27.a**).

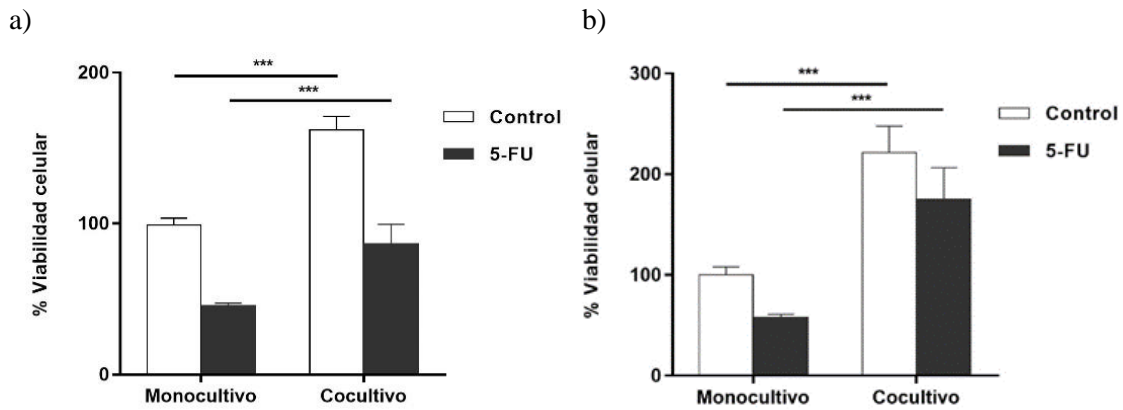


Figura 27. Ensayo de quimiorresistencia en células HCT 116. a) Supervivencia de células HCT 116 en adherencia tras el tratamiento con 5-FU (5 μ M) en monocultivo y cocultivo con pericitos. b) Supervivencia de las células HCT 116 en formación de colonoesferas tras el tratamiento con 5-FU (5 μ M) en monocultivo y cocultivo con pericitos. Las gráficas representan tres ensayos independientes (***) $p < 0.001$.

El efecto de los PC sobre la quimiorresistencia de las células HCT 116 no solo tiene lugar cuando se tratan las células con 5-FU en adherencia, sino que es más evidente incluso en el contexto de ensayo de formación de colonoesferas. Tras 5 días en cultivo de las células HCT 116 en placas de baja adherencia en presencia o no de 5-FU (5 μ M) en monocultivo o en cocultivo con PC, se analizó la viabilidad celular de las colonoesferas. Ya de manera basal, las células HCT 116 que forman colonoesferas tienen una supervivencia mayor que las HCT 116 en adherencia (60% vs 50%, respectivamente) a la misma concentración de 5-FU (5 μ M) (**Fig. 27.b**), lo que apoya su enriquecimiento en CSC. Pero cuando las colonoesferas son cocultivadas con PC en presencia de 5-FU, el porcentaje de células viables aumenta tres veces con respecto a las células tratadas en monocultivo (**Fig. 27.b**). Por tanto, ambos ensayos sugieren que los PC aumentan la quimiorresistencia de las células HCT 116 a 5-FU, posiblemente favoreciendo el fenotipo CSC.

2.3. Crecimiento tumoral *in vivo*

La repercusión de los ensayos anteriores *in vitro* se exploró también *in vivo* en modelos de ratón atímicos con xenotrasplantes tumorales. Para ello, las células HCT 116 fueron inoculadas de manera aislada o coimplantadas con PC s.c. en el flanco derecho del animal (5 animales por grupo).

Como se muestra en la **figura 28.a**, los tumores pertenecientes al grupo de animales con coimplantación de PC presentaron al final del experimento un volumen significativamente mayor que el grupo derivado de la implantación aislada de HCT 116.

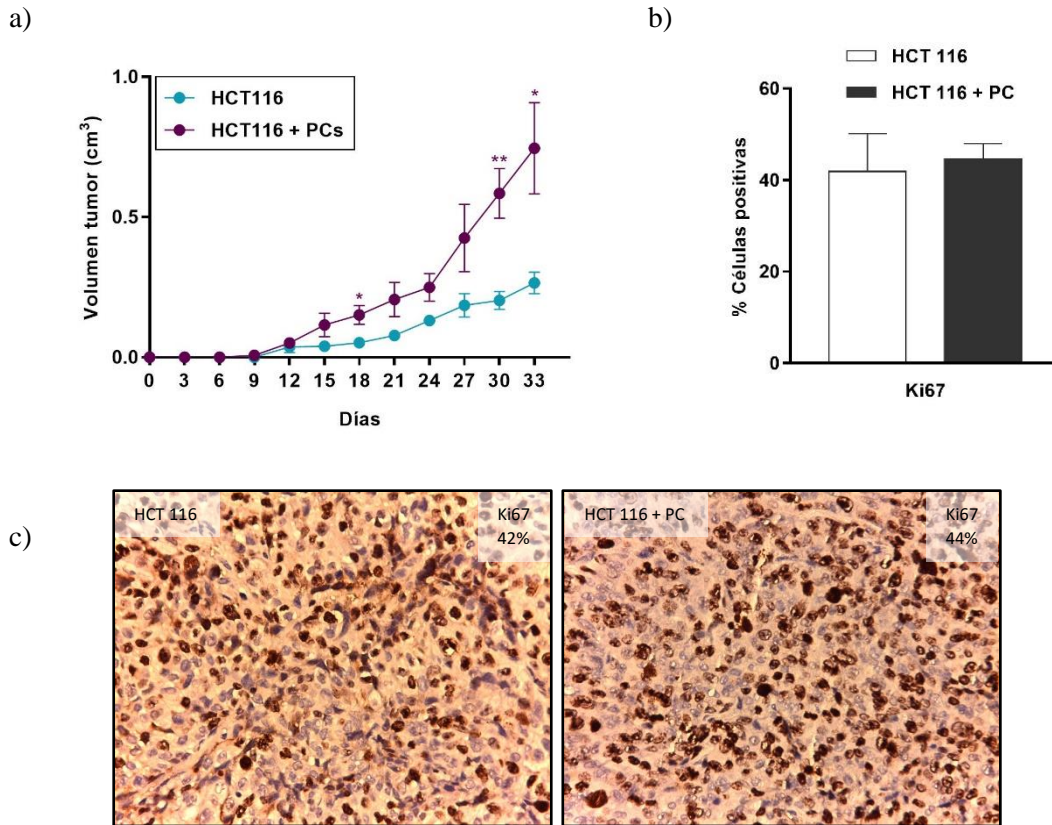
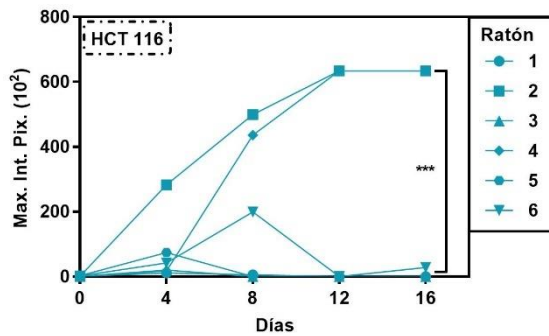


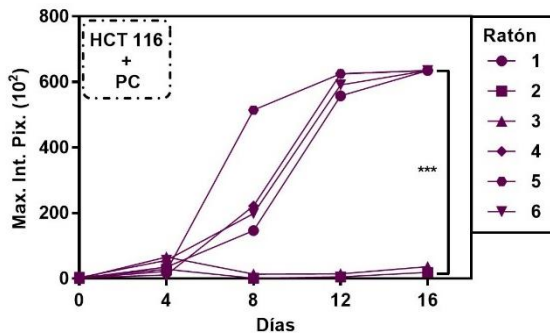
Figura 28. Efecto del pericito sobre la progresión tumoral de las células HCT 116. Ratones atímicos desnudos (n=5) en los que han sido inoculadas s.c. células HCT 116 o células HCT 116 junto a pericitos. a) Representación gráfica de las medidas del volumen tumoral (cm³) adquiridas cada tres días. b) Representación gráfica de la cuantificación de Ki67. c) IHQ de tumores con HCT 116 (izquierda) o HCT 116 más pericitos (derecha) resecados al final del experimento y teñidos para Ki67 (aumento 400x). El porcentaje de células positivas está indicado para cada condición

Sin embargo, cuando se estudió en estos tumores el marcador de proliferación Ki67 mediante IHQ, no se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de células Ki67 positivas entre ambos grupos a día 33 postimplantación (**Fig. 28.b y c**). Esto sugería que las diferencias observadas eran consecuencia de un evento temprano en el desarrollo de los tumores. Para seguir la evolución de las células tumorales antes de que los tumores fueran medibles, se repitió el experimento anterior usando células HCT 116^{Luc} (n=6 animales/grupo). Tras la inyección i.p. del sustrato D-luciferina, se empezó a detectar mediante BLI la presencia de células tumorales a partir del día 4 postinoculación (**Fig. 29.a y b**). El seguimiento se repitió periódicamente hasta día 16, punto dónde ya eran significativas las diferencias en volumen tumoral entre los dos grupos en el ensayo de progresión tumoral anterior.

a) GRUPO 1



b) GRUPO 2



c)

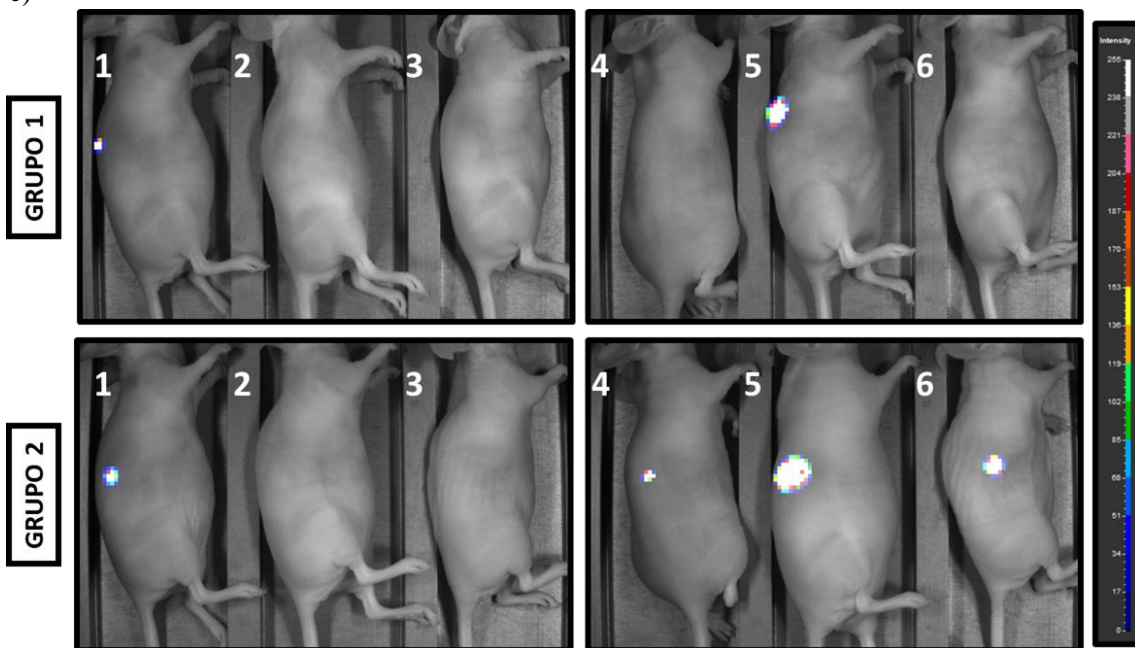


Figura 29. Ensayo de implantación tumoral. Ratones atómicos desnudos en los que han sido inoculadas s.c. células HCT 116^{Luc} (Grupo 1) o células HCT 116^{Luc} junto a pericitos (Grupo 2) ($n = 6$ animales/grupo). a) y b) Representación gráfica de la intensidad máxima de luz emitidas por cada tumor tras la inoculación i.p. del sustrato D-Luciferina. c) Imágenes de bioluminiscencia de HCT 116^{Luc} implantadas s.c. con o sin pericitos en ratones atómicos desnudos a día 16 del ensayo. (***) $p < 0.001$.

El análisis de las imágenes de bioluminiscencia revela diferencias significativas en cuanto a la implantación de las células tumorales en presencia o no de PC. A día 16, en el grupo que contiene PC (Grupo 2), cuatro de seis tumores emiten la señal máxima de bioluminiscencia recogida por el equipo de imagen molecular (**Fig. 29.b y c**). Sin embargo, en el grupo de animales con HCT 116^{Luc} implantadas de forma aislada, tan sólo dos tumores de los seis alcanzan dicha señal (**Fig. 29.a y c**). Estos resultados parecen sugerir que los PC favorecerían la implantación temprana de las células HCT 116, siendo esta ventaja responsable, al menos en parte, de las diferencias en el ensayo de progresión tumoral entre ambos grupos. De hecho, el porcentaje de células α SMA positivas a día 33 postinoculación en el ensayo de progresión tumoral anterior es

prácticamente idéntico en ambos grupos, lo que sugiere que en ese momento la persistencia de los PC ya no es un factor crítico y que su efecto es anterior (**Fig. 30**).

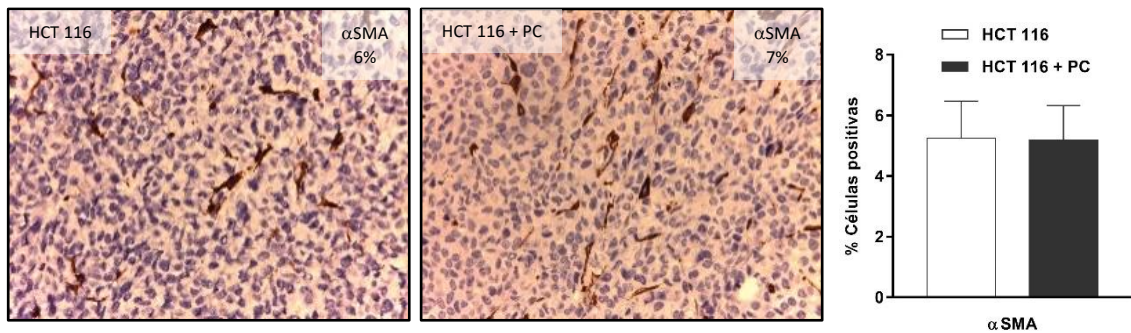


Figura 30. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de α SMA en tumores resecados. En el panel de la izquierda, imágenes representativas de xenoinjertos resecados al final del experimento y teñidos para α SMA (aumento 400x). Panel de la izquierda, células HCT 116 solas, panel de la derecha, HCT 116 más pericitos. El porcentaje de células positivas está indicado para cada condición y representado de forma gráfica a la derecha.

2.4. Análisis del perfil transcripcional del pericito en cocultivos con células de CCR

Los resultados anteriores demuestran que la interacción con los PC promueve la capacidad tumorigénica de las células HCT 116. Con el fin de analizar cómo la célula tumoral “instruye” al PC para conseguir dicho efecto, se comparó el perfil transcripcional de PC en monocultivo o en cocultivo con la línea de CCR en proporción 1:1. A las 48 horas, ambos tipos celulares muestran una distribución espacial bien delimitadas, con células epiteliales redondeadas (HCT 116) separadas por tramos de células alargadas de tipo estromal (PC), recordando preparaciones histológicas de un carcinoma indiferenciado (**Fig. 31.a**).

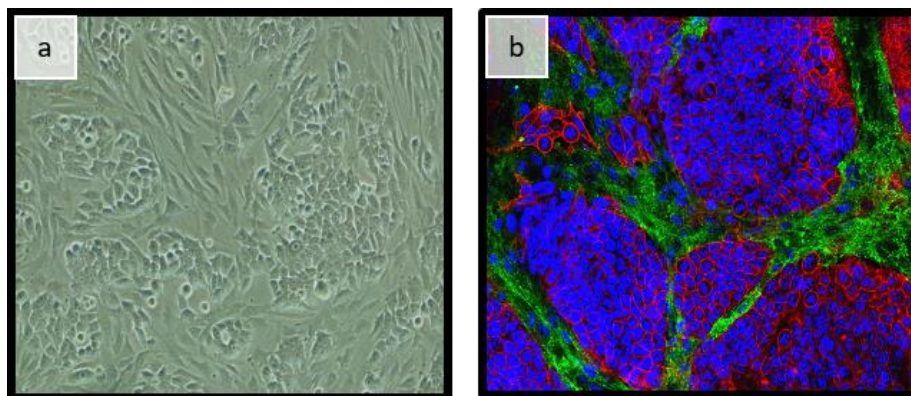


Figura 31. Microscopía confocal del cocultivo de células HCT 116 y pericitos. a) Imagen de luz visible que muestra la disposición de las células HCT 116 y pericitos tras 48 horas en cocultivo (Aumento 100x). b) Imagen de microscopía confocal que muestra la compartimentalización de las células tras el marcaje con anti-EpCAM para HCT 116 (rojo) y anti-PDGFR β para pericitos (verde) en cocultivo. Los núcleos se tiñeron con TO-PRO (azul).

Esta compartimentalización se confirmó además mediante microscopía confocal marcando los PC con un anticuerpo anti-PDGFR β y las células HCT 116 con un anticuerpo anti-EpCAM (Fig. 31.b).

En paralelo, se realizaron en las mismas condiciones cocultivos de HCT 116 y PC además de monocultivos de cada tipo celular que se tripsinizaron a las 48 horas, se marcaron con el anticuerpo anti-PDGFR β -PE y se separaron mediante citometría *sorting* en una población PDGFR β^+ (PC) y otra PDGFR β^- (HCT 116), con una pureza > 99%. Tras la separación celular se extrajo el ARN de los PC procedentes de los cocultivos y de los monocultivos control para su análisis mediante *microarrays* de ADN. Se realizaron triplicados biológicos de cada condición experimental.

El análisis del perfil transcripcional de los PC procedentes de cocultivos, reveló la sobreexpresión de 248 genes con anotación en *GeneSymbol* en relación a los PC en monocultivo (ratio > 2, FDR < 0.05). Los resultados obtenidos se depositaron en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO), del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) con el número de acceso GSE108988. Para la anotación funcional de estos genes se utilizó la herramienta bioinformática DAVID, que confirmó el enriquecimiento en la categoría de Proceso Biológico (BP; del inglés, *Biological Process*) de los términos de “morfogénesis de los vasos sanguíneos”, “angiogénesis”, “regulación de la migración celular” y “regulación de la proliferación celular” (FDR < 5*10⁻³), entre otros (Tabla VI). Este resultado era previsible, dado el papel central de los PC en angiogénesis y la homeostasis vascular. Sin embargo, el mayor enriquecimiento se observó en el término BP de “vía de señalización del receptor de TGF β ” (14,09 veces) y dentro de la categoría de Función Molecular (MF; del inglés, *Molecular Function*) para el término “unión a SMAD” (15,68 veces).

Tabla VI. Análisis GO de genes significativamente sobreexpresados en PC cultivados con células de CCR.

Categoría	Término	pValue	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
GOTERM_BP_FAT	GO:0048514--blood vessel morphogenesis	1,74E-10	9,16	2,60E-07	2,60E-07	2,89E-07
GOTERM_BP_FAT	GO:0001568--blood vessel development	1,40E-09	7,89	2,09E-06	1,04E-06	2,32E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0001944--vasculature development	1,95E-09	7,70	2,91E-06	9,71E-07	3,24E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0001525--angiogenesis	3,63E-07	8,98	5,43E-04	1,36E-04	6,03E-04
GOTERM_BP_FAT	GO:0030334--regulation of cell migration	1,23E-06	7,86	1,84E-03	3,69E-04	2,05E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0042127--regulation of cell proliferation	1,40E-06	3,38	2,09E-03	3,49E-04	2,33E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0040012--regulation of locomotion	3,91E-06	6,92	5,82E-03	8,33E-04	6,49E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0051270--regulation of cell motion	4,09E-06	6,88	6,09E-03	7,64E-04	6,79E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0051173--positive regulation of nitrogen compound metabolic process	4,66E-06	3,56	6,94E-03	7,74E-04	7,74E-03
GOTERM_BP_FAT	GO:0008284--positive regulation of cell proliferation	7,14E-06	4,38	1,06E-02	1,07E-03	1,19E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0007179--transforming growth factor beta receptor signaling pathway	9,30E-06	14,09	1,38E-02	1,26E-03	1,54E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0031328--positive regulation of cellular biosynthetic process	1,09E-05	3,35	1,61E-02	1,36E-03	1,81E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0003700--transcription factor activity	1,19E-05	2,84	3,37E-03	3,37E-03	1,58E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0045935--positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1,24E-05	3,48	1,83E-02	1,42E-03	2,05E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0035295--tube development	1,30E-05	6,04	1,92E-02	1,38E-03	2,16E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0009891--positive regulation of biosynthetic process	1,33E-05	3,30	1,96E-02	1,32E-03	2,20E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0007178--transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	2,15E-05	9,38	3,15E-02	2,00E-03	3,56E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0007166--cell surface receptor linked signal transduction	2,35E-05	2,15	3,45E-02	2,06E-03	3,90E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0046332--SMAD binding	3,63E-05	15,68	1,02E-02	5,14E-03	4,80E-02

GO, del inglés *Gene Ontology*.

La aplicación de software comercial IPA (del inglés, *Ingenuity Pathway Analysis*) también reveló un enriquecimiento significativo del término “señalización de TGF-β”, ($p\text{-value} = 6,25 \times 10^{-6}$) y se utilizó adicionalmente para crear una representación gráfica de la ubicación concreta de los genes implicados dentro de dicha vía (**Fig. 32**).

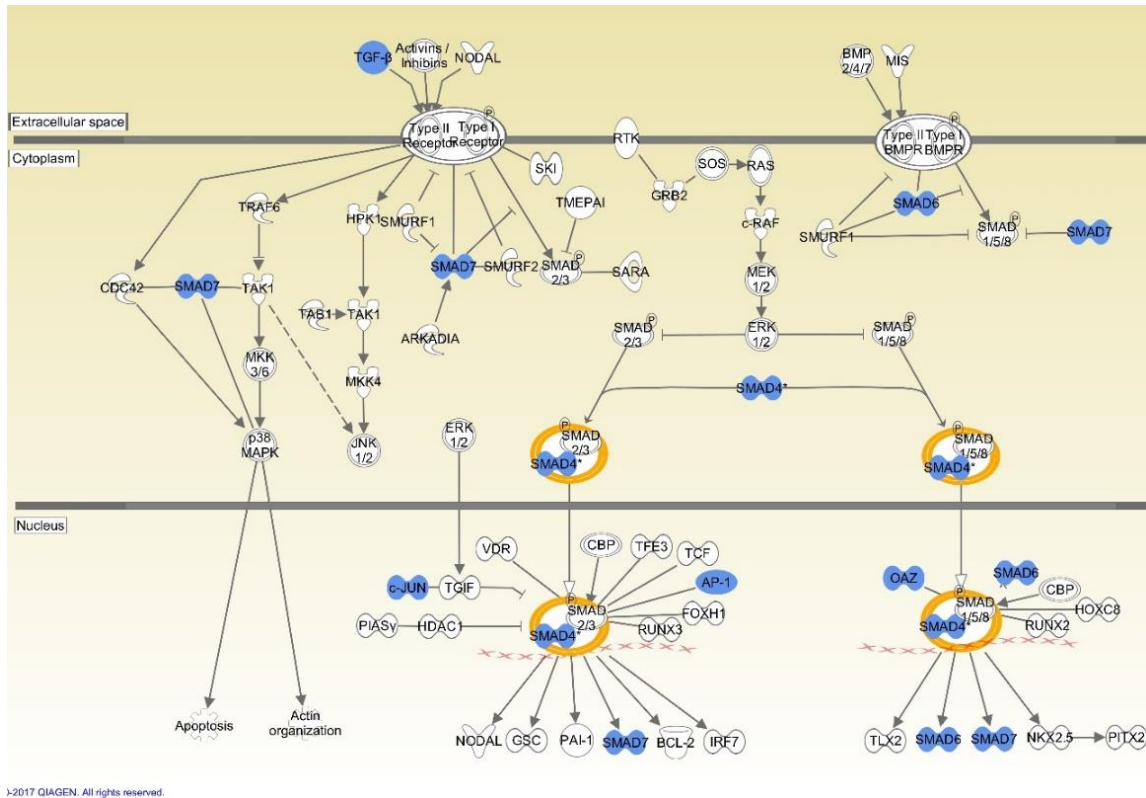
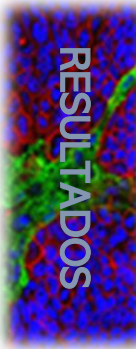


Figura 32. Vía de señalización de TGF-β. Representación de genes implicados en la señalización de TGF-β de acuerdo con el software IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*).

La expresión del propio TGF-β también se inducía de forma significativa, sugiriendo un “*feedback*” positivo autocrino puesto en marcha por el TGF-β producido por las células HCT 116. De hecho, numerosos genes eran compartidos con la firma de respuesta a TGF-β (*TBR5*) descrita en otros tipos de células estromales de CCR como CAF, CE, células T y macrófagos (Calon et al., 2012) (**Tabla suplementaria I**).

El papel de TGF-β en la sobreexpresión de los genes identificados en esta firma molecular de PC se validó mediante qRT-PCR en una selección de genes. Los PC fueron incubados con 10 ng/ml TGF-β durante 24 horas, y la expresión de VCAN, SNAI1, SMAD7, HEY1, HES1 y ZEB2 se comparó con la de PC no tratados (**Fig. 33**). En todos los genes analizados se observó un aumento de la expresión acorde a los resultados de los *microarrays* de ADN.



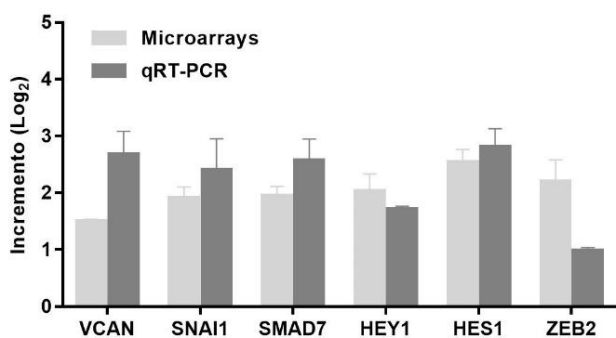


Figura 33. Validación mediante qRT-PCR de genes sobreexpresados en pericitos. Expresión comparativa de seis genes en pericitos tratados con 10 ng/ml de TGF- β 1 durante 24 horas (qRT-PCR) y pericitos cocultivados con células HCT 116 (microarrays de ADN). Representación gráfica como incremento (Log₂).

Resulta de especial relevancia que la expresión de la firma génica de respuesta a TGF- β del PC (P-TBRS) constituye un buen predictor de recidiva en pacientes con CCR. En un grupo de pacientes con datos públicos de transcriptoma tumoral y evolución clínica (GSE14333, n = 226, AJCC etapa I – II – III), divididos en cuartiles (Q) según los niveles de expresión de la firma P-TBRS, aquellos del cuartil más bajo (Q4), tenían una supervivencia libre de enfermedad significativamente mayor (DFS, del inglés, *disease free survival*) tras la cirugía (**Fig. 34**).

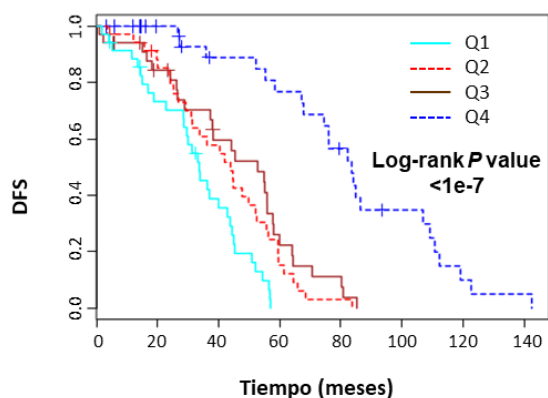


Figura 34. Asociación entre la firma genética P-TBRS de pericitos y el mal pronóstico en pacientes con CCR. Curvas Kaplan-Meier de pacientes con CCR según los cuartiles (Q) de la firma genética P-TBRS. DFS, del inglés *disease free survival*.

Se ha descrito que las células HCT 116 secretan TGF- β 1, que activa la vía de señalización de TGF- β en CAF e inducen su transdiferenciación en miofibroblastos α -SMA positivos (Hawinkels et al., 2014). Sin embargo, el efecto del TGF- β 1 producido por las células tumorales en los PC del MT no se había examinado previamente. Para evaluar más a fondo si la vía de señalización de TGF- β es activada en los PC por el TGF- β 1 producido por las células HCT 116, se estudió la activación de SMAD3 en PC cocultivados. Y efectivamente, en cocultivos de 48 horas, se demuestra mediante IF la translocación nuclear de SMAD3 en los PC (**Fig. 35.a**). Además, se demostró que el tratamiento de PC con MC de HCT 116 induce la fosforilación de SMAD3 de igual manera que el tratamiento con TGF- β 1 exógeno (10 ng/ml), según se evaluó por WB (**Fig. 35.b**). Por otro lado, al estimular PC con TGF- β 1 exógeno (10 ng/ml), éstos sobreexpresan α -SMA, ocurriendo lo mismo en cocultivo con células HCT 116 (**Fig. 35.c**). Esto

sugiere una activación del PC y una posible transición a miofibroblasto equivalente a la observada en CAF tratados con TGF- β .

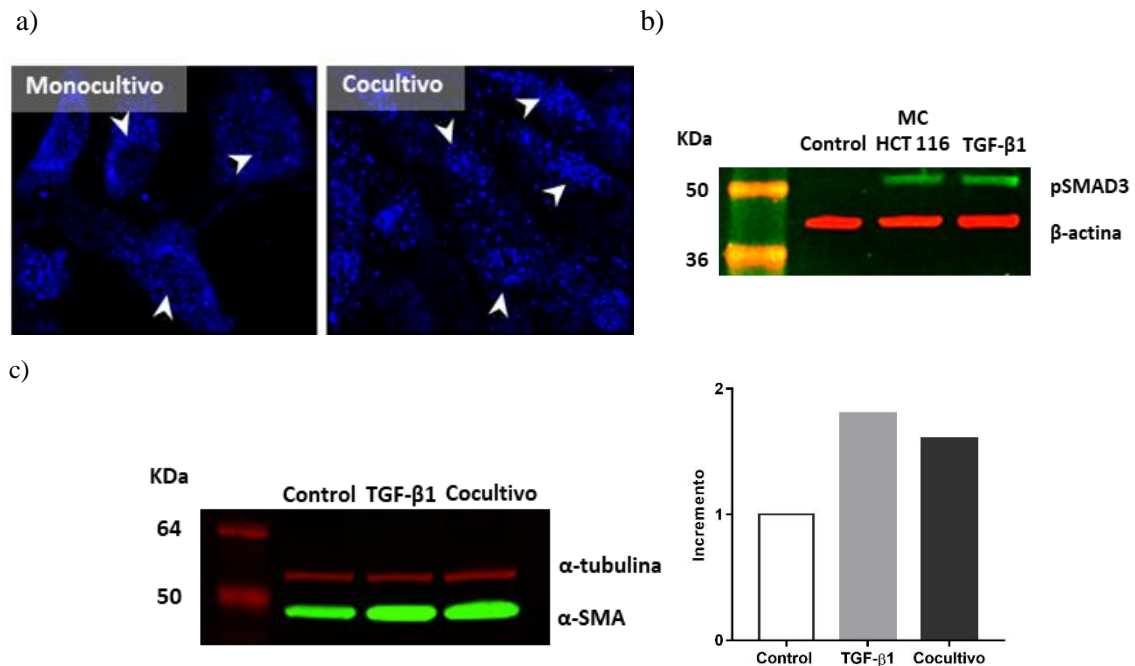


Figura 35. Efecto de las células HCT 116 sobre la fosforilación de SMAD3 y la expresión de α -SMA en pericitos. a) Imágenes de microscopía confocal que muestran la localización subcelular de SMAD3 en pericitos cultivados de forma aislada (panel izquierdo) o cocultivos con células HCT 116 (panel derecho). En el primer caso, SMAD3 se detecta en el citoplasma de pericitos (las puntas de flecha muestran los núcleos no teñidos). En los cocultivos, las puntas de flecha indican núcleos teñidos, translocación nuclear de SMAD3 (Aumento \times 400). b) El MC de las células HCT 116 induce la fosforilación de SMAD3 en pericitos. Se utilizó TGF- β 1 recombinante exógeno (10 ng/ml) como control positivo y β -actina como control de carga. c) Expresión de α -SMA en pericitos cocultivos con células HCT 116. Se utilizó TGF- β 1 recombinante exógeno (10 ng/ml) como control positivo y α -tubulina como control de carga.

Según los resultados de los *microarrays* de ADN, el ARNm de *TGFBI* se sobreexpresa en PC después del cocultivo con HCT 116. Para analizar con precisión el papel de TGF- β 1 en la relación tumor-pericito, se cuantificó el TGF- β 1 secretado en los MC de HCT 116 y PC en monocultivo o en cocultivo de acuerdo con el esquema mostrado en la **figura 36.a**. En monocultivo, ambos tipos celulares secretaron niveles bajos de TGF- β 1 (**Fig. 36.b**). Se observó un aumento significativo en la secreción de TGF- β 1 por las células HCT 116 cuando se cultivó junto a PC (**Fig. 36.b**). Sin embargo, este aumento fue mucho mayor en los PC cocultivos con células HCT 116, contribuyendo con la mayor parte de TGF- β 1 secretado en el entorno del cocultivo (**Fig. 36.b**).

a)



b)

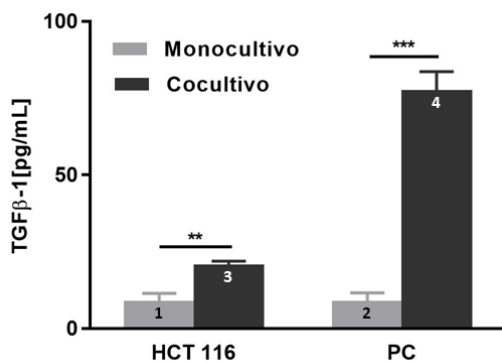


Figura 36. Secreción de TGF- β 1 por pericitos y células HCT 116 en monocultivo y cocultivo. a) Esquema del cultivo de pericitos y células HCT 116 para la obtención de los MC. b) Cuantificación de la secreción de TGF- β 1 por parte de pericitos y células HCT 116 en monocultivos y cocultivos durante 48 horas. Los resultados representan tres ensayos independientes (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

2.5. Análisis del secretoma de pericitos tratados con TGF- β 1

Los datos mostrados anteriormente sugieren que el TGF- β 1 producido por las células HCT 116 induce la producción de TGF- β 1 por parte de los PC y la activación de esta vía de señalización, que en última estancia podría proporcionar a las células HCT 116 una ventaja de supervivencia, tanto *in vivo* como *in vitro*. Para analizar las vías moleculares potencialmente implicadas en esta interacción, el secretoma de PC tratados con 10 ng/ml TGF- β 1 exógeno durante 48 horas fue comparado con el de PC no estimulados. Para ello, se utilizaron *arrays* de anticuerpos inmovilizados en membrana y se identificó un panel de citoquinas y quimioquinas secretadas por los PC tratados con TGF- β 1. Como se observó anteriormente en PC cocultivos con HCT 116 en los *microarrays* de ADN, el PC tratado con TGF- β 1 pone en marcha un programa angiogénico, que incluye la sobreexpresión de VEGF, PDGF-AA y angiogenina (**Fig. 37**). Entre los factores no angiogénicos identificados en los *arrays* de anticuerpos se encuentran IL-6, IL-11 y LIF (**Fig. 37**), de los que se sabe que promueven el fenotipo CSC y quimiorresistencia mediada por la fosforilación de STAT3.

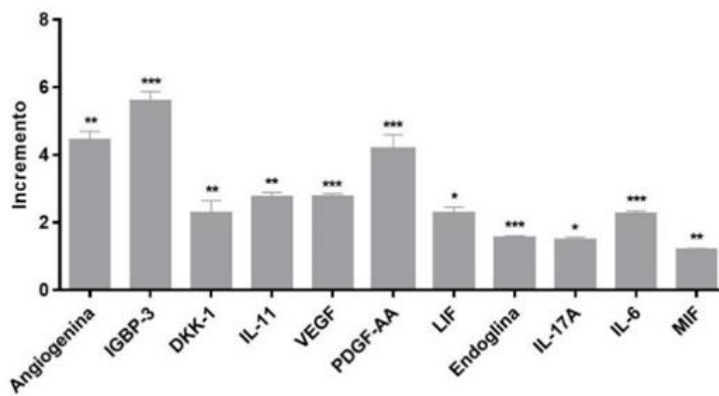
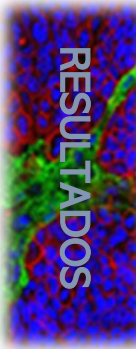
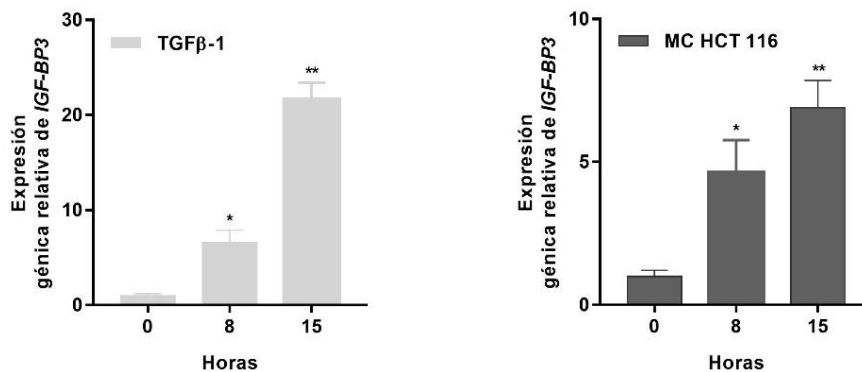


Figura 37. Secretoma de pericitos tratados con TGF-β1. Detección semicuantitativa de citoquinas y quimioquinas en los medios condicionados de pericitos tratados con 10 ng/ml de TGF-β1 durante 48 horas en comparación a los pericitos control no tratados. Los resultados representan tres experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Con el fin de abordar la relevancia clínica de este panel de citoquinas y factores solubles en el contexto del CCR, se recurrió a la base de datos *The Pathology Atlas* (Human Protein Atlas, www.proteinatlas.org) (Uhlen et al., 2017) para conocer la asociación de cada uno de ellos con la supervivencia de los pacientes. De acuerdo con esta base de datos, sólo la proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-BP3) fue un marcador de pronóstico desfavorable en el CCR (Log-rank P value = 1.08e-4). Curiosamente, IGF-BP3 era la molécula más sobreexpresada en PC tratados con TGF-β1 (Fig. 37), siendo su expresión prácticamente nula en HCT 116 según el *Expression Atlas - EMBL-EBI* (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) y los datos de *microarrays* de ADN previos.

Para analizar más a fondo el papel de IGF-BP3 en este contexto, primero se evaluó por qRT-PCR la expresión de *IGF-BP3* en PC tratados con TGF-β1 (10 ng/ml) y con MC de HCT 116, usando DMEM 1% FCS como control negativo. Con ambos estímulos se observó una sobreexpresión de *IGF-BP3* que era más evidente a tiempos más largos de incubación (Fig. 38.a). Consistentemente, la regulación positiva de *IGF-BP3* se inhibió con el anticuerpo neutralizante anti-TGF-β 1D11 (5µg/ml) y el inhibidor del receptor TGF-β-RI- SB431542 (5µg/ml) (Calbiochem, # 616461#), siendo el efecto más acusado con este último (Fig. 38.b).

a)



b)

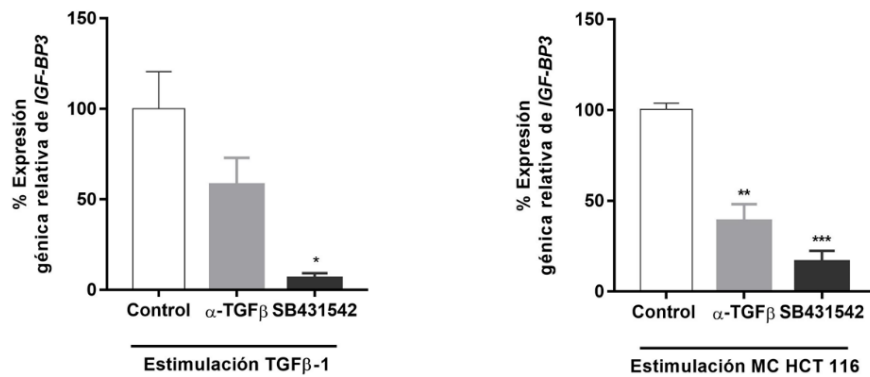


Figura 38. TGF-β1 induce la expresión de IGF-BP3 en pericitos humanos. a) Expresión de ARNm de IGF-BP3, determinada por qRT-PCR en pericitos tratados con DMEM 1% FCS (control), TGF-β1 (10 ng/ml) o MC de HCT 116 durante los períodos de tiempo indicados. b) Expresión de ARNm de IGF-BP3 en pericitos tratados con TGF-β1 (10 ng/ml) o MC de HCT 116 en ausencia o presencia de 5 μg/ml del anticuerpo anti-TGF-β 1D11 o 5 μg/ml del antagonista de ALK5 (SB431542). La expresión relativa de ARNm de IGF-BP3 se normalizó con respecto a la de SDHA en los mismos extractos celulares. Los resultados representan tres experimentos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

2.6. Efecto *in vitro* de IGF-BP3 sobre las propiedades tumorigénicas y *stem* de las células HCT 116

Posteriormente, se analizó el posible efecto del IGF-BP3 en las características tumorigénicas y propiedades *stem* de las células HCT 116 moduladas por los PC en cocultivo. En primer lugar, se testó el efecto en proliferación, migración e invasión de las células HCT 116 añadiendo IGF-BP3 recombinante exógeno (50 ng/ml). El efecto sobre la proliferación de las células HCT 116 fue modesto, aunque significativo. Como se ha descrito que IGF-BP3 actúa de forma sinérgica con EGF en la proliferación de células de cáncer de mama, se probó la combinación de ambos sin detectar un aumento en la capacidad proliferativa de las células HCT 116 (**Fig. 39.a**). Sin embargo, IGF-BP3 promovió de forma significativa la migración de las células HCT 116, efecto que revirtió a niveles casi basales tras la incubación con un anticuerpo neutralizante anti-IGF-BP3 (**Fig. 39.b**). Este efecto fue aún más llamativo en lo que se refiere a invasión de las células HCT 116, solo ligeramente por debajo del observado con el cocultivo con PC (**Fig. 39.c**). Ya que el aumento en la migración de las células tumorales se suele asociar a transición epitelio-mesénquima (TEM), se decidió analizar la expresión de N-Cadherina, un marcador clásico de TEM. Cuando las células HCT 116 son estimuladas con IGF-BP3 (50 ng/ml) durante 72 horas, la expresión de N-Cadherina aumenta (**Fig. 39.d**), lo que sugiere un posible papel de IGF-BP3 en la TEM de las células HCT 116 que iría asociado al incremento de su actividad migratoria e invasiva.

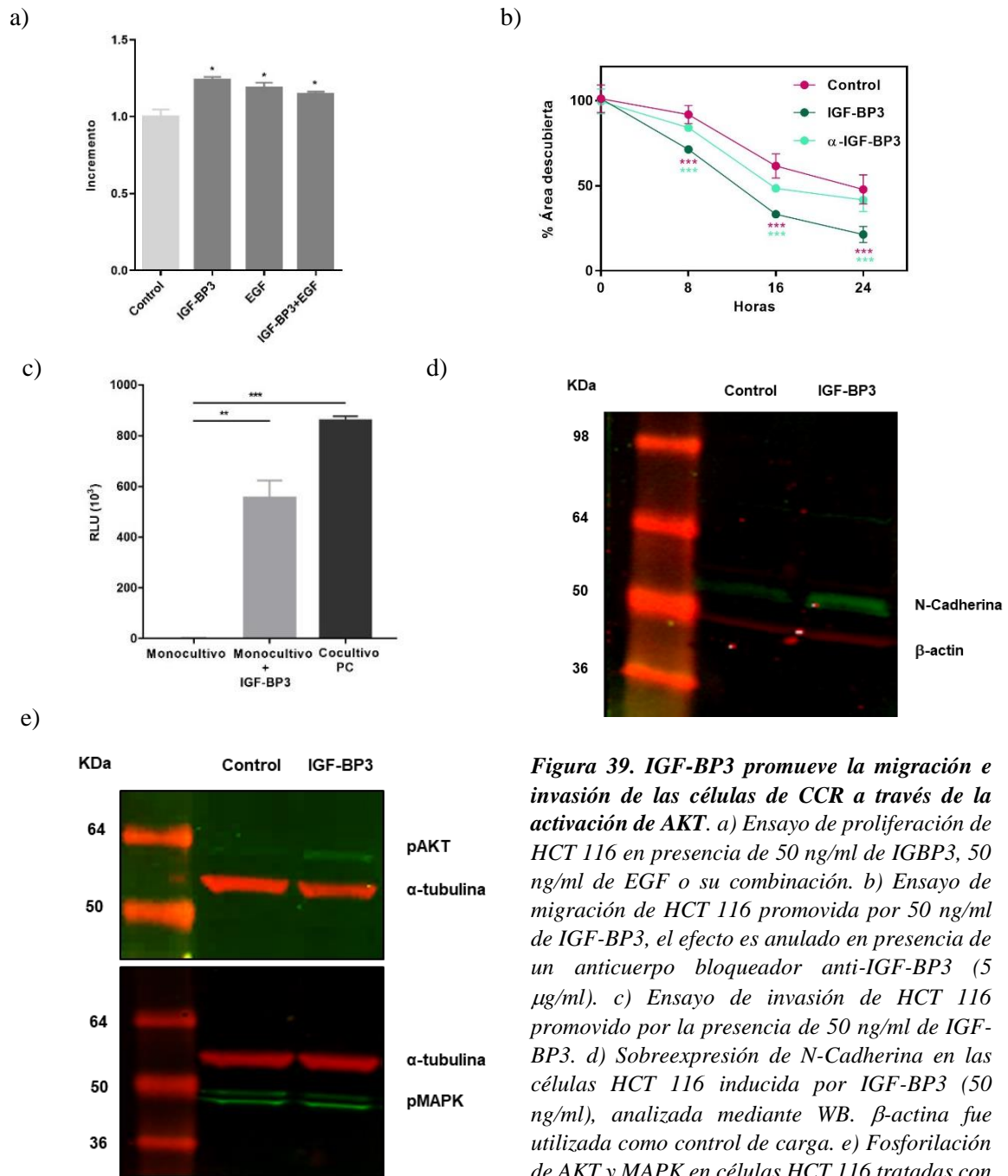


Figura 39. IGF-BP3 promueve la migración e invasión de las células de CCR a través de la activación de AKT. a) Ensayo de proliferación de HCT 116 en presencia de 50 ng/ml de IGBP3, 50 ng/ml de EGF o su combinación. b) Ensayo de migración de HCT 116 promovida por 50 ng/ml de IGF-BP3, el efecto es anulado en presencia de un anticuerpo bloqueador anti-IGF-BP3 (5 μ g/ml). c) Ensayo de invasión de HCT 116 promovido por la presencia de 50 ng/ml de IGF-BP3. d) Sobreexpresión de N-Cadherina en las células HCT 116 inducida por IGF-BP3 (50 ng/ml), analizada mediante WB. β -actina fue utilizada como control de carga. e) Fosforilación de AKT y MAPK en células HCT 116 tratadas con 50 ng/ml de IGF-BP3 durante 15 minutos. a) b) y c) se corresponden con tres ensayos independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Como el aumento de dicha actividad se ha asociado a las vías de señalización de AKT y MAPK, su estado de fosforilación fue analizado tras el estímulo de las células HCT 116 con IGF-BP3 (50 ng/ml) durante 15 minutos, observándose la fosforilación de AKT, pero no de MAPK (Fig. 39.e).

Posteriormente, se analizó el efecto del IGF-BP3 en las propiedades CSC de las células HCT 116. En primer lugar, se analizó si la expresión de *NANOG* se modificaba en presencia de

IGF-BP3 en colonoesferas igual que ocurría en presencia de MC de PC. Tras estimular las colonoesferas con 50 ng/ml de IGF-BP3 exógeno durante 5 días, la expresión génica de *NANOG* se vio incrementada casi seis veces en comparación con su expresión basal (**Fig. 40a**). Sin embargo, el efecto de IGF-BP3 sobre la formación de colonoesferas fue limitado, aunque estadísticamente significativo (**Fig. 40.b**), similar al observado en quimiorresistencia frente a 5-FU (**Fig. 40.c**).

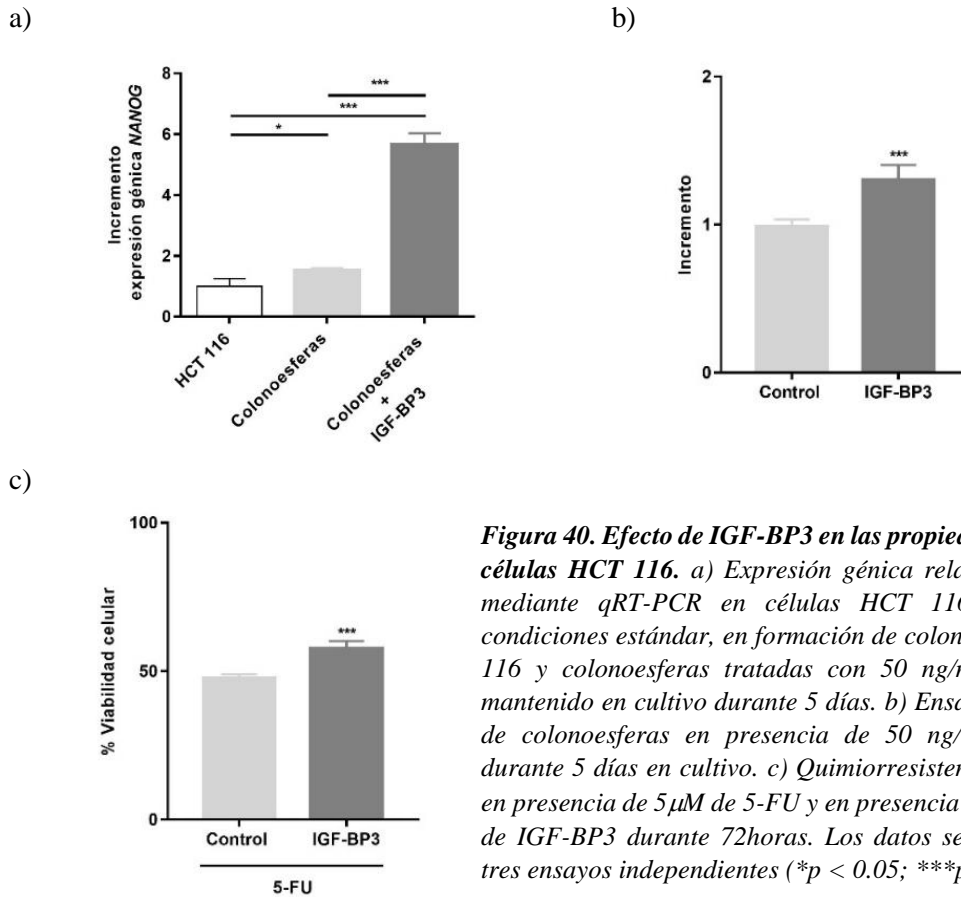
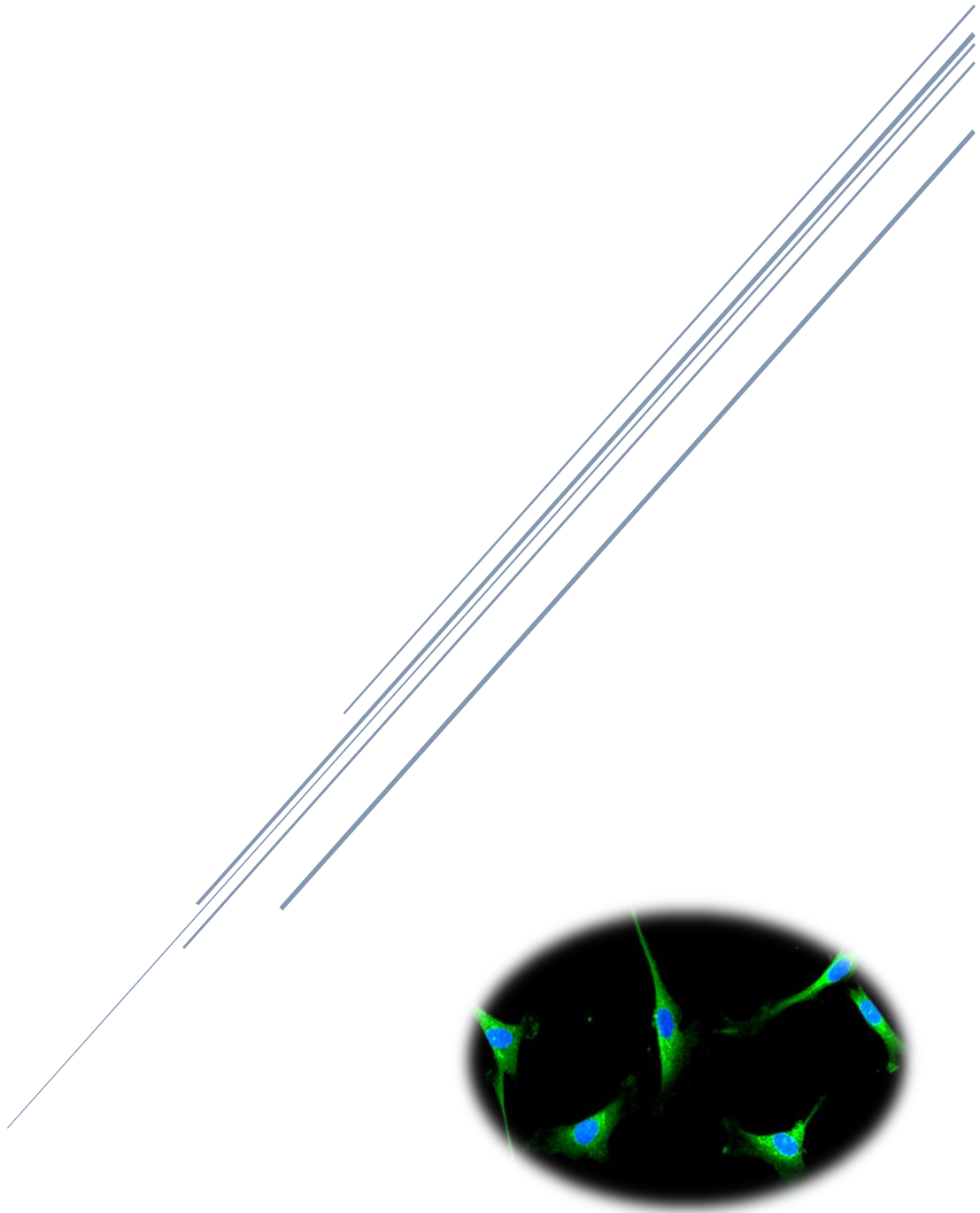


Figura 40. Efecto de IGF-BP3 en las propiedades stem de las células HCT 116. a) Expresión génica relativa de *NANOG* mediante qRT-PCR en células HCT 116 cultivadas en condiciones estándar, en formación de colonoesferas de HCT 116 y colonoesferas tratadas con 50 ng/ml de IGF-BP3, mantenido en cultivo durante 5 días. b) Ensayo de formación de colonoesferas en presencia de 50 ng/ml de IGF-BP3 durante 5 días en cultivo. c) Quimiorresistencia de HCT 116 en presencia de 5 μ M de 5-FU y en presencia o no de 50 ng/ml de IGF-BP3 durante 72 horas. Los datos se muestran como tres ensayos independientes (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Los resultados muestran un papel importante del microambiente tumoral en el desarrollo del CCR existiendo un *crossstalk* entre ambas partes, en concreto, de los PC como parte de este microambiente. La comunicación entre PC y células HCT 116 induce la producción de TGF- β 1 por parte de los PC que a su vez tiene una retroalimentación positiva sobre el propio PC poniendo en marcha su vía de señalización. Esta activación tiene como resultado la secreción de numerosas citoquinas y quimioquinas por parte del PC que actúan sobre las características tumorigénicas y propiedades *stem* de las células HCT 116. En concreto, se ha demostrado un papel importante de IGF-BP3 sobre las características migratorias e invasivas de este tipo celular a través de la fosforilación de AKT en las células HCT 116.

DISCUSIÓN



1. PERICITO, NUEVAS PERSPECTIVAS EN LA INMUNIDAD INNATA.

Hasta hace apenas unos años, el papel del PC estaba básicamente limitado a funciones estructurales debido a su localización en los vasos sanguíneos en íntima relación con las CE. Se les atribuía funciones restringidas a la angiogénesis, homeostasis vascular, contractilidad y regulación del flujo sanguíneo, maduración y estabilización de los vasos (Bergers and Song, 2005).

En nuestro laboratorio siempre ha habido un especial interés en demostrar el papel funcional del PC más allá de su interacción con la CE, en el contexto de la respuesta inflamatoria como célula inmune innata “no profesional” y en el de la modulación del microambiente tumoral desde un punto de vista tanto “angiocrino” como inmunológico.

Los PC humanos ocupan una posición estratégica en la interfaz entre la sangre y los tejidos para iniciar procesos inflamatorios como respuesta sistémica a una infección o a PAMP circulantes en el torrente sanguíneo. Estudios muy tempranos atribuyeron a los PC propiedades fenotípicas y funcionales características de monocitos o macrófagos (Balabanov et al., 1996), incluso se llegaron a considerar como células presentadoras de antígeno que participaban junto a los linfocitos en primera línea de defensa en la respuesta inmune. En la actualidad, estos hallazgos son objeto de controversia ya que la caracterización de estos supuestos PC podría no haber sido tan fina como sería hoy en día gracias a los avances en los estudios sobre este tipo celular (Krueger and Bechmann, 2010). Además, apenas ha habido estudios modernos sobre el papel del PC en la respuesta inmune hasta fechas recientes. Sin embargo, en cuanto a estudios sistemáticos sobre la expresión de PRRs en este tipo celular apenas existían hasta hace poco tiempo.

En 2014, se describió en el laboratorio la expresión de TLR4 en PC humanos y se analizó el perfil transcripcional de PC tratados con LPS. Hasta entonces sólo existían cuatro estudios que describían (en tres casos, de forma tangencial) la respuesta a LPS por parte de PC murinos (Edelman et al., 2007a, 2007b, 2006b; Kovac et al., 2011). Por el contrario, existían numerosos trabajos sobre la implicación de las CE en el desarrollo de los procesos inflamatorios (Danese et al., 2007). La CE activada en respuesta a diversos estímulos es capaz de secretar numerosas citoquinas y quimioquinas que ayudan a potenciar las respuestas inflamatorias (Mai et al., 2013). Los mecanismos de respuesta endoteliales a LPS en concreto se caracterizan por la secreción de citoquinas, una regulación positiva de moléculas de adhesión (que favorecen el reclutamiento leucocitario) y la expresión de moléculas MHC-II, actuando como célula presentadora de antígeno (Heidemann et al., 2006; Speyer and Ward, 2011).

Aunque el LPS es el componente más conocido de la pared de las bacterias Gramnegativas, no es el único, ya que también contienen PGN (Caruso et al., 2014), cuyo reconocimiento citoplasmático está mediado por NOD1 y NOD2 (Gatheral et al., 2012).

Teniendo esto en cuenta, nos planteamos si la activación del PC por la preparación estándar de LPS utilizada en el trabajo del 2014 podría estar mediada también por PGN copurificados durante el proceso de extracción. Un problema recurrente en este campo es que diferentes componentes de la pared bacteriana se pueden unir entre sí de forma covalente y acabar contaminando preparaciones comerciales de PAMPs en principio “puras”. Esto ha ocurrido hasta el punto de que ciertas preparaciones de LPS que contenían lipoproteínas o PGN llevaron a proponer erróneamente que el receptor de LPS era TLR2 (Yang et al., 1998) o NOD1 (Inohara et al., 2005), respectivamente. Para profundizar en esta línea y dado que los datos obtenidos de *microarrays* de ADN sugerían que la expresión génica de TLR2 en PC era mínima, nos centramos en estudiar NOD1. Para demostrar de forma inequívoca si la activación de PC por LPS que habíamos descrito anteriormente estaba mediada realmente por TLR4 o se debía a PGN contaminantes, o incluso a ambos, nos propusimos estudiar la expresión de los receptores NOD en PC, comprobar su capacidad de respuesta a PGN libres de endotoxina, y compararla con el efecto de una preparación de LPS ultrapuro libre de PGN.

Nuestros resultados describen por primera vez la expresión funcional del receptor NOD1 en PC humanos y su capacidad de respuesta a un análogo de PGN, el C12-iE-DAP. Comprobamos que tanto la vía de señalización de NOD1 como la de TLR4 son funcionalmente activas e independientes, como se demostró mediante inhibición farmacológica de RIPK2, mediador clave en la ruta de NOD1. También observamos que existe una sinergia entre esta vía de NOD1 y la de TLR4, solo descrita previamente en monocitos y células dendríticas (Selvanantham et al., 2013). Aunque el efecto de C12-iE-DAP en PC es comparativamente menor que el del LPS ultrapuro, la estimulación de PC con dosis subóptimas de ambos promueve un aumento en la expresión de *IL8* superior al observado con una dosis de LPS veinte veces mayor. Esto no es sorprendente dado que la señalización de NLR y TLR converge en vías comunes que incluyen la activación de NF- κ B y de MAPK, potenciando así la respuesta inflamatoria.

Recientemente, se ha demostrado la activación de PC por factores proinflamatorios liberados por células inmunes “profesionales” como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (Jansson et al., 2014; Pieper et al., 2014). De hecho, la expresión de NOD1 en PC aumenta cuando se estimulan con TNF- α e IFN- γ como se ha comprobado en este estudio. Pero, más allá del rol pasivo en la amplificación de respuestas inflamatorias, la expresión funcional de PRRs revela que los PC están dotados de capacidad de detección de PAMPs, contribuyendo directamente al inicio de la respuesta inmune innata.

2. PERICITO, NUEVO PROTAGONISTA DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

El componente inflamatorio crónico si se mantiene en el tiempo puede llegar a dañar los tejidos y preceder a otros tipos de enfermedades como el cáncer (Hussain and Harris, 2007). Incluso hay estudios que han demostrado que los tumores sólidos contienen un microambiente inflamatorio en ausencia de inflamación crónica (Quante et al., 2013). En este contexto, el papel del PC ha sido aún menos estudiado y debido a su localización en los vasos sanguíneos y por tanto vasos tumorales, podría tener una función importante en la regulación de la progresión de la enfermedad como célula participante en la regulación de la respuesta inmune e incluso como regulador directo de la progresión tumoral.

Numerosos estudios demuestran que las células tumorales explotan su microambiente, instruyendo a las células normales de su entorno inmediato, para favorecer su crecimiento y diseminación (Bussard et al., 2016; Dvorak et al., 2011; Hui and Chen, 2015). Los factores proangiogénicos liberados por las células tumorales inducen la neovascularización, y a su vez, las células que constituyen los vasos proporcionarían factores angiocrinos favoreciendo la progresión tumoral, mecanismo apenas estudiado en el caso de los PC (Calabrese et al., 2007; Charles and Holland, 2010).

De hecho, las CE han sido consideradas casi en exclusiva las productoras de factores angiocrinos en el MT y las principales protagonistas del llamado nicho vascular, obviando el hecho de que por su disposición en la cara abluminal del endotelio, son los PC las células mejor posicionadas para interactuar con las células tumorales. Sin embargo, diferentes circunstancias han hecho que su papel en este contexto haya sido infravalorado y se reduzca al de la estabilización de la vasculatura tumoral. Por este motivo, y dado nuestro interés en ampliar los conocimientos sobre este tipo celular, decidimos analizar la función del PC en el MT utilizando como modelo el CCR.

Para estudiar el posible efecto paracrino de los PC sobre células de CCR se desarrolló un sistema de cocultivo sin contacto, observando como los PC eran capaces de promover la proliferación, migración e invasión de las líneas de CCR HCT 116 y HT-29. De esta manera, demostramos por primera vez un papel activo del PC en la progresión tumoral, al menos *in vitro*. La relevancia *in vivo* de estos resultados fue verificada posteriormente en ratones atímicos desnudos, donde la coimplantación de PC y células HCT 116 promovió de forma significativa el crecimiento tumoral con respecto a las células HCT 116. En los tumores resecaados, sin embargo, no se observaron diferencias en el número de células α -SMA⁺, lo que parecía sugerir que los PC humanos ya habían sido sustituidos en ese momento por células del huésped. Este fenómeno ya se había observado anteriormente con las CE en xenoinjertos primarios de CCR (Sanz et al., 2009). Todo ello sugería que el efecto observado de los PC en la progresión tumoral ocurría en fases iniciales tras la inoculación en el animal. En un trabajo de otro grupo se había documentado

que la inoculación de CAF junto con células de CCR favorecía su implantación (Calon et al., 2015), pero no afectaba después al crecimiento tumoral. Para comprobar si esto ocurría en nuestro modelo utilizamos células HCT 116 modificadas genéticamente para la expresión de luciferasa, que nos permitían seguir su evolución *in vivo* mediante técnicas de imagen molecular antes de que los tumores fueran visibles. Y efectivamente, la presencia de PC duplicaba el número de tumores con emisión de luz detectable en los primeros días tras la inoculación, demostrando un efecto temprano que proporcionaba una ventaja luego mantenida en el tiempo.

Según una teoría muy extendida, los tumores contienen una subpoblación de células encargadas de su mantenimiento, caracterizadas por su mayor resistencia a la quimioterapia, capacidad de autorrenovación y diferenciación, conocidas como CSC (Batlle and Clevers, 2017; Wahab et al., 2017). Uno de los marcadores más utilizados para su identificación en numerosos tipos de cáncer es el ALDH1 (Jiang et al., 2009; Wahab et al., 2017), cuya expresión se asocia a estadios avanzados y al mal pronóstico en pacientes de CCR (Wahab et al., 2017). En nuestro modelo de cocultivo con PC se induce un incremento significativo del porcentaje de células HCT 116 ALDH1⁺, sugiriendo que los PC también tienen un papel en la modulación de las características *stem* de esta línea celular. Del mismo modo, hemos demostrado que los PC incrementan la formación de colonoesferas y la expresión del marcador de CSC, *NANOG*, fenómeno no descrito previamente en PC, aunque sí en MSC en un modelo de osteosarcoma (Cortini et al., 2016).

El estroma tumoral es también capaz de favorecer la resistencia a la quimioterapia por mecanismos no relacionados directamente con las CSC, como la barrera física y a través de la secreción de diferentes moléculas que modifican las células tumorales a resistentes. En adenocarcinoma de pulmón, los CAF confieren quimiorresistencia a las células tumorales a través de la secreción de IL-11, que activa la vía de señalización de STAT3 enviando señales antiapoptóticas (Tao et al., 2016). Este aumento de la quimiorresistencia también tiene lugar a través de la secreción de IL-6 por parte de los CAF, involucrando fenómenos de transición epitelio-mesenquimal (Shintani et al., 2016). Sin embargo, los PC tampoco habían sido estudiados en este contexto hasta la fecha. Aquí demostramos un aumento significativo de la supervivencia de las células HCT 116 tratadas con 5-FU en presencia de PC que podía deberse tanto a su efecto sobre las CSC como a la producción de factores inhibidores de muerte celular.

Los resultados anteriores sugerían que las células de CCR “instruían” de alguna forma a los PC para que éstos liberaran factores paracrinos que a su vez promovían sus propiedades tumorigénicas y *stem*.

Para estudiar cómo las células tumorales modificaban la expresión génica de los PC, se analizó el perfil transcripcional de PC en cocultivo con células HCT 116 mediante *microarrays* de ADN. Se obtuvo una firma molecular de cerca de 300 genes diferencialmente expresados con

respecto a los PC en monocultivo. El uso de herramientas de análisis de la ontología génica reveló un enriquecimiento significativo en genes implicados en el proceso angiogénico, lo que no resulta sorprendente, ya que las células tumorales reclutan y activan tanto a PC como a CE para la formación de nuevos vasos. Pero, además, hemos identificado las vías de señalización de TGF- β y Notch como parte del programa transcripcional del PC tumoral, lo que puede tener importantes implicaciones biológicas. De hecho, esta firma molecular comparte numerosos genes con la firma de respuesta a TGF- β (*TBR5*) descrita en otros tipos de células estromales de CCR (CAF, CE, células T y macrófagos) por otro grupo (Calon et al., 2012), lo que sugiere un programa común que no había sido descrito previamente en PC. Es más, observamos que esta firma génica tiene relevancia clínica. Cuando estudiamos su valor predictivo en un grupo de casi 300 pacientes de CCR, observamos que dicha firma génica constituye un buen predictor de recaída en pacientes con CCR.

Estos resultados están en concordancia con un estudio en el que se analizaron genes asociados con un mal pronóstico en muestras de CCR en el que las células epiteliales y las estromales se diseccionaron mediante captura con láser para analizarlas de manera aislada. En este análisis se observó que los genes asociados a la recurrencia de la enfermedad, así como los genes sobreexpresados para pronóstico desfavorable en pacientes, fueron los que estaban sobreexpresados en el estroma tumoral y no en el área epitelial del tumor (Calon et al., 2015). Ambos trabajos demostrarían que la expresión génica del estroma tumoral tiene un papel importante en el mal pronóstico de pacientes de CCR.

Las células de CCR producen TGF- β pero, de manera paradójica, en muchos casos no pueden responder a él, ya que la inactivación mutacional de la vía de señalización de TGF- β es clave durante la progresión del CCR. De hecho, las células HCT 116 utilizadas en nuestro modelo experimental tienen una mutación inactivadora en el gen *TGFBR2* (MUÑOZ et al., 2008), por lo que no podrían responder de forma autocrina al TGF- β secretado por ellas mismas. No obstante, el TGF- β derivado del tumor puede tener un impacto profundo en diferentes tipos de células estromales como se ha observado en las diferentes firmas génicas estromales asociadas a TGF- β con valor pronóstico anteriormente señaladas. En el trabajo de *Calon et al.*, (Calon et al., 2012), se detectó p-SMAD3, mediador de la ruta TGF- β , en diferentes tipos de células estromales de CCR, incluidas las células T, macrófagos, CE y fibroblastos. Igualmente, los PC de nuestro estudio ya fueran cocultivados con células HCT 116, tratados con el medio condicionado de éstas o tratados con TGF- β 1 exógeno, fosforilan SMAD3, demostrando que la vía está activa en este tipo celular. En los *microarrays* de ADN, uno de los genes sobreexpresados por los PC en cocultivo con las células de CCR era el propio *TGFBI*, y el incremento significativo de su expresión a nivel de proteína fue confirmada también usando un inmunosensor amperométrico

para la cuantificación de TGF- β 1. De este modo demostramos la existencia de un bucle autocrino de secreción de TGF- β 1 por los PC cocultivados con células de CCR, efecto observado también en un estudio realizado con CAF (Hawinkels et al., 2014). Hay que considerar que este TGF- β 1 podría contribuir a la activación no solo de los propios PC sino de otras células estromales en el microentorno del tumor.

Para analizar los mecanismos por los que los PC activados favorecían la progresión tumoral, observamos el secretoma de PC tratados con TGF- β 1 utilizando *arrays* de anticuerpos, identificando 11 factores solubles cuya liberación al sobrenadante se incrementaba de forma estadísticamente significativa. Entre ellos, aparecen de nuevo factores proangiogénicos como VEGF, PDGF-AA y angiogenina, resultado esperable dada la conocida implicación del PC en el programa de angiogénesis tumoral (De Palma et al., 2017). Además, encontramos citoquinas cuyo papel en cáncer ha sido muy estudiado como IL-6, IL-11 y LIF que comparten señalización a través de STAT3. La secreción de IL-11 por parte de CAF estimulados con TGF- β desencadena la vía de señalización de GP130/STAT3 en células CCR, incrementando la supervivencia de células metastásicas (Calon et al., 2012). Por su parte, la IL-6 secretada por MSC, aumenta la capacidad proliferativa y la migración de células HCT 116 (Lin et al., 2013) y células de osteosarcoma (Cortini et al., 2016). En cuanto a LIF, su implicación en tumorigénesis y metástasis en varios tipos de cáncer como el de mama ha sido evaluado (Li et al., 2014). En CCR, LIF se asocia con un mal pronóstico (Yu et al., 2014), siendo su sobreexpresión causante de la quimiorresistencia en células HCT 116 *in vitro* e *in vivo* (Yu et al., 2014). En cáncer oral, LIF producido por los CAF también tiene un papel importante en la progresión del cáncer, promoviendo las capacidades migratorias e invasivas de las células cancerosas (Ohata et al., 2018).

Además de los efectos directos sobre las células tumorales, el compartimento estromal puede contribuir indirectamente a la progresión del tumor al apoyar el desarrollo de un entorno inmunosupresor que facilita el escape del tumor del control inmune. De hecho, se ha propuesto un papel de los propios PC en la modulación de la respuesta inmune antitumoral que podría implicar, entre otros, la expresión de PD-L1 y PD-L2 y la secreción de NO y PGE2 (Navarro et al., 2016; Turley et al., 2015). En esta ocasión, no hemos abordado el efecto del PC y TGF- β derivado de PC en la respuesta inmune antitumoral, ya que utilizamos un modelo de ratones inmunodeficiente. Sin embargo, los efectos inmunosupresores de TGF- β son ampliamente conocidos. Recientemente, se ha demostrado que el aumento de TGF- β en el microentorno del CCR representa un mecanismo primario de evasión inmunológica que promueve la exclusión de células T del tumor (Tauriello et al., 2018). Se podría especular que la amplificación de TGF- β por los PC podría contribuir a este microambiente inmunosupresor. Por su parte, DKK1, otra de las moléculas inducidas por TGF- β 1 en PC según los *arrays* de anticuerpos, tiene también un

papel en la modulación de la respuesta inmunitaria. Se ha documentado que su expresión por las células del estroma promueve la acumulación de MDSC durante la progresión del tumor, inhibiendo la respuesta antitumoral de células T (D'Amico et al., 2016). En cuanto a su relevancia en clínica, se ha sugerido que DKK1 es un biomarcador de quimiorresistencia y mal pronóstico en CCR (Aguilera et al., 2015).

La molécula con el mayor incremento de expresión en los PC tratados con TGF- β 1 de acuerdo con los *arrays* de anticuerpos era IGF-BP3, una molécula además mucho menos estudiada en el contexto del MT que las anteriormente señaladas. De especial relevancia es el hecho de que se trata de la única de las once moléculas observadas cuya expresión en CCR es un marcador de pronóstico desfavorable, de acuerdo con el *Human Protein Atlas*. Por ello, la última parte de este trabajo se dedicó a analizar su implicación en nuestro modelo de *crossstalk* entre PC y células de CCR.

IGF-BP3 tiene un papel controvertido en cáncer dependiendo del contexto, en algunos trabajos se le ha propuesto un papel inhibidor (Johnson and Firth, 2014; Naspi et al., 2017) y su baja expresión se asocia a un mal pronóstico como en pacientes con cáncer de esófago (Song et al., 2016). Por el contrario, su sobreexpresión también se ha relacionado con un mal pronóstico en carcinoma nasofaríngeo (Bao et al., 2016) y en CCR (Chan et al., 2018). Entre los genes expresados diferencialmente en CAF *versus* fibroblastos de mucosa normal en CCR se han identificado varios miembros de la familia IGFBP, incluyendo IGFBP3, IGFBP5 e IGFBP7 (Rupp et al., 2015). En ese trabajo, se propuso IGFBP7 como un nuevo marcador de células de estroma tumoral (incluidos PC) con efectos promotores del crecimiento en CCR. En cáncer de próstata se determinó que la mayor fuente de IGF-BP3 era estromal, y se le atribuyó un papel como mediador para las interacciones tumor-estroma (Massoner et al., 2008). Recientemente, se ha verificado su sobreexpresión en el estroma tumoral de cáncer de próstata mediante un perfil global de expresión génica a través de la microdissección con captura láser (Gregg et al., 2010) y *RNA-seq* en CCR (Knight, *Physiol Genomics* 2016). Así mismo, se ha documentado que IGF-BP3 es sobreexpresado por CAF en cáncer de mama, y se le ha relacionado con la progresión tumoral (Vastrad et al., 2018).

Para comprobar si IGF-BP3 tenía algún papel en los efectos observados de PC sobre las células HCT 116, se realizaron estudios de proliferación, migración, invasión, formación de colonoesferas y quimiorresistencia en presencia de IGF-BP3 exógeno. Previamente, se confirmó que el tratamiento con TGF- β 1 exógeno y/o el medio condicionado de células HCT 116 incrementaba la expresión de *IGF-BP3* en PC, y este aumento era revertido por un anticuerpo bloqueante anti-TGF- β o tras el uso de un inhibidor farmacológico de la ruta. Se comprobó que IGF-BP3 favorecía de forma significativa la capacidad migratoria e invasiva de las células HCT 116, y este efecto era revertido por un anticuerpo bloqueante anti-IGF-BP3. Este dato corrobora

estudios previos de carcinoma nasofaríngeo y carcinoma de células escamosas donde IGF-BP3 inducía la migración de las células tumorales (Bao et al., 2016; Yen et al., 2015). La estimulación con IGF-BP3 aumentó de forma significativa la expresión de *NANOG*, aunque el efecto sobre la formación de colonoesferas y la quimiorresistencia fue menor que el observado en cocultivo con PC.

Sin poder descartar la implicación de factores solubles no representados en los *arrays* de anticuerpos, la IL-6 es un buen candidato para explicar los efectos observados que implican potencialmente a las CSC (sobre los que IGF-BP3 tiene una influencia menor) ya que existen numerosos estudios que demuestran su implicación en la modulación de CSC y quimiorresistencia. La IL-6 secretada por CE en cáncer de cabeza y cuello aumenta el número de CSC, favorece su supervivencia y sus propiedades *stem* además de potenciar su capacidad de iniciación tumoral a través de la vía de señalización de STAT3 (Krishnamurthy et al., 2014). Por otro lado, en CCR los CAF son una de las mayores fuentes de IL-6 estromal, observándose como el medio condicionado de estas células incrementa la proporción de células ALDH1⁺ así como la expresión de RGS5 y por tanto la subpoblación de CSC. Cuando se añade un anticuerpo neutralizador de IL-6 al medio condicionado anterior, los niveles se revierten a proporciones basales (Huynh et al., 2016). Estos hallazgos no son únicos para las CE y CAF, ya que el medio condicionado de las MSC también incrementa la proporción de CSC así como la quimiorresistencia en células tumorales a través de IL-6 (Avnet et al., 2017; Cortini et al., 2016).

El mecanismo de acción de IGF-BP3 no está claro ya que, por un lado, parece tener un efecto dependiente de IGF1 al secuestrarlo e inhibir así su efecto mitógeno y antiapoptótico. IGF señala tras la unión a su receptor IGFR a través de la vía PI3K/AKT relacionada con la prevención de muerte celular o mediante la vía de señalización de Ras/MAPK relacionada con proliferación y diferenciación celular (Denduluri et al., 2015). Sin embargo, IGF-BP3 también podría tener otro mecanismo de señalización independiente de IGF, probablemente mediado por otros receptores o moléculas de señalización (Wang et al., 2017). En un estudio en carcinoma oral escamoso se observó como IGF-BP3 era necesario y suficiente para la migración, migración transendotelial y la metástasis a nódulos linfáticos de manera IGF-independiente (Yen et al., 2015).

Nosotros analizamos las dos vías de señalización descritas para IGF-BP3, y observamos que el tratamiento de las células HCT 116 con IGF-BP3 exógeno fosforilaba AKT, pero no MAPK. Se requieren más estudios para identificar el receptor de IGF-BP3 en nuestro modelo y esclarecer su vía de señalización completa, así como identificar otras moléculas que podrían ser responsables de los efectos de los PC sobre células HCT 116 no atribuibles a IGF-BP3.

En resumen, hemos demostrado por primera vez que el PC en el MT no solo puede promover la angiogénesis tumoral e inhibir las respuestas inmunitarias antitumorales, sino que

también puede contribuir de manera directa (angiocrina) al crecimiento, migración y quimiorresistencia de las células tumorales. El TGF- β 1 secretado por las células tumorales y por el propio PC genera un bucle autocrino en el PC que implica la fosforilación de SMAD3. Esta vía de señalización promueve la secreción de diversos factores solubles por parte del PC, que, en conjunto, podrían explicar los efectos observados tras el cocultivo de PC y células de CCR. De hecho, hemos demostrado por primera vez la implicación del IGF-BP3 liberado por PC en la capacidad migratoria e invasiva de las células HCT 116. Además, no podemos descartar que otras moléculas que no hayan sido identificadas por las limitaciones del análisis estén participando en este contexto. Por todo ello, defendemos un papel relevante del PC en el MT, que es más complejo de lo esperado, y planteamos una cuidadosa evaluación de esta célula como posible diana antitumoral.

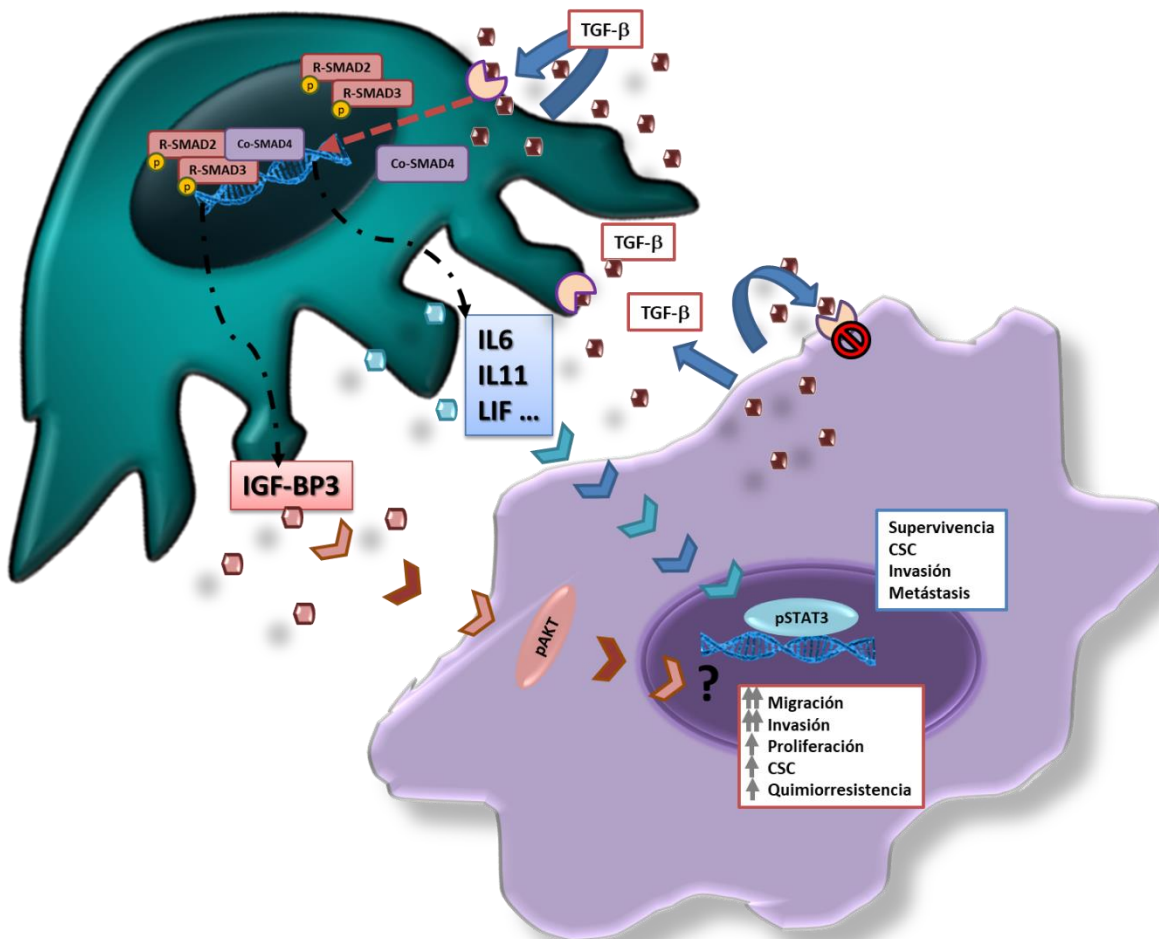
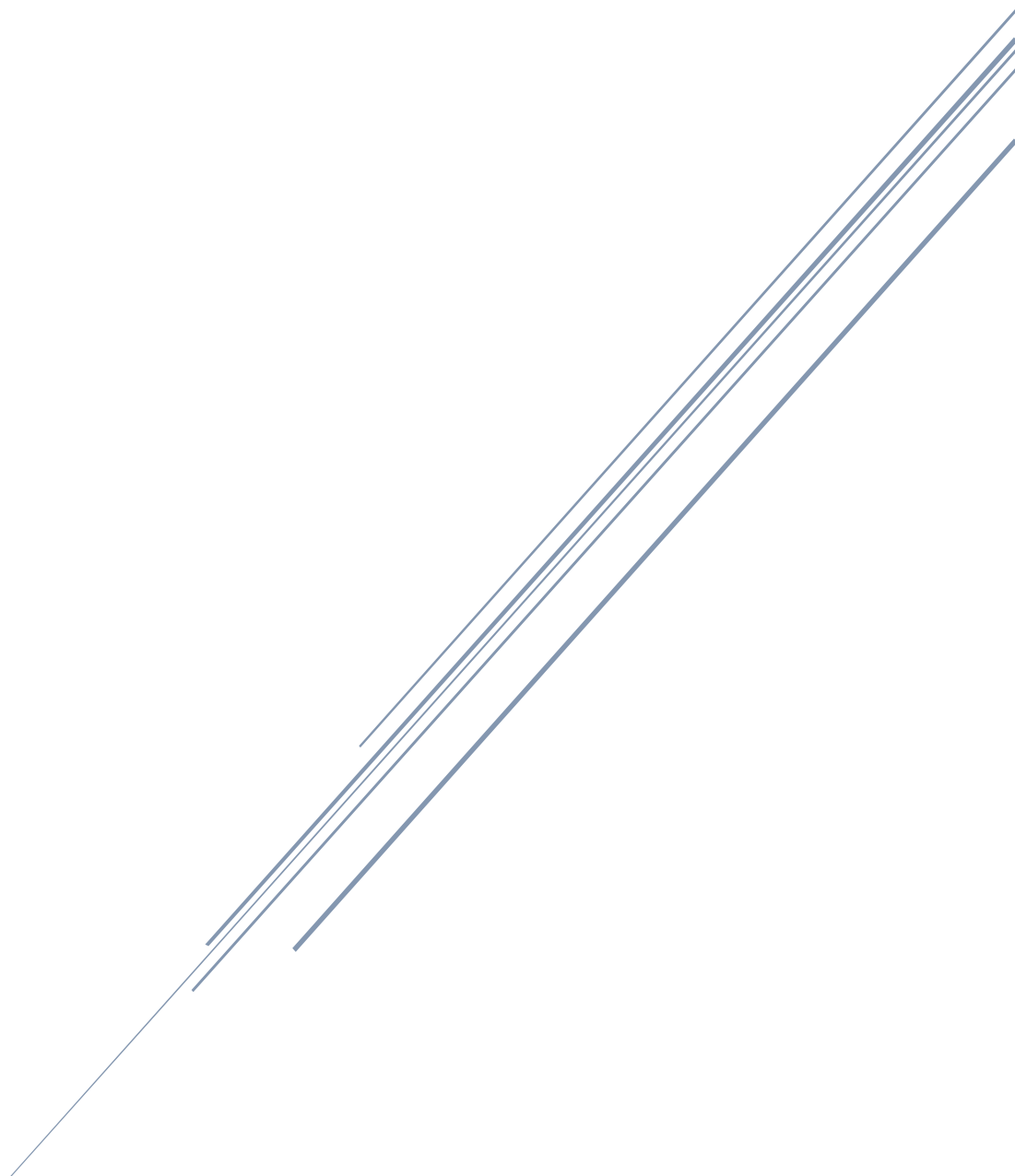


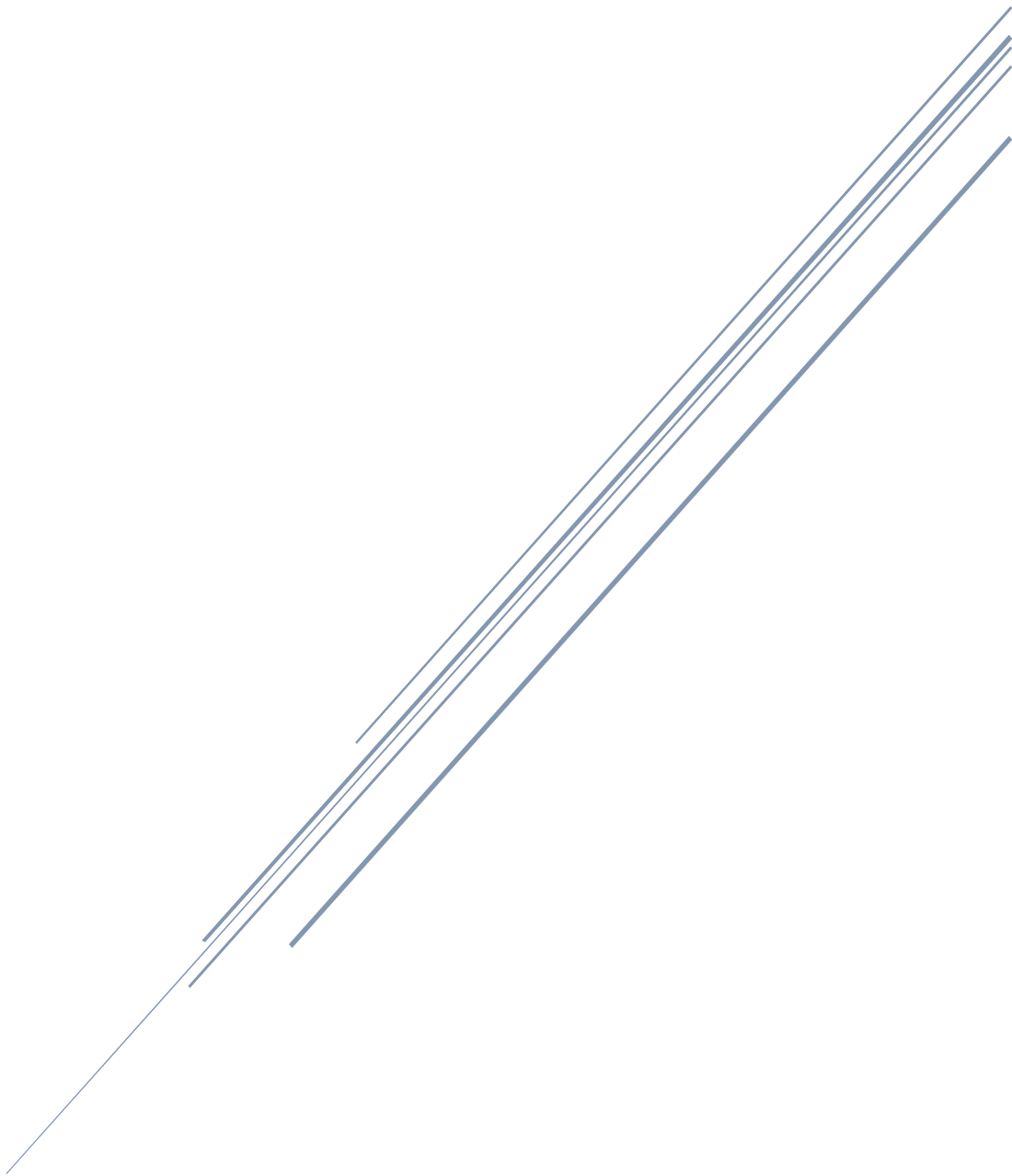
Figura 41. Mecanismos moleculares implicados en la interacción entre pericitos y células de CCR. Esquema resumen de las interacciones e implicaciones observadas entre ambos tipos celulares en este modelo de estudio.

CONCLUSIONES



- I. El estudio de la expresión de diferentes receptores de reconocimiento de patrones reveló que el receptor de proteoglicanos NOD1 es expresado por los pericitos humanos.
- II. El receptor NOD1 en pericitos responde a su agonista C12-iE-DAP a través de la secreción de las moléculas proinflamatorias IL-6 e IL-8, demostrando que la vía de señalización es funcional. El silenciamiento de NOD1 inhibe la capacidad de respuesta a C12-iE-DAP.
- III. Las vías de señalización de TLR4 y NOD1 son independientes, como se ha demostrado utilizando un inhibidor específico de la vía de NOD1, y su activación simultánea tiene un efecto sinérgico.
- IV. La generación de un modelo de cocultivo de pericitos humanos con líneas celulares humanas de cáncer colorrectal (CCR) demostró que los pericitos promueven la proliferación, migración, invasión y quimiorresistencia de las células de CCR *in vitro*, así como el porcentaje de células ALDH1 positivas.
- V. La inoculación subcutánea de pericitos junto con células de CCR favorece la progresión tumoral *in vivo*, y este efecto tiene lugar en estadios tempranos.
- VI. El análisis del perfil transcripcional del pericito en cocultivo con células de CCR reveló una firma molecular de respuesta a TGF- β 1 que además está asociada con el riesgo de recidiva tras la cirugía en pacientes de CCR.
- VII. El TGF- β 1 producido por las células de CCR genera un bucle autocrino de secreción y activación en el pericito que modula su secretoma favoreciendo la tumorigenicidad de las células de CCR.
- VIII. Una de las moléculas secretadas por los pericitos es IGF-BP3, que promueve la migración e invasión de las células de CCR.
- IX. En conjunto, hemos descrito facetas desconocidas hasta la fecha de la implicación del pericito en la inmunidad innata y en el microambiente tumoral.

BIBLIOGRAFÍA



- Abramsson, A., Lindblom, P., 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. <https://doi.org/10.1172/JCI18549>
- Aguilera, Ó., González-Sancho, J.M., Zazo, S., Rincón, R., Fernández, A.F., Tapia, O., Canals, F., Morte, B., Calvanese, V., Orgaz, J.L., Niell, N., Aguilar, S., Freije, J.M., Graña, O., Pisano, D.G., Borrero, A., Martínez-Useros, J., Jiménez, B., Fraga, M.F., García-Foncillas, J., López-Otín, C., Lafarga, M., Rojo, F., Muñoz, A., 2015. Nuclear DICKKOPF-1 as a biomarker of chemoresistance and poor clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget* 6, 5903–5917. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3464>
- Alba-Castellón, L., Olivera-Salguero, R., Mestre-Farrera, A., Peña, R., Herrera, M., Bonilla, F., Casal, J.I., Baulida, J., Peña, C., García de Herreros, A., 2016. Snail1-Dependent Activation of Cancer-Associated Fibroblast Controls Epithelial Tumor Cell Invasion and Metastasis. *Cancer Res.* 76, 6205–6217. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0176>
- Armulik, A., Genové, G., Betsholtz, C., 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell* 21, 193–215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B.R., Betsholtz, C., 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557–561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- 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., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C.N., O'Farrell, F.M., Dalkara, T., 2016. What is a pericyte? *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 451–455. <https://doi.org/10.1177/0271678X15610340>
- Avnet, S., Di Pompo, G., Chano, T., Errani, C., Ibrahim-Hashim, A., Gillies, R.J., Donati, D.M., Baldini, N., 2017. Cancer-associated mesenchymal stroma fosters the stemness of osteosarcoma cells in response to intratumoral acidosis via NF- κ B activation. *Int. J. Cancer* 140, 1331–1345. <https://doi.org/10.1002/ijc.30540>
- Balabanov, R., Beaumont, T., Dore-Duffy, P., 1999. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J. Neurosci. Res.* 55, 578–587. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990301\)55:5<578::AID-JNR5>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990301)55:5<578::AID-JNR5>3.0.CO;2-E)
- Balabanov, R., Washington, R., Wagnerova, J., 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. <https://doi.org/10.1006/mvre.1996.0049>
- Baluk, P., Hashizume, H., McDonald, D.M., 2005. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.12.005>

- Bao, L., Liu, H., You, B., Gu, M., Shi, S., Shan, Y., Li, L., Chen, J., You, Y., 2016. Overexpression of IGFBP3 is associated with poor prognosis and tumor metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37, 15043–15052. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5400-8>
- Battle, E., Clevers, H., 2017. Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* 23, 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Bergers, G., Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>
- Bergers, G., Song, S., 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncol.* 7, 452–464. <https://doi.org/10.1215/S1152851705000232>
- Betsholtz, C., 2004. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.005>
- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M.L., Enikolopov, G.N., Mintz, A., Delbono, O., 2013. Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential. *Stem Cell Res.* 10, 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.09.003>
- Bose, A., Barik, S., Banerjee, Saptak, Ghosh, T., Mallick, A., Bhattacharyya Majumdar, S., Goswami, K.K., Bhuniya, A., Banerjee, Sayantan, Baral, R., Storkus, W.J., Dasgupta, P.S., Majumdar, S., 2013. Tumor-derived vascular pericytes anergize Th cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 971–981. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300280>
- Bose, A., Ghosh, T., Baral, R., 2016. An overlooked tumor promoting immunoregulation by non-hematopoietic stromal cells. *Immunol. Lett.* 176, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.06.002>
- Brantley-Sieders, D.M., Dunaway, C.M., Rao, M., Short, S., Hwang, Y., Gao, Y., Li, D., Jiang, A., Shyr, Y., Wu, J.Y., Chen, J., 2011. Angiocrine factors modulate tumor proliferation and motility through EphA2 repression of Slit2 tumor suppressor function in endothelium. *Cancer Res.* 71, 976–987. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3396>
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C., 2015. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 257–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Bussard, K.M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C., Marini, F.C., 2016. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res. BCR* 18, 84. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0740-2>
- Butler, J.M., Kobayashi, H., Rafii, S., 2010. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat. Rev. Cancer* 10, 138–146. <https://doi.org/10.1038/nrc2791>
- Cai, C., Fordsmann, J.C., Jensen, S.H., Gesslein, B., Lønstrup, M., Hald, B.O., Zambach, S.A., Brodin, B., Lauritzen, M.J., 2018. Stimulation-induced increases in cerebral blood flow and local capillary vasoconstriction depend on conducted vascular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E5796–E5804. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707702115>

- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I.T., Zakharenko, S.S., Gajjar, A., Davidoff, A., Gilbertson, R.J., 2007. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.020>
- Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V.F., Iglesias, M., Céspedes, M.V., Sevillano, M., Nadal, C., Jung, P., Zhang, X.H.-F., Byrom, D., Riera, A., Rossell, D., Mangués, R., Massagué, J., Sancho, E., Batlle, E., 2012. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 22, 571–584. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.013>
- Calon, A., Lonardo, E., Berenguer-Llargo, A., Espinet, E., Hernando-Momblona, X., Iglesias, M., Sevillano, M., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V.F., Byrom, D., Cortina, C., Morral, C., Barceló, C., Tosi, S., Riera, A., Attolini, C.S.-O., Rossell, D., Sancho, E., Batlle, E., 2015. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 47, 320–329. <https://doi.org/10.1038/ng.3225>
- Cao, Z., Scandura, J.M., Inghirami, G.G., Shido, K., Ding, B.-S., Rafii, S., 2017. Molecular checkpoint decisions made by subverted vascular niche transform indolent tumor cells into chemoresistant cancer stem cells. *Cancer Cell* 31, 110–126. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.11.010>
- Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 417–427. <https://doi.org/10.1038/nrd3455>
- Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., Núñez, G., 2014. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* 41, 898–908. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.010>
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Núñez, G., Inohara, N., 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 4, 702–707. <https://doi.org/10.1038/ni945>
- Chan, Y.X., Alfonso, H., Paul Chubb, S.A., Ho, K.K.Y., Gerard Fegan, P., Hankey, G.J., Golledge, J., Flicker, L., Yeap, B.B., 2018. Higher IGFBP3 is associated with increased incidence of colorectal cancer in older men independently of IGF1. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 88, 333–340. <https://doi.org/10.1111/cen.13499>
- Charles, N., Holland, E.C., 2010. The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell Cycle* 9, 3012–3021. <https://doi.org/10.4161/cc.9.15.12710>
- Chen, L., Wang, S., Wang, Y., Zhang, W., Ma, K., Hu, C., Zhu, H., Liang, S., Liu, M., Xu, N., 2018. IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget* 9, 17443–17454. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24734>
- Chen, Y., Cao, J., Xiong, M., Petersen, A.J., Dong, Y., Tao, Y., Huang, C.T.-L., Du, Z., Zhang, S.-C., 2015. Engineering Human Stem Cell Lines with Inducible Gene Knockout using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 17, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.001>

- 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., Sugimoto, H., Rocha, R.M., Damascena, A., Brentani, R.R., Kalluri, R., 2012. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell* 21, 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.024>
- Corselli, M., Chen, C.-W., Crisan, M., Lazzari, L., Péault, B., 2010. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1104–1109. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191643>
- Cortini, M., Massa, A., Avnet, S., Bonuccelli, G., Baldini, N., 2016. Tumor-Activated Mesenchymal Stromal Cells Promote Osteosarcoma Stemness and Migratory Potential via IL-6 Secretion. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166500>
- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C., Bonneau, C., Kondratova, M., Kuperstein, I., Zinovyev, A., Givel, A.-M., Parrini, M.-C., Soumelis, V., Vincent-Salomon, A., Mechta-Grigoriou, F., 2018. Fibroblast Heterogeneity and Immunosuppressive Environment in Human Breast Cancer. *Cancer Cell* 33, 463-479.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011>
- Coussens, L.M., Zitvogel, L., Palucka, A.K., 2013. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science* 339, 286–291. <https://doi.org/10.1126/science.1232227>
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badylak, S., Buhring, H.-J., Jacobino, J.-P., Lazzari, L., Huard, J., Péault, B., 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
- D'Amico, L., Mahajan, S., Capietto, A.-H., Yang, Z., Zamani, A., Ricci, B., Bumpass, D.B., Meyer, M., Su, X., Wang-Gillam, A., Weillbaecher, K., Stewart, S.A., DeNardo, D.G., Faccio, R., 2016. Dickkopf-related protein 1 (Dkk1) regulates the accumulation and function of myeloid derived suppressor cells in cancer. *J. Exp. Med.* 213, 827–840. <https://doi.org/10.1084/jem.20150950>
- Danese, S., Dejana, E., Fiocchi, C., 2007. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 6017–6022.
- David, C.J., Massagué, J., 2018. Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 419–435. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0007-0>
- De Palma, M., Biziato, D., Petrova, T.V., 2017. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 17, 457–474. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51>
- Dellavalle, A., Maroli, G., Covarello, D., Azzoni, E., Innocenzi, A., Perani, L., Antonini, S., Sambasivan, R., Brunelli, S., Tajbakhsh, S., Cossu, G., 2011. Pericytes resident in postnatal skeletal muscle differentiate into muscle fibres and generate satellite cells. *Nat. Commun.* 2, 499. <https://doi.org/10.1038/ncomms1508>

- Denduluri, S.K., Idowu, O., Wang, Z., Liao, Z., Yan, Z., Mohammed, M.K., Ye, J., Wei, Q., Wang, J., Zhao, L., Luu, H.H., 2015. Insulin-like growth factor (IGF) signaling in tumorigenesis and the development of cancer drug resistance. *Genes Dis.* 2, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.10.004>
- DeRuiter, M.C., Poelmann, R.E., VanMunsteren, J.C., Mironov, V., Markwald, R.R., Gittenberger-de Groot, A.C., 1997. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ. Res.* 80, 444–451.
- Dhar, K., Dhar, G., Majumder, M., Haque, I., Mehta, S., Van Veldhuizen, P.J., Banerjee, S.K., Banerjee, S., 2010. Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Mol. Cancer* 9, 209. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-209>
- Dias Moura Prazeres, P.H., Sena, I.F.G., Borges, I. da T., de Azevedo, P.O., Andreotti, J.P., de Paiva, A.E., de Almeida, V.M., de Paula Guerra, D.A., Pinheiro Dos Santos, G.S., Mintz, A., Delbono, O., Birbrair, A., 2017. Pericytes are heterogeneous in their origin within the same tissue. *Dev. Biol.* 427, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.001>
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Madrid, J.F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martín-Vasallo, P., Díaz-Flores, L., 2009a. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol. Histopathol.* 24, 909–969. <https://doi.org/10.14670/HH-24.909>
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Madrid, J.F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martín-Vasallo, P., Díaz-Flores, L., 2009b. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol. Histopathol.* 24, 909–969. <https://doi.org/10.14670/HH-24.909>
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Varela, H., Rancel, N., Valladares, F., 1991. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol. Histopathol.* 6, 269–286.
- Díaz-Flores, L., Madrid, J.F., Gutiérrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Argüelles, H., Díaz-Flores, L., 2006. Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol. Histopathol.* 21, 995–1027. <https://doi.org/10.14670/HH-21.995>
- Domev, H., Milkov, I., Itskovitz-Eldor, J., Dar, A., 2014. Immuno-evasive pericytes from human pluripotent stem cells preferentially modulate induction of allogeneic regulatory T cells. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 1169–1181. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0097>
- Drabsch, Y., ten Dijke, P., 2012. TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 553–568. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9375-7>
- Dvorak, H.F., Weaver, V.M., Tlsty, T.D., Bergers, G., 2011. Tumor microenvironment and progression. *J. Surg. Oncol.* 103, 468–474. <https://doi.org/10.1002/jso.21709>
- Ebos, J.M.L., Mastri, M., Lee, C.R., Tracz, A., Hudson, J.M., Attwood, K., Cruz-Munoz, W.R., Jedezsko, C., Burns, P., Kerbel, R.S., 2014. Neoadjuvant antiangiogenic therapy reveals contrasts in primary and metastatic tumor efficacy. *EMBO Mol. Med.* 6, 1561–1576. <https://doi.org/10.15252/emmm.201403989>

- Edelman, D.A., Jiang, Y., Tyburski, J., Wilson, R.F., Steffes, C., 2006a. Pericytes and their role in microvasculature homeostasis. *J. Surg. Res.* 135, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.06.010>
- Edelman, D.A., Jiang, Y., Tyburski, J., Wilson, R.F., Steffes, C., 2006b. Toll-like receptor-4 message is up-regulated in lipopolysaccharide-exposed rat lung pericytes. *J. Surg. Res.* 134, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.03.007>
- Edelman, D.A., Jiang, Y., Tyburski, J.G., Wilson, R.F., Steffes, C.P., 2007a. Cytokine production in lipopolysaccharide-exposed rat lung pericytes. *J. Trauma* 62, 89–93. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31802dd712>
- Edelman, D.A., Jiang, Y., Tyburski, J.G., Wilson, R.F., Steffes, C.P., 2007b. Lipopolysaccharide up-regulates heat shock protein expression in rat lung pericytes. *J. Surg. Res.* 140, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.12.560>
- Erber, R., Thurnher, A., Katsen, A.D., Groth, G., Kerger, H., Hammes, H.-P., Menger, M.D., Ullrich, A., Vajkoczy, P., 2004. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 338–340. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0271fje>
- Erdman, S.E., Sohn, J.J., Rao, V.P., Nambiar, P.R., Ge, Z., Fox, J.G., Schauer, D.B., 2005. CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice. *Cancer Res.* 65, 3998–4004. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3104>
- Ergün, S., Tilki, D., Klein, D., 2011. Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 981–995. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3507>
- Folkman, J., 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* 3, 643–651.
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., Nuñez, G., 2009. Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense. *Immunol. Rev.* 227, 106–128. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x>
- Franses, J.W., Baker, A.B., Chitalia, V.C., Edelman, E.R., 2011. Stromal endothelial cells directly influence cancer progression. *Sci. Transl. Med.* 3, 66ra5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001542>
- Fujimoto, K., 1995. Pericyte-endothelial gap junctions in developing rat cerebral capillaries: a fine structural study. *Anat. Rec.* 242, 562–565. <https://doi.org/10.1002/ar.1092420412>
- Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., Betsholtz, C., 2009. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 630–638. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161521>
- Gatheral, T., Reed, D.M., Moreno, L., Gough, P.J., Votta, B.J., Sehon, C.A., Rickard, D.J., Bertin, J., Lim, E., Nicholson, A.G., Mitchell, J.A., 2012. A key role for the endothelium in NOD1 mediated vascular inflammation: comparison to TLR4 responses. *PLoS One* 7, e42386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042386>

- Gerhardt, H., Betsholtz, C., 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314, 15–23. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0745-x>
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 278, 8869–8872. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
- Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., Jain, R.K., 2011. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* 91, 1071–1121. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2010>
- Gregg, J.L., Brown, K.E., Mintz, E.M., Piontkivska, H., Fraizer, G.C., 2010. Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. *BMC Cancer* 10, 165. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-165>
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Guijarro-Muñoz, I., Compte, M., Álvarez-Cienfuegos, A., Álvarez-Vallina, L., Sanz, L., 2014. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF-κB signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *J. Biol. Chem.* 289, 2457–2468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.521161>
- Guijarro-Muñoz, I., Cuesta, A.M., Alvarez-Cienfuegos, A., Geng, J.G., Alvarez-Vallina, L., Sanz, L., 2012. The axonal repellent Slit2 inhibits pericyte migration: potential implications in angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 318, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.12.005>
- Guimarães-Camboa, N., Cattaneo, P., Sun, Y., Moore-Morris, T., Gu, Y., Dalton, N.D., Rockenstein, E., Masliah, E., Peterson, K.L., Stallcup, W.B., Chen, J., Evans, S.M., 2017. Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell Stem Cell* 20, 345-359.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.006>
- Hall, C.N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N.B., Mishra, A., Sutherland, B.A., O'Farrell, F.M., Buchan, A.M., Lauritzen, M., Attwell, D., 2014. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>
- Hamzah, J., Jugold, M., Kiessling, F., Rigby, P., Manzur, M., Marti, H.H., Rabie, T., Kaden, S., Gröne, H.-J., Hämmerling, G.J., Arnold, B., Ganss, R., 2008. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* 453, 410–414. <https://doi.org/10.1038/nature06868>
- Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

- Harder, J., Núñez, G., 2009. Functional expression of the intracellular pattern recognition receptor NOD1 in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1299–1302. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.395>
- Harrell, C.R., Simovic Markovic, B., Fellabaum, C., Arsenijevic, A., Djonov, V., Volarevic, V., 2018. Molecular mechanisms underlying therapeutic potential of pericytes. *J. Biomed. Sci.* 25, 21. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0423-7>
- Hasumi, Y., Kłosowska-Wardega, A., Furuhashi, M., Ostman, A., Heldin, C.-H., Hellberg, C., 2007. Identification of a subset of pericytes that respond to combination therapy targeting PDGF and VEGF signaling. *Int. J. Cancer* 121, 2606–2614. <https://doi.org/10.1002/ijc.22999>
- Hawinkels, L.J. a. C., Paauwe, M., Verspaget, H.W., Wiercinska, E., van der Zon, J.M., van der Ploeg, K., Koelink, P.J., Lindeman, J.H.N., Mesker, W., ten Dijke, P., Sier, C.F.M., 2014. Interaction with colon cancer cells hyperactivates TGF- β signaling in cancer-associated fibroblasts. *Oncogene* 33, 97–107. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.536>
- Heidemann, J., Domschke, W., Kucharzik, T., Maaser, C., 2006. Intestinal microvascular endothelium and innate immunity in inflammatory bowel disease: a second line of defense? *Infect. Immun.* 74, 5425–5432. <https://doi.org/10.1128/IAI.00248-06>
- Heldin, C.-H., Moustakas, A., 2016. Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022053>
- Herrera, A., Herrera, M., Alba-Castellón, L., Silva, J., García, V., Loubat-Casanovas, J., Alvarez-Cienfuegos, A., Miguel García, J., Rodríguez, R., Gil, B., Ma Jesús Citores, null, Ma Jesús Larriba, null, Ignacio Casal, J., de Herreros, A.G., Bonilla, F., Peña, C., 2014. Protumorigenic effects of Snail-expression fibroblasts on colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 134, 2984–2990. <https://doi.org/10.1002/ijc.28613>
- Herrera, M., Islam, A.B.M.M.K., Herrera, A., Martín, P., García, V., Silva, J., Garcia, J.M., Salas, C., Casal, I., de Herreros, A.G., Bonilla, F., Peña, C., 2013. Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 5914–5926. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0694>
- Hill, R.A., Tong, L., Yuan, P., Murikinati, S., Gupta, S., Grutzendler, J., 2015. Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron* 87, 95–110. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.001>
- Holm, A., Heumann, T., Augustin, H.G., 2018. Microvascular Mural Cell Organotypic Heterogeneity and Functional Plasticity. *Trends Cell Biol.* 28, 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.12.002>
- Hong, J., Tobin, N.P., Rundqvist, H., Li, T., Lavergne, M., García-Ibáñez, Y., Qin, H., Paulsson, J., Zeitelhofer, M., Adzemovic, M.Z., Nilsson, I., Roswall, P., Hartman, J., Johnson, R.S., Östman, A., Bergh, J., Poljakovic, M., Genové, G., 2015. Role of Tumor Pericytes in the Recruitment of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 107. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv209>

- Hosaka, K., Yang, Y., Seki, T., Fischer, C., Dubey, O., Fredlund, E., Hartman, J., Religa, P., Morikawa, H., Ishii, Y., Sasahara, M., Larsson, O., Cossu, G., Cao, R., Lim, S., Cao, Y., 2016. Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E5618-5627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608384113>
- Howson, K.M., Aplin, A.C., Gelati, M., Alessandri, G., Parati, E.A., 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. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00168.2005>
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Hui, L., Chen, Y., 2015. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 368, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.039>
- Hung, C.F., Mittelsteadt, K.L., Brauer, R., McKinney, B.L., Hallstrand, T.S., Parks, W.C., Chen, P., Schnapp, L.M., Liles, W.C., Duffield, J.S., Altemeier, W.A., 2017. Lung pericyte-like cells are functional interstitial immune sentinel cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 312, L556–L567. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00349.2016>
- Hussain, S.P., Harris, C.C., 2007. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int. J. Cancer* 121, 2373–2380. <https://doi.org/10.1002/ijc.23173>
- Huynh, P.T., Beswick, E.J., Coronado, Y.A., Johnson, P., O'Connell, M.R., Watts, T., Singh, P., Qiu, S., Morris, K., Powell, D.W., Pinchuk, I.V., 2016. CD90+ stromal cells are the major source of IL-6 which supports cancer stem-like cells and inflammation in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 138, 1971–1981. <https://doi.org/10.1002/ijc.29939>
- Inohara, null, Chamaillard, null, McDonald, C., Nuñez, G., 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 355–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133347>
- Itoh, G., Chida, S., Yanagihara, K., Yashiro, M., Aiba, N., Tanaka, M., 2017. Cancer-associated fibroblasts induce cancer cell apoptosis that regulates invasion mode of tumours. *Oncogene* 36, 4434–4444. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.49>
- Jain, R.K., 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9, 685–693. <https://doi.org/10.1038/nm0603-685>
- Jakowlew, S.B., 2006. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 435–457. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9006-2>
- Jansson, D., Rustenhoven, J., Feng, S., Hurley, D., Oldfield, R.L., Bergin, P.S., Mee, E.W., Faull, R.L.M., Dragunow, M., 2014. A role for human brain pericytes in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 11, 104. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-104>
- Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N.W., Deepak, J., Xing, L., Wang, H., Liu, Z., Su, Y., Stass, S.A., Katz, R.L., 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol. Cancer Res. MCR* 7, 330–338. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0393>

- Johnson, M.A., Firth, S.M., 2014. IGFBP-3: A cell fate pivot in cancer and disease. *Growth Horm. IGF Res.* 24, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2014.04.007>
- Jorissen, R.N., Gibbs, P., Christie, M., Prakash, S., Lipton, L., Desai, J., Kerr, D., Aaltonen, L.A., Arango, D., Kruhøffer, M., Orntoft, T.F., Andersen, C.L., Gruidl, M., Kamath, V.P., Eschrich, S., Yeatman, T.J., Sieber, O.M., 2009. Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 7642–7651. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1431>
- Jung, B., Staudacher, J.J., Beauchamp, D., 2017. Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 152, 36–52. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.015>
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J.L., Altorki, N., Port, E.R., Ruggero, D., Shmelkov, S.V., Jensen, K.K., Rafii, S., Lyden, D., 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820–827. <https://doi.org/10.1038/nature04186>
- Kato, T., Noma, K., Ohara, T., Kashima, H., Katsura, Y., Sato, H., Komoto, S., Katsube, R., Ninomiya, T., Tazawa, H., Shirakawa, Y., Fujiwara, T., 2018. Cancer-Associated Fibroblasts Affect Intratumoral CD8⁺ and FoxP3⁺ T Cells Via IL6 in the Tumor Microenvironment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24, 4820–4833. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0205>
- Keeley, E.C., Mehrad, B., Strieter, R.M., 2011. Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp. Cell Res.* 317, 685–690. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.10.020>
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galán, J.E., Núñez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 416, 194–199. <https://doi.org/10.1038/416194a>
- Kovac, A., Erickson, M.A., Banks, W.A., 2011. Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J. Neuroinflammation* 8, 139. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-139>
- Kramann, R., Schneider, R.K., DiRocco, D.P., Machado, F., Fleig, S., Bondzie, P.A., Henderson, J.M., Ebert, B.L., Humphreys, B.D., 2015. Perivascular Gli1⁺ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell* 16, 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.004>
- Krishnamurthy, S., Dong, Z., Vodopyanov, D., Imai, A., Helman, J.I., Prince, M.E., Wicha, M.S., Nör, J.E., 2010. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 70, 9969–9978. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1712>
- Krishnamurthy, S., Warner, K.A., Dong, Z., Imai, A., Nör, C., Ward, B.B., Helman, J.I., Taichman, R.S., Bellile, E.L., McCauley, L.K., Polverini, P.J., Prince, M.E., Wicha, M.S., Nör, J.E., 2014.

- Endothelial interleukin-6 defines the tumorigenic potential of primary human cancer stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 2845–2857. <https://doi.org/10.1002/stem.1793>
- Krueger, M., Bechmann, I., 2010. CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia* 58, 1–10. <https://doi.org/10.1002/glia.20898>
- Kumar, M.V., Nagineni, C.N., Chin, M.S., Hooks, J.J., Detrick, B., 2004. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J. Neuroimmunol.* 153, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.04.018>
- Lakins, M.A., Ghorani, E., Munir, H., Martins, C.P., Shields, J.D., 2018. Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8+ T Cells to protect tumour cells. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03347-0>
- Lambrechts, D., Wauters, E., Boeckx, B., Aibar, S., Nittner, D., Burton, O., Bassez, A., Decaluwé, H., Pircher, A., Van den Eynde, K., Weynand, B., Verbeken, E., De Leyn, P., Liston, A., Vansteenkiste, J., Carmeliet, P., Aerts, S., Thienpont, B., 2018. Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat. Med.* 24, 1277–1289. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0096-5>
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L., Weaver, V.M., 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891–906. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>
- Li, X., Yang, Q., Yu, H., Wu, L., Zhao, Y., Zhang, C., Yue, X., Liu, Z., Wu, H., Haffty, B.G., Feng, Z., Hu, W., 2014. LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget* 5, 788–801. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1772>
- Lim, Y.C., Oh, S.-Y., Cha, Y.Y., Kim, S.-H., Jin, X., Kim, H., 2011. Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 47, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.11.011>
- Lin, J.-T., Wang, J.-Y., Chen, M.-K., Chen, H.-C., Chang, T.-H., Su, B.-W., Chang, P.-J., 2013. Colon cancer mesenchymal stem cells modulate the tumorigenicity of colon cancer through interleukin 6. *Exp. Cell Res.* 319, 2216–2229. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.06.003>
- Liu, R., Lauridsen, H.M., Amezcua, R.A., Pierce, R.W., Jane-Wit, D., Fang, C., Pellowe, A.S., Kirkiles-Smith, N.C., Gonzalez, A.L., Poher, J.S., 2016. IL-17 Promotes Neutrophil-Mediated Immunity by Activating Microvascular Pericytes and Not Endothelium. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 197, 2400–2408. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600138>
- Liu, R., Merola, J., Manes, T.D., Qin, L., Tietjen, G.T., López-Giráldez, F., Broecker, V., Fang, C., Xie, C., Chen, P.-M., Kirkiles-Smith, N.C., Jane-Wit, D., Poher, J.S., 2018. Interferon- γ converts human microvascular pericytes into negative regulators of alloimmunity through induction of indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *JCI Insight* 3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97881>

- 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., Nick, A.M., Stone, R.L., Jaffe, R.B., Coleman, R.L., Sood, A.K., 2010. Targeting pericytes with a PDGF-B aptamer in human ovarian carcinoma models. *Cancer Biol. Ther.* 9, 176–182.
- Lu, J., Shenoy, A.K., 2017. Epithelial-to-Pericyte Transition in Cancer. *Cancers* 9. <https://doi.org/10.3390/cancers9070077>
- Lu, J., Ye, X., Fan, F., Xia, L., Bhattacharya, R., Bellister, S., Tozzi, F., Sceusi, E., Zhou, Y., Tachibana, I., Maru, D.M., Hawke, D.H., Rak, J., Mani, S.A., Zweidler-McKay, P., Ellis, L.M., 2013. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* 23, 171–185. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.021>
- Lu, Z., Li, Y., Jin, J., Zhang, X., Lopes-Virella, M.F., 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. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.251181>
- Maciag, P.C., Seavey, M., Pan, Z.-K., Ferrone, S., Paterson, Y., 2008. Cancer immunotherapy targeting the HMW-MAA protein results in a broad antitumor response and reduction of pericytes in the tumor vasculature. *Cancer Res.* 68, 8066–8075. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0287>
- Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H., Yang, X.-F., 2013. An evolving new paradigm: endothelial cells--conditional innate immune cells. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 6, 61. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61>
- Maier, C.L., Pober, J.S., 2011. Human placental pericytes poorly stimulate and actively regulate allogeneic CD4 T cell responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 183–189. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.217117>
- Mariathasan, S., Turley, S.J., Nickles, D., Castiglioni, A., Yuen, K., Wang, Y., Kadel, E.E., Koepfen, H., Astarita, J.L., Cubas, R., Jhunjhunwala, S., Banchereau, R., Yang, Y., Guan, Y., Chalouni, C., Ziai, J., Şenbabaoğlu, Y., Santoro, S., Sheinson, D., Hung, J., Giltman, J.M., Pierce, A.K., Mesh, K., Lianoglou, S., Riegler, J., Carano, R.A.D., Eriksson, P., Hoglund, M., Somarriba, L., Halligan, D.L., van der Heijden, M., Loriot, Y., Rosenberg, J.E., Fong, L., Mellman, I., Chen, D.S., Green, M., Derleth, C., Fine, G.D., Hegde, P.S., Bourgon, R., Powles, T., 2018. TGF- β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* 554, 544–548. <https://doi.org/10.1038/nature25501>
- Massagué, J., 2012. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Massoner, P., Haag, P., Seifarth, C., Jurgeit, A., Rogatsch, H., Doppler, W., Bartsch, G., Klocker, H., 2008. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in the prostate and in prostate cancer: local production, distribution and secretion pattern indicate a role in stromal-epithelial interaction. *The Prostate* 68, 1165–1178. <https://doi.org/10.1002/pros.20785>
- Matsumoto, J., Takata, F., Machida, T., Takahashi, H., Soejima, Y., Funakoshi, M., Futagami, K., Yamauchi, A., Dohgu, S., Kataoka, Y., 2014. Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance

- microglial activation. *Neurosci. Lett.* 578, 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.06.052>
- Miyake, K., 2007. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* 19, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.002>
- Moore, L.D., Isayeva, T., Siegal, G.P., Ponnazhagan, S., 2008. Silencing of transforming growth factor-beta1 in situ by RNA interference for breast cancer: implications for proliferation and migration in vitro and metastasis in vivo. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 4961–4970. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4604>
- Moore-Smith, L.D., Isayeva, T., Lee, J.H., Frost, A., Ponnazhagan, S., 2017. Silencing of TGF- β 1 in tumor cells impacts MMP-9 in tumor microenvironment. *Sci. Rep.* 7, 8678. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09062-y>
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., McDonald, D.M., 2002. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* 160, 985–1000. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64920-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64920-6)
- MUÑOZ, N.M., BAEK, J.Y., GRADY, W.M., 2008. TGF- β has paradoxical and context dependent effects on proliferation and anoikis in human colorectal cancer cell lines. *Growth Factors Chur Switz.* 26, 254–262. <https://doi.org/10.1080/08977190802291667>
- Murgai, M., Ju, W., Eason, M., Kline, J., Beury, D., Kaczanowska, S., Miettinen, M.M., Kruhlak, M., Lei, H., Shern, J.F., Cherepanova, O.A., Owens, G.K., Kaplan, R.N., 2017. KLF4-dependent perivascular cell plasticity mediates pre-metastatic niche formation and metastasis. *Nat. Med.* 23, 1176. <https://doi.org/10.1038/nm.4400>
- Nagy, J.A., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., 2012. Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006544. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006544>
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D., 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267.
- Naspi, A., Zingariello, M., Sancillo, L., Panasiti, V., Polinari, D., Martella, M., Rosa Alba, R., Londei, P., 2017. IGFBP-3 inhibits Wnt signaling in metastatic melanoma cells. *Mol. Carcinog.* 56, 681–693. <https://doi.org/10.1002/mc.22525>
- Navab, R., Strumpf, D., Bandarchi, B., Zhu, C.-Q., Pintilie, M., Ramnarine, V.R., Ibrahimov, E., Radulovich, N., Leung, L., Barczyk, M., Panchal, D., To, C., Yun, J.J., Der, S., Shepherd, F.A., Jurisica, I., Tsao, M.-S., 2011. Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7160–7165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014506108>
- Navarro, R., Compte, M., Álvarez-Vallina, L., Sanz, L., 2016. Immune Regulation by Pericytes: Modulating Innate and Adaptive Immunity. *Front. Immunol.* 7, 480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00480>

- Neuzillet, C., de Gramont, A., Tijeras-Raballand, A., de Mestier, L., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., 2014. Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* 5, 78–94. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1569>
- Nishio, H., Kanno, S., Onoyama, S., Ikeda, K., Tanaka, T., Kusuhara, K., Fujimoto, Y., Fukase, K., Sueishi, K., Hara, T., 2011. Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1093–1099. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.216325>
- Nourshargh, S., Hordijk, P.L., Sixt, M., 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 366–378. <https://doi.org/10.1038/nrm2889>
- Nyland, H., Nilsen, R., 1982. Localization of Fc gamma receptors in the human central nervous system. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* [C] 90, 217–221.
- Ochs, K., Sahm, F., Opitz, C.A., Lanz, T.V., Oezen, I., Couraud, P.-O., von Deimling, A., Wick, W., Platten, M., 2013. Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma. *J. Neuroimmunol.* 265, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.09.011>
- Ohata, Y., Tsuchiya, M., Hirai, H., Yamaguchi, S., Akashi, T., Sakamoto, K., Yamaguchi, A., Ikeda, T., Kayamori, K., 2018. Leukemia inhibitory factor produced by fibroblasts within tumor stroma participates in invasion of oral squamous cell carcinoma. *PloS One* 13, e0191865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191865>
- Ozerdem, U., Stallcup, W.B., 2003. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* 6, 241–249. <https://doi.org/10.1023/B:AGEN.0000021401.58039.a9>
- Paiva, A.E., Lousado, L., Guerra, D.A.P., Azevedo, P.O., Sena, I.F.G., Andreotti, J.P., Santos, G.S.P., Gonçalves, R., Mintz, A., Birbrair, A., 2018. Pericytes in the Premetastatic Niche. *Cancer Res.* 78, 2779–2786. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3883>
- Pardridge, W.M., Yang, J., Buciak, J., Tourtellotte, W.W., 1989. Human brain microvascular DR-antigen. *J. Neurosci. Res.* 23, 337–341. <https://doi.org/10.1002/jnr.490230314>
- Park, D.Y., Lee, J., Kim, J., Kim, K., Hong, S., Han, S., Kubota, Y., Augustin, H.G., Ding, L., Kim, J.W., Kim, H., He, Y., Adams, R.H., Koh, G.Y., 2017. Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nat. Commun.* 8, 15296. <https://doi.org/10.1038/ncomms15296>
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306793200>
- Pedrosa, A.-R., Trindade, A., Carvalho, C., Graça, J., Carvalho, S., Peleteiro, M.C., Adams, R.H., Duarte, A., 2015. Endothelial Jagged1 promotes solid tumor growth through both pro-angiogenic and angiocrine functions. *Oncotarget* 6, 24404–24423. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4380>
- Pellowe, A.S., Sauler, M., Hou, Y., Merola, J., Liu, R., Calderon, B., Lauridsen, H.M., Harris, M.R., Leng, L., Zhang, Y., Tilstam, P.V., Pober, J.S., Bucala, R., Lee, P.J., Gonzalez, A.L., 2018.

- Endothelial cell-secreted MIF reduces pericyte contractility and enhances neutrophil extravasation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* fj201800480R. <https://doi.org/10.1096/fj.201800480R>
- Pieper, C., Marek, J.J., Unterberg, M., Schwerdtle, T., Galla, H.-J., 2014. Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS in vitro. *Brain Res.* 1550, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.004>
- Pieper, C., Pieloch, P., Galla, H.-J., 2013. Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood–brain barrier. *Brain Res.* 1524, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.05.047>
- Pietras, K., Ostman, A., 2010. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* 316, 1324–1331. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045>
- Pober, J.S., Merola, J., Liu, R., Manes, T.D., 2017. Antigen Presentation by Vascular Cells. *Front. Immunol.* 8, 1907. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01907>
- Pober, J.S., Tellides, G., 2012. Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends Immunol.* 33, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.09.006>
- Prete, A., Lo, A.S., Sadow, P.M., Bhasin, S.S., Antonello, Z.A., Vodopivec, D.M., Ullas, S., Sims, J.N., Clohessy, J., Dvorak, A.M., Sciuto, T., Bhasin, M., Murphy-Ullrich, J.E., Lawler, J., Karumanchi, S.A., Nucera, C., 2018. Pericytes Elicit Resistance to Vemurafenib and Sorafenib Therapy in Thyroid Carcinoma via the TSP-1/TGFβ1 Axis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0693>
- Proebstl, D., Voisin, M.-B., Woodfin, A., Whiteford, J., D'Acquisto, F., Jones, G.E., Rowe, D., Nourshargh, S., 2012. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 1219–1234. <https://doi.org/10.1084/jem.20111622>
- Qiao, Y., Zhang, C., Li, A., Wang, D., Luo, Z., Ping, Y., Zhou, B., Liu, S., Li, H., Yue, D., Zhang, Z., Chen, X., Shen, Z., Lian, J., Li, Y., Wang, S., Li, F., Huang, L., Wang, L., Zhang, B., Yu, J., Qin, Z., Zhang, Y., 2018. IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 37, 873–883. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.387>
- Quante, M., Varga, J., Wang, T.C., Greten, F.R., 2013. The gastrointestinal tumor microenvironment. *Gastroenterology* 145, 63–78. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.03.052>
- Rajantie, I., Ilmonen, M., Alminaitte, A., Ozerdem, U., Alitalo, K., Salven, P., 2004. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 104, 2084–2086. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0336>
- Raza, A., Franklin, M.J., Dudek, A.Z., 2010. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am. J. Hematol.* 85, 593–598. <https://doi.org/10.1002/ajh.21745>

- Rokavec, M., Öner, M.G., Li, H., Jackstadt, R., Jiang, L., Lodygin, D., Kaller, M., Horst, D., Ziegler, P.K., Schwitalla, S., Slotta-Huspenina, J., Bader, F.G., Greten, F.R., Hermeking, H., 2014. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J. Clin. Invest.* 124, 1853–1867. <https://doi.org/10.1172/JCI73531>
- Ruffell, B., Affara, N.I., Coussens, L.M., 2012. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol.* 33, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.12.001>
- Rupp, C., Scherzer, M., Rudisch, A., Unger, C., Haslinger, C., Schweifer, N., Artaker, M., Nivarthi, H., Moriggl, R., Hengstschläger, M., Kerjaschki, D., Sommergruber, W., Dolznig, H., Garin-Chesa, P., 2015. IGFBP7, a novel tumor stroma marker, with growth-promoting effects in colon cancer through a paracrine tumor-stroma interaction. *Oncogene* 34, 815–825. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.18>
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2006. Isolation of BAC DNA from Small-scale Cultures. *CSH Protoc.* 2006. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4006>
- Sanz, L., Cuesta, A.M., Salas, C., Corbacho, C., Bellas, C., Alvarez-Vallina, L., 2009. Differential transplantability of human endothelial cells in colorectal cancer and renal cell carcinoma primary xenografts. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 89, 91–97. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.108>
- Sanz, L., Santos-Valle, P., Alonso-Camino, V., Salas, C., Serrano, A., Vicario, J.L., Cuesta, A.M., Compte, M., Sánchez-Martín, D., Alvarez-Vallina, L., 2008. Long-term in vivo imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels. *Microvasc. Res.* 75, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.11.007>
- Schallek, J., Geng, Y., Nguyen, H., Williams, D.R., 2013. Morphology and topography of retinal pericytes in the living mouse retina using in vivo adaptive optics imaging and ex vivo characterization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 8237–8250. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12581>
- Selvanantham, T., Escalante, N.K., Cruz Tleugabulova, M., Fiévé, S., Girardin, S.E., Philpott, D.J., Mallevaey, T., 2013. Nod1 and Nod2 enhance TLR-mediated invariant NKT cell activation during bacterial infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191, 5646–5654. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301412>
- Shintani, Y., Fujiwara, A., Kimura, T., Kawamura, T., Funaki, S., Minami, M., Okumura, M., 2016. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling. *J. Thorac. Oncol.* 11, 1482–1492. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.025>
- Song, G., Liu, K., Zhu, X., Yang, X., Shen, Y., Wang, W., Shi, G., Li, Q., Duan, Y., Zhao, Y., Feng, G., 2016. The low IGFBP-3 level is associated with esophageal cancer patients: a meta-analysis. *World J. Surg. Oncol.* 14, 307. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-1055-6>
- Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z., Bergers, G., 2005. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat. Cell Biol.* 7, 870–879. <https://doi.org/10.1038/ncb1288>

- Spaeth, E.L., Dembinski, J.L., Sasser, A.K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M., Marini, F., 2009. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 4, e4992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004992>
- Speyer, C.L., Ward, P.A., 2011. Role of endothelial chemokines and their receptors during inflammation. *J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res.* 24, 18–27. <https://doi.org/10.3109/08941939.2010.521232>
- Stratman, A.N., Malotte, K.M., Mahan, R.D., Davis, M.J., Davis, G.E., 2009. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 114, 5091–5101. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-222364>
- Suematsu, M., Aiso, S., 2001. Professor Toshio Ito: a clairvoyant in pericyte biology. *Keio J. Med.* 50, 66–71.
- Swift, M.R., Weinstein, B.M., 2009. Arterial-venous specification during development. *Circ. Res.* 104, 576–588. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.188805>
- Tanaka, A., Sakaguchi, S., 2017. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res.* 27, 109–118. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>
- Tao, L., Huang, G., Wang, R., Pan, Y., He, Z., Chu, X., Song, H., Chen, L., 2016. Cancer-associated fibroblasts treated with cisplatin facilitates chemoresistance of lung adenocarcinoma through IL-11/IL-11R/STAT3 signaling pathway. *Sci. Rep.* 6, 38408. <https://doi.org/10.1038/srep38408>
- Tauriello, D.V.F., Palomo-Ponce, S., Stork, D., Berenguer-Llergo, A., Badia-Ramentol, J., Iglesias, M., Sevillano, M., Ibiza, S., Cañellas, A., Hernando-Mombona, X., Byrom, D., Matarin, J.A., Calon, A., Rivas, E.I., Nebreda, A.R., Riera, A., Attolini, C.S.-O., Batlle, E., 2018. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* 554, 538–543. <https://doi.org/10.1038/nature25492>
- Tawonsawatruk, T., West, C.C., Murray, I.R., Soo, C., Péault, B., Simpson, A.H.R.W., 2016. Adipose derived pericytes rescue fractures from a failure of healing--non-union. *Sci. Rep.* 6, 22779. <https://doi.org/10.1038/srep22779>
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M., 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2101–2114.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Thomas, D.A., Massagué, J., 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>
- Turley, S.J., Cremasco, V., Astarita, J.L., 2015. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 669–682. <https://doi.org/10.1038/nri3902>
- Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhorji, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J.M., Brunnström, H., Glimelius, B., Sjöblom, T., Edqvist, P.-H., Djureinovic, D., Micke, P., Lindskog, C., Mardinoglu, A., Ponten, F., 2017. A pathology

atlas of the human cancer transcriptome. *Science* 357.
<https://doi.org/10.1126/science.aan2507>

- Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Häcker, H., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103217200>
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M.A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., Lendahl, U., Betsholtz, C., 2018. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature* 554, 475–480. <https://doi.org/10.1038/nature25739>
- Vastrad, B., Vastrad, C., Tengli, A., Iliger, S., 2018. Identification of differentially expressed genes regulated by molecular signature in breast cancer-associated fibroblasts by bioinformatics analysis. *Arch. Gynecol. Obstet.* 297, 161–183. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4562-y>
- Virgintino, D., Girolamo, F., Errede, M., Capobianco, C., Robertson, D., Stallcup, W.B., Perris, R., Roncali, L., 2007. An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis. *Angiogenesis* 10, 35–45. <https://doi.org/10.1007/s10456-006-9061-x>
- Wahab, S.M.R., Islam, F., Gopalan, V., Lam, A.K.-Y., 2017. The Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 16, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.01.011>
- Wang, L., Cao, L., Wang, H., Liu, B., Zhang, Q., Meng, Z., Wu, X., Zhou, Q., Xu, K., 2017. Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. *Oncotarget* 8, 76116–76128. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18814>
- Wang, R., Bhattacharya, R., Ye, X., Fan, F., Boulbes, D.R., Xia, L., Ellis, L.M., 2017. Endothelial cells activate the cancer stem cell-associated NANOGP8 pathway in colorectal cancer cells in a paracrine fashion. *Mol. Oncol.* 11, 1023–1034. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12071>
- Wang, S., Cao, C., Chen, Z., Bankaitis, V., Tzima, E., Sheibani, N., Burridge, K., 2012. Pericytes regulate vascular basement membrane remodeling and govern neutrophil extravasation during inflammation. *PLoS One* 7, e45499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045499>
- Wen, S., Hou, Y., Fu, L., Xi, L., Yang, D., Zhao, M., Qin, Y., Sun, K., Teng, Y., Liu, M., 2018. Cancer-associated fibroblast (CAF)-derived IL32 promotes breast cancer cell invasion and metastasis via integrin β 3-p38 MAPK signalling. *Cancer Lett.* 442, 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.10.015>
- Weninger, W., Biro, M., Jain, R., 2014. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 232–246. <https://doi.org/10.1038/nri3641>
- Whitesell, T.R., Kennedy, R.M., Carter, A.D., Rollins, E.-L., Georgijevic, S., Santoro, M.M., Childs, S.J., 2014. An α -Smooth Muscle Actin (*acta2/asma*) Zebrafish Transgenic Line Marking

- Vascular Mural Cells and Visceral Smooth Muscle Cells. *PLOS ONE* 9, e90590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090590>
- Windheim, M., Lang, C., Peggie, M., Plater, L.A., Cohen, P., 2007. Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem. J.* 404, 179–190. <https://doi.org/10.1042/BJ20061704>
- Xian, X., Håkansson, J., Ståhlberg, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., Semb, H., 2006. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J. Clin. Invest.* 116, 642–651. <https://doi.org/10.1172/JCI25705>
- Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L., Godowski, P.J., 1998. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 395, 284–288. <https://doi.org/10.1038/26239>
- Yang, Y., Andersson, P., Hosaka, K., Zhang, Y., Cao, R., Iwamoto, H., Yang, X., Nakamura, M., Wang, J., Zhuang, R., Morikawa, H., Xue, Y., Braun, H., Beyaert, R., Samani, N., Nakae, S., Hams, E., Dissing, S., Fallon, P.G., Langer, R., Cao, Y., 2016. The PDGF-BB-SOX7 axis-modulated IL-33 in pericytes and stromal cells promotes metastasis through tumour-associated macrophages. *Nat. Commun.* 7, 11385. <https://doi.org/10.1038/ncomms11385>
- Yen, Y.-C., Hsiao, J.-R., Jiang, S.S., Chang, J.S., Wang, S.-H., Shen, Y.-Y., Chen, C.-H., Chang, I.-S., Chang, J.-Y., Chen, Y.-W., 2015. Insulin-like growth factor-independent insulin-like growth factor binding protein 3 promotes cell migration and lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by requirement of integrin β 1. *Oncotarget* 6, 41837–41855. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5995>
- Yonenaga, Y., Mori, A., Onodera, H., Yasuda, S., Oe, H., Fujimoto, A., Tachibana, T., 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. <https://doi.org/10.1159/000087840>
- Yu, H., Yue, X., Zhao, Y., Li, X., Wu, L., Zhang, C., Liu, Z., Lin, K., Xu-Monette, Z.Y., Young, K.H., Liu, J., Shen, Z., Feng, Z., Hu, W., 2014. LIF negatively regulates tumour-suppressor p53 through Stat3/ID1/MDM2 in colorectal cancers. *Nat. Commun.* 5, 5218. <https://doi.org/10.1038/ncomms6218>
- Zhao, X., Bose, A., Komita, H., Taylor, J.L., Chi, N., Lowe, D.B., Okada, H., Cao, Y., Mukhopadhyay, D., Cohen, P.A., Storkus, W.J., 2012. Vaccines targeting tumor blood vessel antigens promote CD8(+) T cell-dependent tumor eradication or dormancy in HLA-A2 transgenic mice. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 1782–1788. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101644>
- Zimmermann, Z., 1923. *Der Feinere Bau der Blutcapillaren*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Zumsteg, A., Christofori, G., 2009. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. *Curr. Opin. Oncol.* 21, 60–70. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32831bed7e>

ANEXOS

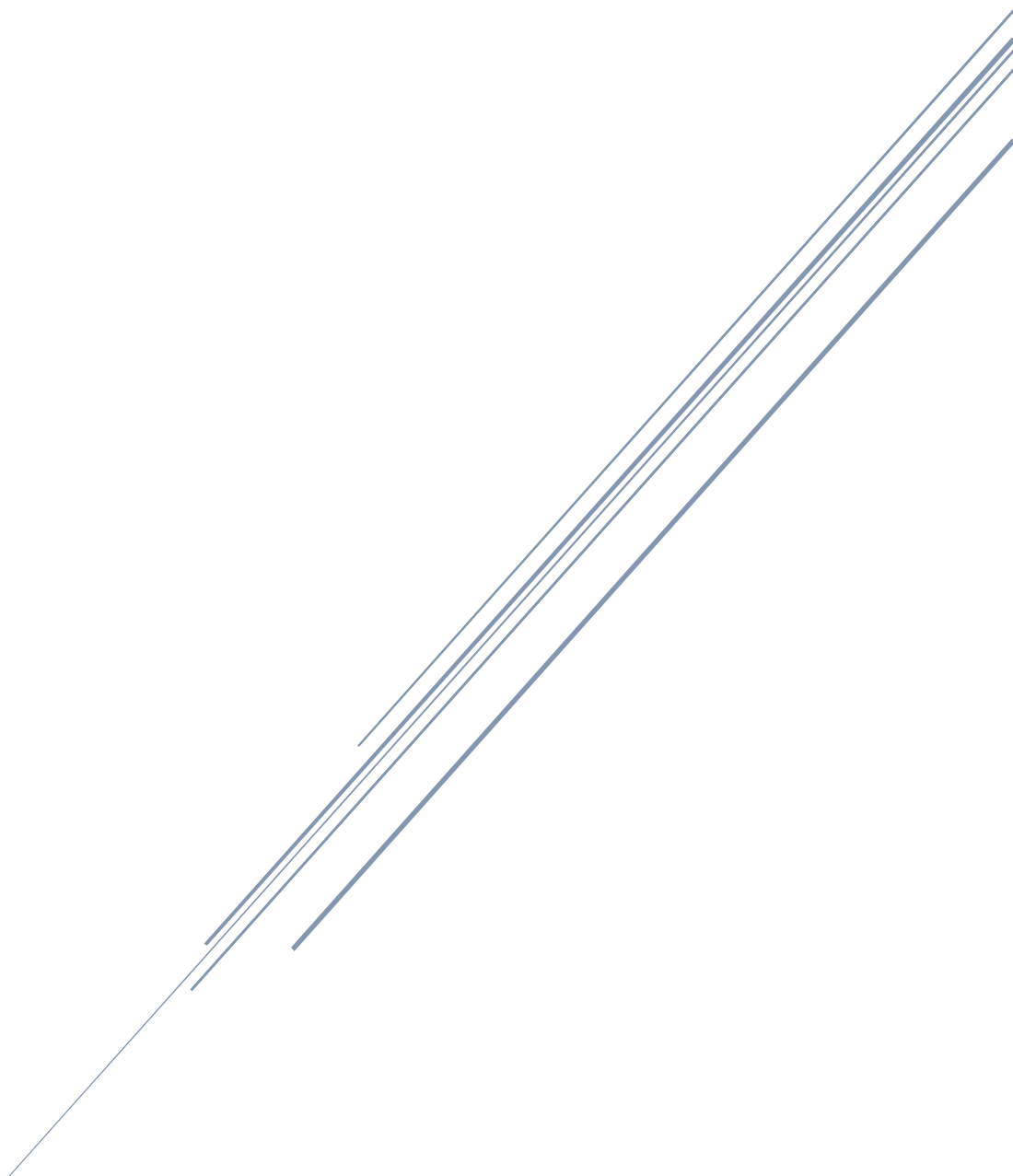


Tabla suplementaria I. Genes significativamente sobreexpresados en pericitos. Genes de la firma molecular P-TBR compartidos con otras células del estroma tumoral.

Probe Set ID	Fold change	FDR	Gene Accession	Gene Symbol
16786587	24,46	8,57E-08	NM_005252	FOS
16949759	5,90	1,75E-06	ENST00000232424	HES1
16912939	5,237	1,16E-03	NR_030374	MIR644A
16787135	4,21	1,16E-02	NM_013231	FLRT2
17078452	4,15	1,43E-04	NM_012258	HEY1
16855127	3,96	2,35E-04	NM_005904	SMAD7
17069816	3,76	4,55E-02	NM_001128205	SULF1
16978354	3,74	9,74E-03	NM_016242	EMCN
16919181	3,63	1,76E-04	NM_001029864	KIAA1755
16695741	3,62	3,96E-03	NM_015441	OLFML2B
17080788	3,59	2,32E-02	NM_058229	FBXO32
16914791	3,31	1,01E-04	NM_005985	SNAI1
17118390	3,255	0,00024	AK021795	MGC24103
16912362	3,11	1,55E-03	NM_181353	ID1
16707631	3,03	4,57E-03	NM_016341	PLCE1
17074259	2,97	2,82E-02	NM_001147	ANGPT2
16835158	2,84	1,12E-04	NM_000212	ITGB3
16986913	2,83	3,48E-04	NM_004385	VCAN
16780592	2,79	3,66E-04	NM_004951	GPR183
16829618	2,66	1,15E-03	NM_001098202	HIC1
16894283	2,61	6,56E-03	NM_138799	MBOAT2
17080648	2,60	9,04E-03	ENST00000303924	HAS2
16884372	2,59	8,50E-03	NM_006343	MERTK
16858710	2,58	6,22E-05	NM_002229	JUNB
16986417	2,50	6,49E-03	ENST00000296677	F2RL1
16703036	2,49	1,04E-02	ENST00000377252	PLXDC2
16784787	2,43	2,04E-03	NM_014992	DAAM1
17052417	2,35	4,01E-02	ENST00000247881	TAS2R4
17096728	2,33	1,12E-04	NM_005502	ABCA1
16967863	2,29	2,10E-03	NM_001657	AREG
17005276	2,29	4,96E-03	NM_003107	SOX4
16742384	2,27	3,81E-03	NM_005512	LRRC32
16802232	2,25	6,22E-05	NR_027654	SMAD6
16906285	2,21	3,46E-02	ENST00000409998	CALCRL
16748888	2,175	1,01E-03	NM_001143821	PLEKHA5
16678518	2,17	3,30E-03	NM_021205	RHOA
16684785	2,13	2,68E-02	NM_001171941	FNDC5
16872551	2,11	1,00E-03	NM_000660	TGFB1
17003640	2,11	2,10E-03	NM_014244	ADAMTS2
17098567	2,08	1,65E-02	NM_170600	SH2D3C
17077051	2,07	8,31E-03	NM_052937	PCMTD1
16888270	2,06	1,33E-02	NM_000885	ITGA4
16917183	2,04	1,22E-02	NM_000214	JAG1
16687875	2,03	1,52E-02	ENST00000371222	JUN
17076634	2,01	5,77E-04	NM_000037	ANK1

El trabajo desarrollado en este periodo de investigación ha generado una serie de resultados que han sido recogidos en publicaciones que están relacionadas directamente con esta Tesis Doctoral y que se adjuntan a continuación. Además, también se han generado otras publicaciones y una patente que no están directamente relacionadas con la Tesis Doctoral que se citan a continuación:

PATENTE

Título: GRANULISINA, MÉTODO DE OBTENCIÓN Y USOS

Número de solicitud: P201830768

Fecha de presentación: 26 Julio 2018

Solicitante: Universidad de Zaragoza

Inventores: Anel, Alberto; Ibañez, Raquel; Guerrero, Patricia; Martinez, Luis; Conde, Blanca; Hurtado, Ramón; Sanz, Laura; **Navarro, Rocío**.

ARTÍCULOS NO RELACIONADOS DIRECTAMENTE CON LA TESIS DOCTORAL

1. Compte M, Harwood SL, Muñoz IG, **Navarro R**, Zonca M, Perez-Chacon G, Erce-Llamazares A, Merino N, Tapia-Galisteo A, Cuesta AM, Mikkelsen K, Caleiras E, Nuñez-Prado N, Aznar MA, Lykkemark S, Martínez-Torrecuadrada J, Melero I, Blanco FJ, Bernardino de la Serna J, Zapata JM, Sanz L, Alvarez-Vallina L. A tumor-targeted trimeric 4-1BB-agonistic antibody induces potent anti-tumor immunity without systemic toxicity. *Nat Commun.* 2018 Nov 15;9(1):4809
2. Harwood SL, Alvarez-Cienfuegos A, Nuñez-Prado N, Compte M, Hernández-Pérez S, Merino N, Bonet J, **Navarro R**, Van Bergen En Henegouwen PMP, Lykkemark S, Mikkelsen K, Mølgaard K, Jabs F, Sanz L, Blanco FJ, Roda-Navarro P, Alvarez-Vallina L. ATTACK, a novel bispecific T cell-recruiting antibody with trivalent EGFR binding and monovalent CD3 binding for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2017 Sep 27;7(1):e1377874
3. Alvarez-Cienfuegos A, Nuñez-Prado N, Compte M, Cuesta AM, Blanco-Toribio A, Harwood SL, Villate M, Merino N, Bonet J, **Navarro R**, Muñoz-Briones C, Sørensen KM, Mølgaard K, Oliva B, Sanz L, Blanco FJ, Alvarez-Vallina L. Intramolecular trimerization, a novel strategy for making multispecific antibodies with controlled orientation of the antigen binding domains. *Sci Rep.* 2016 Jun 27;6:28643
4. Ibañez-Pérez R, Guerrero-Ochoa P, Al-Wasaby S, **Navarro R**, de Miguel D, Tapia-Galisteo A, Gonzalo O, Conde B, Martínez-Lostao L, Hurtado-Guerrero R, Sanz L, Anel A. Anti-tumoral potential of a human granulysin-based, CEA-targeted cytolytic immunotoxin. (EN PREPARACIÓN).

5. Lázaro-Gorines, R.; Ruiz de la Herrán, J.; **Navarro, R.**; Sanz, L.; Álvarez-Vallina, L.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, JG.; Lacadena, J. A novel trimeric immunotoxin targeting colon cancer cells shows significant enhanced antitumor activity. (EN PREPARACIÓN).

ARTÍCULOS RELACIONADOS DIRECTAMENTE CON LA TESIS DOCTORAL

1. **Navarro R**, Compte M, Álvarez-Vallina L, Sanz L. Immune Regulation by Pericytes: Modulating Innate and Adaptive Immunity. *Front Immunol*. 2016 Nov 4;7: 480.
2. **Navarro R**, Delgado-Wicke P, Nuñez-Prado N, Compte M, Blanco-Toribio A, Nuñez G, Álvarez-Vallina L, Sanz L. Role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) in pericyte-mediated vascular inflammation. *J Cell Mol Med*. 2016 May;20(5):980-6.
3. **Navarro R**, Tapia-Galisteo A, Gómez G, Corvacho C, Erce-Llamazares A, Sanchez-Tirado E, Campuzano S, González-Cortés A, Yáñez-Sedeño P, Compte M, Álvarez-Vallina L, Sanz L. Cross-talk with pericytes enhances proliferation, migration, chemoresistance and stemness of colorectal cancer cells through a TGF- β -mediated positive feedback loop. (EN PREPARACIÓN).

Role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) in pericyte-mediated vascular inflammation

Rocío Navarro ^a, Pablo Delgado-Wicke ^a, Natalia Nuñez-Prado ^a, Marta Compte ^a, Ana Blanco-Toribio ^a, Gabriel Nuñez ^b, Luis Álvarez-Vallina ^{a, c}, Laura Sanz ^{a, *}

^a Molecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain

^b Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

^c Immunotherapy and Cell Engineering Laboratory, Department of Engineering, Aarhus University, Aarhus, Denmark

Received: June 3, 2015; Accepted: January 6, 2016

Abstract

We have recently described the response of human brain pericytes to lipopolysaccharide (LPS) through toll-like receptor 4 (TLR4). However, Gram-negative pathogen-associated molecular patterns include not only LPS but also peptidoglycan (PGN). Given that the presence of co-purified PGN in the LPS preparation previously used could not be ruled out, we decided to analyse the expression of the intracellular PGN receptors NOD1 and NOD2 in HBP and compare the responses to their cognate agonists and ultrapure LPS. Our findings show for the first time that *NOD1* is expressed in pericytes, whereas *NOD2* expression is barely detectable. The NOD1 agonist C12-iE-DAP induced *IL6* and *IL8* gene expression by pericytes as well as release of cytokines into culture supernatant. Moreover, we demonstrated the synergistic effects of NOD1 and TLR4 agonists on the induction of *IL8*. Using NOD1 silencing in HBP, we showed a requirement for C12-iE-DAP-dependent signalling. Finally, we could discriminate NOD1 and TLR4 pathways in pericytes by pharmacological targeting of RIPK2, a kinase involved in NOD1 but not in TLR4 signalling cascade. p38 MAPK and NF- κ B appear to be downstream mediators in the NOD1 pathway. In summary, these results indicate that pericytes can sense Gram-negative bacterial products by both NOD1 and TLR4 receptors, acting through distinct pathways. This provides new insight about how brain pericytes participate in the inflammatory response and may have implications for disease management.

Keywords: pericyte • NOD1 • peptidoglycan • TLR4 • lipopolysaccharide • vascular biology • inflammation

Introduction

Pericytes are key components of the microvascular vessel wall and they are essential for the integrity of the blood–brain barrier (BBB) [1]. In contrast to the numerous studies assessing the crosstalk among brain endothelial cells, astrocytes and microglia during inflammation, little is known about the role played by the brain microvascular pericyte. In fact, the response of brain pericytes to pro-inflammatory stimuli has only been addressed in the last few years [2–4]. In a pioneering work, Kovac *et al.* [2] reported the release of nitric oxide and several cytokines by mouse brain pericytes in response to lipopolysaccharide (LPS), the ligand for the pattern recognition receptor (PRR) toll-like receptor 4 (TLR4). More recently, we have documented the expression of TLR4 by human brain pericytes (HBP) and charac-

terized the transcriptional profile of LPS-treated HBP, as well as the signalling cascade beyond TLR4 activation [5]. However, Gram-negative bacteria also contain peptidoglycans (PGN) that are sensed by the PRR nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) 1 and 2 [6, 7]. NOD1 is expressed by cell types of both haematopoietic and non-haematopoietic origin, including endothelial cells, where it has been shown to be critical in sensing pathogens [8] and mediating vascular inflammation [9]. On the other hand, NOD2 is mostly observed in cells of myeloid and lymphoid origin [7].

It has long been known that highly purified bacterial cell wall components are difficult to obtain using conventional isolation procedures. This implies that results of previous studies, in which standard LPS preparations could contain co-purified PGN, might be at least partially because of simultaneous activation of TLR4 and NOD signalling. However, expression of the PGN receptors NOD1 and NOD2 in HBP had not been assessed.

To solve these ambiguities, we pursued the following objectives: a) to study the expression of NOD1 and NOD2 in primary HBP; b) to

*Correspondence to: Laura SANZ.
E-mail: lsalcober@salud.madrid.org

Rocío Navarro and Pablo Delgado-Wicke are co-first authors.

doi: 10.1111/jcmm.12804

investigate the responses to endotoxin-free NOD agonists [10] alone or in synergy with ultrapure, PGN-free LPS; and c) to discriminate TLR4 and NOD signalling pathways in HBP.

Experimental procedures

Cell culture and reagents

Primary HBP (#1200) were purchased from ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, USA), cultured in pericyte medium (PM) (ScienCell Research Laboratories) and used between passages 3 and 5. HBP are positive for α -SMA and express the cell surface markers NG2, PDGFR-beta, CD13, CD73 and CD105 but lack CD31, CD34 and CD45 [5, 11]. Jurkat clone E6-1 (TIB-152) and HL-60 (CCL-240) cells were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). TNF α and IFN γ were obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). LPS-EK Ultrapure from E. coli K12 and C12-iE-DAP were purchased from InvivoGen (San Diego, CA, USA). RIPK2/Src kinase inhibitor PP2 was obtained from Abcam (Cambridge, UK). NF- κ B inhibitor SC514 and MAP kinase inhibitors SP600125 (JNK1-2 inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor) and PD98059 (MEK-1 inhibitor) were all purchased from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Mouse anti-NOD1 monoclonal antibody (clone 626919) was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Rabbit anti-NOD1 polyclonal antibodies orb29777 and sc-99163 were from Biorbyt (Cambridge, UK) and Santa Cruz Biotechnology respectively.

RNA extraction and cDNA synthesis

HBP were treated with TNF α (50 ng/ml) or with IFN γ (100 ng/ml) for 20 hrs to assess *NOD1* and *NOD2* gene modulation. To study HBP activation, cells were cultured in the presence of C12-iE-DAP (5 μ g/ml) or LPS (100 ng/ml) for 6 hrs. In synergy experiments, HBP were treated simultaneously with C12-iE-DAP (1 μ g/ml) and LPS (5 ng/ml) for 6 hrs. To analyse the effect of PP2 on HBP, cells were incubated with the inhibitor (0.01–10 μ M) for 30 min. before adding C12-iE-DAP (1 μ g/ml) or LPS (50 ng/ml) for 6 hrs. Total RNA was isolated using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) and cDNA was obtained using NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (Nzytech, Lisboa, Portugal).

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

The following primers were used: human *NOD1* forward 5'- AAGCG AAGAGCTGACCAATAC -3' and reverse 5'- TCCCAGTTAAGATGCGTG AG-3' and human *NOD2* forward 5'- ATCGAGCTGTACCTGAGGAAG -3' and reverse 5'- GACACCATCCATGAGAAGACAG -3'. Primers for IL6, IL8 and SDHA were as previously described [5]. All primer sequences were synthesized by Roche Diagnostics (Sant Cugat del Vallés, Spain). qRT-PCR was performed with a LightCycler 480 apparatus (Roche Diagnostics) using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche Diagnostics). The level of target gene expression was normalized against SDHA expression. Relative expression of each mRNA was calculated by the Δ CT method as previously reported [5].

NOD1 flow cytometry

HBP and Jurkat cells were intracellularly stained using the IntraCell kit (Immunostep, Salamanca, Spain) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated with the rabbit anti-NOD1 polyclonal antibody at a dilution of 1:40 for 30 min., followed by 1:100 donkey anti-rabbit PE-conjugated secondary antibody (#ab7007, Abcam) and analysed using an EPICS XL flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA).

NOD1 immunocytofluorescent staining

Cells seeded onto cell chamber slides (Nunc, Roskilde, Denmark) were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.1% Triton X100 for 10 min. and incubated with the mouse anti-NOD1 monoclonal antibody (10 μ g/ml) for 1 hr. Then, HBP were incubated with 1:500 goat antimouse secondary antibody, Alexa Fluor[®] 488 conjugated (#a1101, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 hr. Finally, nuclei were stained with TO-PRO (Invitrogen). Fluorescence images were captured with a confocal laser scanning microscope TCS SP5 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

ELISA

IL8 release was measured in supernatants from the same cells used for RNA isolation with the Human CXCL8/IL8 DuoSet kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

NOD1 silencing

For NOD1 knock-down, cells were infected with control copGFP lentiviral particles (Santa Cruz, #sc-108084), control shRNA lentiviral particles (Santa Cruz, #sc-108080) encoding a scrambled shRNA sequence or NOD1 shRNA(h) lentiviral particles (Santa Cruz, #sc-37279-V) containing three different constructs each encoding target-specific shRNA. On day 0, HBP were seeded on a 24-well plate in PM. On day 1, lentiviral particles were added (MOI 7) and incubated overnight. On day 2, cells were selected with 250 ng/ml puromycin (Santa Cruz, sc-108071). Infection efficiency was monitored by GFP fluorescence and was nearly 90%. At day 4, cells were used for C12-iE-DAP (1 μ g/ml) stimulation experiments.

NOD1 Western blotting

Cells were lysed in Laemmli-lysis buffer (Bio-Rad, CA, USA) for 10 min. on ice and collected by scraping. Equal amounts of proteins were resolved on 8% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membrane using iBlot Dry Blotting System (Invitrogen Life Technologies). Membranes were incubated ON with 0.8 μ g/ml of anti-human NOD1 (sc-99163) rabbit polyclonal antibody, followed by IRDye800-conjugated donkey anti-rabbit antibody, diluted 1:5000 (Rockland Immunochemicals, PA, USA). Simultaneously, anti α -tubulin mouse monoclonal antibody (T9026, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added, diluted 1:2000, as a loading control, followed by IRDye700-conjugated donkey antimouse antibody diluted 1:5000 (Rockland Immunochemi-

cal). Visualization and quantitative analysis of protein bands were carried out with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation (S.D.). The data were evaluated using the Student's *t*-test and in some cases by two-way ANOVA with Bonferroni correction. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Expression of NOD1 and NOD2 in human brain pericytes

To further characterize the PRR repertoire in HBP, first we analysed gene expression of *NOD1* and *NOD2* by qRT-PCR (Fig. 1A). *NOD1* was clearly detectable, but *NOD2* was expressed at comparatively lower levels. HL60 cells were used as a positive control of *NOD2* (Fig. 1A, inset).

It has been reported that *NOD1* and *NOD2* expression could be induced by different stimuli, including $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$, in cell types such as intestinal epithelial cells and keratinocytes [12]. After stimulation with 50 ng/ml $\text{TNF}\alpha$, *NOD1* was significantly increased in HBP ($P < 0.01$), but up-regulation was more evident with 100 ng/ml $\text{IFN}\gamma$ ($P < 0.001$) (Fig. 1A).

Intracellular FACS analysis revealed that *NOD1* was expressed at protein level (Fig. 1B). Furthermore, the subcellular distribution of *NOD1* was determined after immunocytofluorescence staining under the confocal microscope. *NOD1* was constitutively expressed intracellularly, but not on the cell surface, showing a diffuse cytoplasmic pattern (Fig. 1C).

NOD1 and TLR4 synergize to elicit a pro-inflammatory response

Next, we addressed whether *NOD1* signalling pathway was functional in HBP. To investigate the effect of its agonist C12-iE-DAP on the expression of pro-inflammatory mediators, total RNA from unstimulated or C12-iE-DAP-treated HBP was analysed for *IL6* and *IL8* expression by qRT-PCR. We compared *IL6* and *IL8* gene modulation by C12-iE-DAP with that of ultrapure LPS, not contaminated by other bacterial pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).

Both C12-iE-DAP and ultrapure LPS induced significant increases in *IL6* (Fig. 2A) and *IL8* (Fig. 2B) gene expression. The up-regulation with both agonists was more evident for *IL8* than for *IL6*, as previously reported in HBP treated with standard LPS preparations [5]. Then, we studied *IL8* protein production in the supernatant of the same HBP used for RNA isolation. As shown in

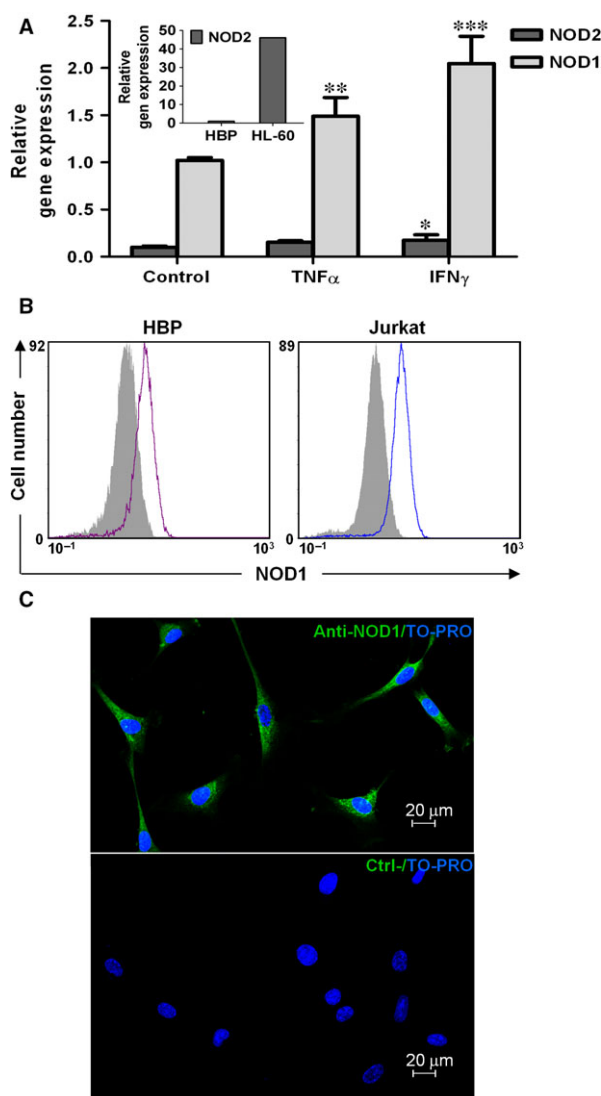


Fig. 1 *NOD1* and *NOD2* expression by human brain pericytes. (A) Primary HBP were stimulated with $\text{TNF}\alpha$ (50 ng/ml) or $\text{IFN}\gamma$ (100 ng/ml) for 20 hrs, and *NOD1* and *NOD2* gene expression was analysed using qRT-PCR. Data shown are means \pm standard deviation (S.D.) of triplicates of two independent experiments ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). HL60 cells were used as a *NOD2* positive control (insert). (B) FACS analysis of intracellular *NOD1* expression in unstimulated HBP and Jurkat cells (positive control). Solid grey curves show negative controls in which the primary antibody was omitted. (C) Immunocytofluorescence staining of *NOD1*, detected in the cytoplasm of unstimulated HBP (top), compared to a negative control in which the same cells are incubated without primary antibody (bottom).

Figure 2C, HBP exhibit basal secretion of *IL8* without stimuli as assessed by ELISA. Consistent with the RNA results, both C12-iE-DAP and ultrapure LPS induced a statistically significant increase in *IL8* release (Fig. 2C). As emerging evidence suggests cooperative

effects of PRR, we also addressed the outcome of combined triggering of NOD1 and TLR4 in HBP, using low concentrations of their respective agonists. When cells were stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ C12-iE-DAP or 5 ng/ml LPS, there was a moderate (although statistically significant) increase in the levels of *IL8* mRNA. However, when HBP were costimulated with C12-iE-DAP and LPS at the same concentrations, there was a marked synergistic increase in *IL8* gene expression (Fig. 2D). Interestingly, simultaneous treatment with 5 ng/ml LPS and C12-iE-DAP permitted the induction of higher amounts of IL8 RNA than those obtained with a high dose (100 ng/ml) of LPS alone (Fig. 2B).

Effect of NOD1 silencing

To further assess the role of NOD1 in C12-iE-DAP-mediated gene induction, we used shRNA to knock-down NOD1 expression. Expression of the NOD1 shRNA in HBP resulted in a distinct decrease ($>69\%$, $P < 0.001$) of *NOD1* gene expression as assessed by qRT-PCR (Fig. 3A). The down-regulation of NOD1 mRNA was paralleled with a decrease in NOD1 protein content in Western blot (Fig. 3B). Densitometric analysis of protein bands showed a knock-down efficiency $>63\%$. Moreover, treatment of these cells with C12-iE-DAP revealed a statistically significant reduction ($>62\%$, $P < 0.001$) of *IL8* induction (Fig. 3C). These data confirm that C12-iE-DAP-mediated *IL8* up-regulation in HBP requires functional NOD1.

Effect of the RIPK2 inhibitor PP2 on NOD1- and TLR4-mediated responses

NOD1 receptor signalling occurs *via* receptor-interacting RIPK2 [13], but the functionality of this pathway in HBP had not been previously studied. To further discriminate NOD1 and TLR4 responses in HBP, we used PP2, a potent inhibitor of RIPK2 [14]. HBP were pre-treated for 30 min. with increasing concentrations of PP2, ranging from 0.01 μM to 10 μM , and then were stimulated with C12-iE-DAP or ultrapure LPS. Treatment of HBP with PP2 resulted in a concentration-dependent inhibition of C12-iE-DAP-induced *IL8* gene up-regulation, as assessed by qRT-PCR. However, inhibition of RIPK2 had no effect on LPS-induced *IL8* modulation when compared to the non-PP2-treated controls, demonstrating a selective inhibition of the NOD1 signalling cascade (Fig. 4A).

NOD1 downstream mediators in C12-iE-DAP-mediated responses

In additional studies to evaluate which of previously established downstream signalling components of NOD1 pathway were relevant to *IL8* up-regulation, HBP were treated with 10 μM SC-514 (NF- κB inhibitor), 10 μM SB203580 (p38 inhibitor), 10 μM SP600125 (JNK1-2 inhibitor) or 10 μM PD98059 (MEK-1 inhibitor) for 30 min. and then stimulated with C12-iE-DAP (1 $\mu\text{g/ml}$). As shown in Fig. 4B,

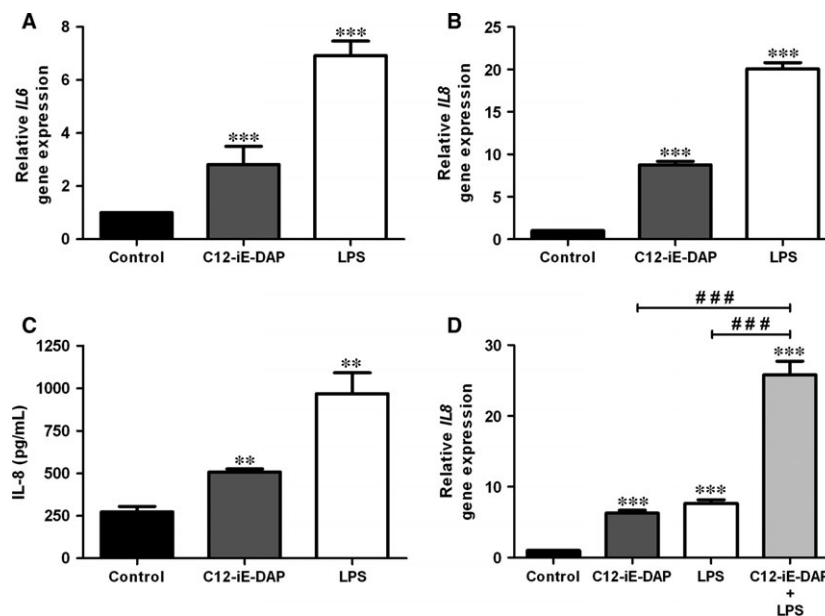


Fig. 2 Effect of NOD1 activation in human brain pericytes. HBP were stimulated with C12-iE-DAP (5 $\mu\text{g/ml}$) or ultrapure LPS (100 ng/ml) for 6 hrs and *IL6* (A) and *IL8* (B) gene expression was analysed using qRT-PCR. (C) In parallel, secretion of IL8 was assessed in cell culture supernatants by ELISA. (D) C12-iE-DAP (1 $\mu\text{g/ml}$) and LPS (5 ng/ml) synergistically enhanced *IL8* gene expression by HBP. Results are expressed as means \pm standard deviation (S.D.) of triplicates of three independent experiments. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ -versus non-stimulated control; ### $P < 0.001$ -versus C12-iE-DAP or LPS alone).

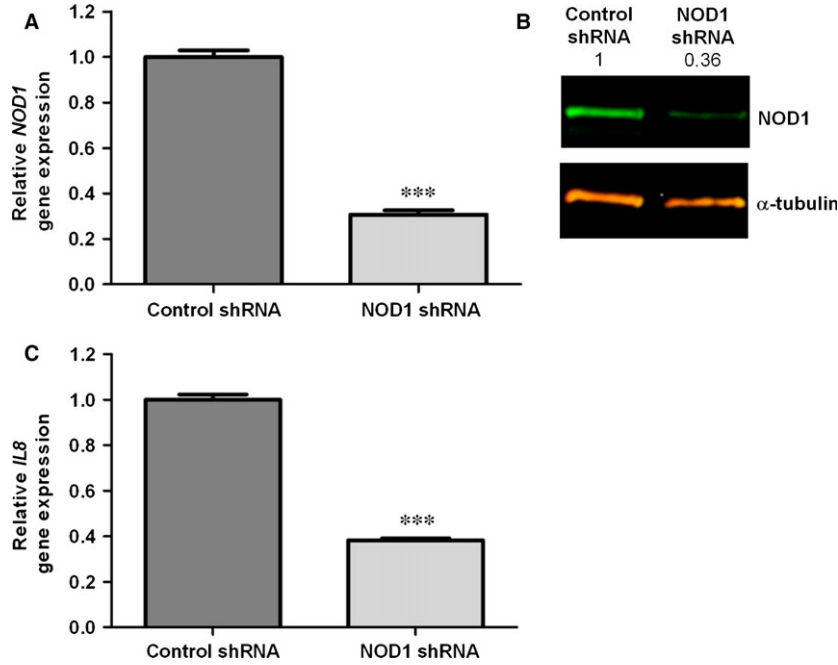


Fig. 3 Knock-down of NOD1 abrogates C12-iE-DAP response. **(A)** The knock-down efficiency of HBP transduced with NOD1 shRNA or control shRNA lentiviral particles was assessed by qRT-PCR. **(B)** Western blot analysis was used to verify knock-down of NOD1. Alpha-tubulin was used as a loading control. Numbers indicate the expression fold change relative to the loading control. **(C)** NOD1 and control shRNA expressing HBP were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ C12-iE-DAP for 6 hrs. Data are presented as fold change of *IL8* expression compared to non-stimulated cells. Data represent mean \pm standard deviation (S.D.) of three independent experiments, each performed in triplicates. (***) $P < 0.001$.

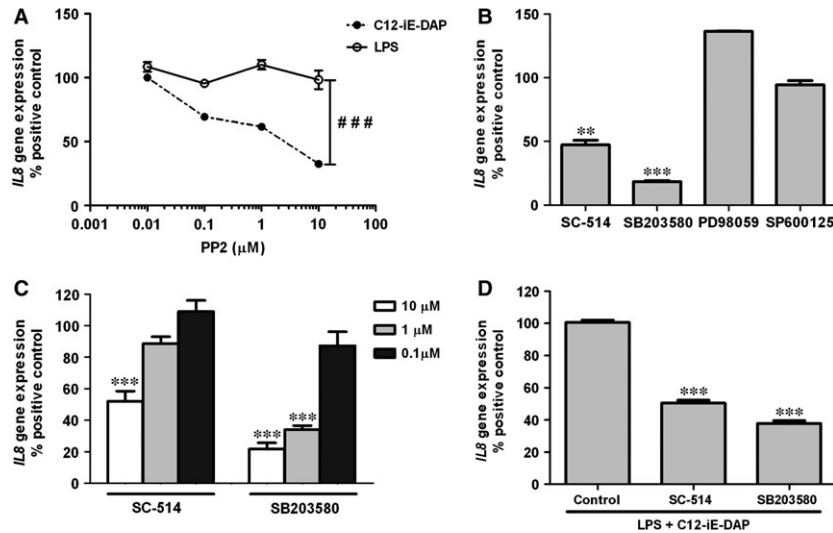


Fig. 4 Role of RIPK2, NF- κ B and MAP kinases on NOD1-mediated responses. **(A)** HBP were incubated with different concentrations of PP2 ranging from 0.01 μM to 10 μM for 30 min. prior to treatment with LPS (50 ng/ml) or with C12-iE-DAP (1 $\mu\text{g/ml}$) and analysed for *IL8* gene expression. Results are expressed as a percentage of response to the agonist alone versus non-stimulated controls (### $P < 0.001$). **(B)** Effect of pre-treatment with the inhibitors SB203580 (p38 inhibitor), SC-514 (NF- κ B inhibitor), SPS00125 (JNK inhibitor) and PD98059 (MEK-1 inhibitor) at 10 μM on response to C12-iE-DAP (1 $\mu\text{g/ml}$). **(C)** Dose-dependent effect of SB203580 and SC-514 (0.1–10 μM) on HBP activation by C12-iE-DAP. **(D)** Synergistic effects of C12-iE-DAP+LPS were inhibited by SB203580 and SC-514. HBP were pre-treated with 10 μM SB203580 or SC-514 prior to stimulation with C12-iE-DAP (1 $\mu\text{g/ml}$) and LPS (5 ng/ml). Data are expressed as mean \pm standard deviation (S.D.) and represent three independent experiments, each performed in triplicates (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

pre-incubation of HBP with SP600125 or PD98059 did not impair *IL8* expression. However, addition of the p38 or NF- κ B inhibitors to cultures resulted in statistically significant inhibition of C12-iE-DAP-induced *IL8* up-regulation ($P < 0.001$ and $P < 0.01$ respectively). This inhibition was dose dependant as assessed using a 0.1–10 μ M range of each compound (Fig. 4C). Increase in *IL8* mRNA levels was only significantly inhibited at the highest concentration of SC-514. On the contrary, SB203580 had a potent effect at lower concentrations ($P < 0.001$ at 1 μ M). When 10 μ M SC-514 or 10 μ M SB203580 were added prior to simultaneous activation with LPS and C12-iE-DAP, the synergistic effect on *IL8* up-regulation was abolished in similar percentages (Fig. 4D).

Discussion

HBP occupy a strategic position at the interface between blood and the brain to initiate inflammatory processes as a response to systemic infection or blood-borne PAMPs. Indeed, HBP seem to be well equipped to do so with a growing array of PRR. We have previously reported the expression of TLR4 by HBP; here, we show for the first time that the intracellular receptor NOD1 is functionally expressed in HBP and it is required for recognition of the PGN moiety C12-iE-DAP.

It has been long known that the mechanism of NOD1 activation in monocytes and macrophages involves RIPK2. Taking advantage of the fact that the TLR4 pathway is not dependent on RIPK2 [15], we were able to discriminate TLR4 and NOD1 signalling in HBP by pharmacological targeting of RIPK2 using the specific inhibitor PP2. Therefore, we have demonstrated that both pathways are functional in HBP, and could rule out that the effect observed with a standard LPS preparation in our previous work was because of co-purified PGN. Interestingly, TLR4 and NOD1 downstream mediators also offer a distinct pattern. In the HBP response to C12-iE-DAP, p38 and to a lesser extent NF- κ B seem to be involved. On the other hand, we have recently described that NF- κ B signalling pathway, but not p38, is activated by LPS in HBP [5]. It has been reported that NOD1 and NOD2 agonists significantly enhanced *in vitro* TLR-induced cytokine

secretion by monocytes and dendritic cells [16]. Although the effect of C12-iE-DAP in HBP was comparatively weak in relation with that of ultrapure LPS, a synergistic effect was observed upon simultaneous treatment with C12-iE-DAP and suboptimal concentrations of LPS that induced more *IL8* up-regulation than high-dose LPS alone. However, the molecular mechanisms responsible for this crosstalk between PRRs are not well known. Pre-treatment with p38 or NF- κ B inhibitors of HBP simultaneously stimulated with LPS and C12-iE-DAP confirmed the involvement of both pathways in the synergistic effect.

Recent reports have documented the activation of pericytes by pro-inflammatory factors released by 'professional' immune cells, such as IFN γ , TNF α and IL1 β [3, 4]. Indeed, *NOD1* expression is up-regulated by IFN γ and TNF α in HBP. Beyond this passive role in the amplification of inflammatory responses, expression of functional TLR4 and NOD1 suggests that brain pericytes are endowed with the capacity of sensing PAMPs, directly contributing to the onset of innate immune responses. Release of cytokines and chemokines by pericytes may trigger paracrine and autocrine signalling pathways contributing to BBB disruption, being this a feature not only of brain inflammation but also of early neurodegenerative disorders. Drugs modulating the pro-inflammatory activity of pericytes may provide a novel strategy to restore BBB integrity and reduce brain injury in a variety of pathological conditions.

Acknowledgements

This study was funded by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI13/00090), Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, AES 2013, partially supported by European Regional Development FEDER funds, and Comunidad de Madrid (S2010-BMD-2312) to L.S. and Ministerio de Economía y Competitividad (BIO2011-22738) to L.A-V.

Conflict of interest

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

References

1. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011; 21: 193–215.
2. Kovac A, Erickson MA, Banks WA. Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation*. 2011; 8: 139.
3. Pieper C, Marek JJ, Unterberg M, et al. Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS *in vitro*. *Brain Res*. 2014; 1550: 1–8.
4. Jansson D, Rustenhoven J, Feng S, et al. A role for human brain pericytes in neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2014; 11: 104.
5. Guijarro-Muñoz I, Compte M, Álvarez-Cienfuegos A, et al. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF- κ B signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *J Biol Chem*. 2014; 289: 2457–68.
6. Caruso R, Warner N, Inohara N, et al. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*. 2014; 41: 898–908.
7. Philpott DJ, Sorbara MT, Robertson SJ, et al. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14: 9–23.
8. Gatheral T, Reed DM, Moreno L, et al. A key role for the endothelium in NOD1 mediated vascular inflammation: comparison to TLR4 responses. *PLoS ONE*. 2012; 7: e42386.
9. Nishio H, Kanno S, Onoyama S, et al. Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31: 1093–9.
10. Chamailard M, Hashimoto M, Horie Y, et al. An essential role for NOD1 in host

- recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003; 4: 702–7.
11. **Guijarro-Muñoz I, Cuesta AM, Alvarez-Cienfuegos A, et al.** The axonal repellent Slit2 inhibits pericyte migration: potential implications in angiogenesis. *Exp Cell Res.* 2012; 318: 371–8.
 12. **Harder J, Núñez G.** Functional expression of the intracellular pattern recognition receptor NOD1 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2009; 129: 1299–302.
 13. **Kobayashi K, Inohara N, Hernandez LD, et al.** RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature.* 2002; 416: 194–9.
 14. **Windheim M, Lang C, Peggie M, et al.** Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem J.* 2007; 404: 179–90.
 15. **Park J-H, Kim Y-G, McDonald C, et al.** RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol.* 2007; 178: 2380–6.
 16. **Selvanantham T, Escalante NK, Cruz Tleugabulova M, et al.** Nod1 and Nod2 enhance TLR-mediated invariant NKT cell activation during bacterial infection. *J Immunol.* 2013; 191: 5646–54.



Immune Regulation by Pericytes: Modulating Innate and Adaptive Immunity

Rocío Navarro¹, Marta Compte¹, Luis Álvarez-Vallina^{1,2} and Laura Sanz^{1*}

¹Molecular Immunology Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid, Spain, ²Immunotherapy and Cell Engineering Laboratory, Department of Engineering, Aarhus University, Aarhus, Denmark

OPEN ACCESS

Edited by:

Masoud H. Manjili,
Virginia Commonwealth University
Massey Cancer Center, USA

Reviewed by:

Arya Biragyn,
National Institute on Aging, USA
Xiang-Yang Wang,
Virginia Commonwealth University
Massey Cancer Center, USA

*Correspondence:

Laura Sanz
lsalcober@salud.madrid.org

Specialty section:

This article was submitted
to Cancer Immunity and
Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 09 September 2016

Accepted: 20 October 2016

Published: 04 November 2016

Citation:

Navarro R, Compte M,
Álvarez-Vallina L and Sanz L
(2016) Immune Regulation by
Pericytes: Modulating Innate
and Adaptive Immunity.
Front. Immunol. 7:480.
doi: 10.3389/fimmu.2016.00480

Pericytes (PC) are mural cells that surround endothelial cells in small blood vessels. PC have traditionally been credited with structural functions, being essential for vessel maturation and stabilization. However, an accumulating body of evidence suggests that PC also display immune properties. They can respond to a series of pro-inflammatory stimuli and are able to sense different types of danger due to their expression of functional pattern-recognition receptors, contributing to the onset of innate immune responses. In this context, PC not only secrete a variety of chemokines but also overexpress adhesion molecules such as ICAM-1 and VCAM-1 involved in the control of immune cell trafficking across vessel walls. In addition to their role in innate immunity, PC are involved in adaptive immunity. It has been reported that interaction with PC anergizes T cells, which is attributed, at least in part, to the expression of PD-L1. As components of the tumor microenvironment, PC can also modulate the antitumor immune response. However, their role is complex, and further studies will be required to better understand the crosstalk of PC with immune cells in order to consider them as potential therapeutic targets. In any case, PC will be looked at with new eyes by immunologists from now on.

Keywords: pericytes, innate immunity, inflammation, adaptive immunity, tumor microenvironment

INTRODUCTION

Pericytes (PC) were first described 145 years ago by Carl Joseph Eberth and “rediscovered” 2 years later by Charles-Marie Benjamin Rouget. They were given their current name by Karl Wilhelm Zimmermann in 1923 (1), due to their location wrapping around capillaries and postcapillary venules. However, they remain elusive cells with intriguing properties that have only recently attracted the attention of numerous researchers. This is due, in part, to the relatively low numbers of PC in most tissues (with the CNS being an exception) and exacerbated by the absence of truly unique markers, increasing the difficulty of isolating pure primary PC. In fact, cultured human PC have not been readily available until a few years ago, which explains the sparse data available on PC compared to the far more characterized endothelial cells (EC) (2).

To make the picture more complex, PC are heterogeneous in terms of phenotype, distribution, and embryonic origin. Markers used to identify PC include PDGF receptor- β (PDGFR- β), nerve-glia antigen-2/chondroitin sulfate proteoglycan 4 (NG2), the regulator of G-protein signaling-5 (RGS5), α -smooth muscle actin (α SMA), desmin, aminopeptidase N (CD13), endoglin (CD105), the adhesion molecule CD146, and many others (3). However, not all PC express every single

marker; their expression is dynamic and varies between organs, developmental stages, activation/maturation state, and across individual microvascular networks. Neither are most of these markers found exclusively on PC (4). Moreover, it has been suggested that PC and vascular smooth muscle cells (VSMC) that surround larger vessels represent phenotypic variants of a continuous population of mural cells (5).

Initially, light and electron microscopy were the only techniques able to visualize them, and PC distinct from other perivascular cells could not be identified precisely. However, definition of PC by criteria that requires ultrastructural analysis for identification is not practical (6). Currently, at least two markers (positive reactivity to both PDGFR- β and NG2 being widely accepted) as well as morphology and cell location (in close contact with EC, embedded in the same basement membrane) are required to unequivocally distinguish PC from other mesenchymal cells (7). The use of transgenic mouse models fluorescently labeling PC [e.g., NG2-dsRed (8), the inducible NG2-CreERT2-eGFP (9), α SMA-GFP or α SMA-mCherry (10), and the double-transgenic nestin-GFP/NG2-DsRed mouse (11)] may be essential for studying the fate of PC under different conditions.

Pericytes have a well-known role in angiogenesis and vascular homeostasis, participating in guidance of the endothelial tip cells and vessel maturation and stabilization (12, 13). The initial stage of angiogenesis begins with PC-EC detachment and basement membrane degradation, followed by EC migration and proliferation and subsequent EC tube assembly and vessel stabilization by newly recruited PC (14). Recent studies support the notion that PC-mediated signaling may also be crucial for the growth phase of angiogenesis: PC may act as pioneers in the angiogenic sprout, creating pathways for guiding migrating EC (15).

Several signaling pathways have been characterized in the PC-EC crosstalk, including PDGF-B/PDGFR- β , TGF- β /ALK1/5, angiopoietin-1/Tie-2, and Jag1/Notch3 (16). Their role in the regulation of flow rate is more controversial (17), although discrepancies may be due to the lack of a clear definition of PC subpopulations (18). But PC not only provide structural support to EC, as it was classically assumed. Recently, several works have endowed PC with unexpected mesenchymal stem cell (MSC)-like properties. PC can express MSC markers and behave like MSC both *in vitro* and *in vivo*. Conversely, MSC have been attributed a perivascular origin (19) and can exhibit a PC-like behavior (20). They have also a role in cancer biology, where they participate in tumor angiogenesis and metastasis (21). However, PC have received far less credit as being immune regulators.

Rapidly expanding insights into their physiological and pathological functions have attracted the attention of many research groups. Beyond the field of angiogenesis research, PC have been mainly in the focus of neuroscientists, because of their central role in blood-brain barrier maintenance and the implication of their loss in diabetic retinopathy (13, 22). The PC "avatars" in the liver (hepatic stellate cells) and kidney (mesangial cells) have also received attention due to their role in fibrosis. Here, we aim to make these elusive cells mostly appealing for the community of immunologists.

ARE PERICYTES NON-PROFESSIONAL MACROPHAGE-LIKE CELLS?

Pioneering studies suggested that PC do not represent mere bystanders in the inflammatory response, but display macrophage-like, non-professional antigen-presenting cell (APC) characteristics, suggesting possible participation in immune responses (23–25). In 1999, a comprehensive review summarized the knowledge about the potential role of brain PC (mainly of rodent origin) as macrophage-like cells (26). PC macrophage markers reported by different groups included CD4, major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, CD45 (leukocyte-common antigen), Fc receptors, scavenger receptors, CD11b (alpha chain of the integrin Mac-1/CR3), the pan-macrophage marker CD68 (ED1), and the M2-polarized-specific marker CD163 (ED2) (23, 27–29). Among the macrophage-like properties of PC, pinocytosis and phagocytosis were documented. In this way, they could contribute to the removal of toxic cellular by products from the microcirculation. Very early *in vivo* studies (30, 31) had demonstrated accumulation of tracer particles in PC after systemic administration, which is suggestive of their phagocytic ability. Much later, phagocytic activity was confirmed in cultured primary rat PC using opsonized beads (23).

Macrophages are classical APC, which, in addition to MHC class II molecules, express co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86. Non-professional APC that only express MHC class I molecules may function as APC after induction of MHC class II molecules expression by interferon-gamma (IFN- γ). Indeed, brain PC treated with IFN- γ expressed MHC class II molecules and acquired the capacity to present antigen to primed syngeneic T lymphocytes from rats immunized with myelin basic protein or ovalbumin (32). T cell proliferation was antigen specific and MHC class II dependent because an irrelevant antigen failed to induce incorporation of labeled thymidine and non-activated PC did not support it. The PC proliferative response was comparable to that produced by syngeneic APC and was dose and ratio dependent. Previously, cells referred to as smooth muscle/PC have been shown to selectively induce the Ag-specific activation of different Th1 clones, reflected by cell proliferation and production of IL-2 (33).

However, some of these pioneering findings have been questioned as clear-cut identification of PC was not provided, and the results might rather be attributed to perivascular macrophages (34). Controversy had already appeared in early studies using transmission electron microscopy that distinguished perivascular cells, which ingested carbon particles, from PC, which did not. The results of this study suggested that at least some perivascular cells remain distinct from PC (35).

More recent studies have reported that isolated porcine brain PC do not express MHC class II molecules under basal conditions, but IFN- γ can induce its mRNA (36) and protein expression (37). In a mouse model of PDGFR- β gain-of-function, activation of brain PC prompted the expression of immunoregulatory genes, including MHC class II molecules, Fc γ receptors and proteasome subunits as PSME1 (38). IFN- γ also upregulated CD68 mRNA, and both IFN- γ and TNF- α increased the phagocytosis of latex

beads in SMA⁺, desmin⁺, CD90⁺, and NG2⁺ pig brain PC (36). On the other hand, PC phagocytic ability was attenuated by TGF-β1, possibly through downregulation of the scavenger receptors CD36, CD47, and CD68 (39).

However, in a recent work, pretreatment with different stimuli, including IFN-γ, failed to induce an APC-like phenotype in human PC from various origins (placenta, brain, and CD146⁺, CD105⁺ pluripotent stem cell-derived). PC constitutively expressed MHC class I but not MHC class II or the co-stimulatory molecules CD80 or CD86. As previously described, incubation of cultured PC with IFN-γ induced the expression of MHC class II by all types of PC. On the contrary, IFN-γ did not stimulate the expression of CD80 or CD86 and did not significantly affect the proliferation of CFSE-labeled CD4⁺ T cells in comparison with untreated PC (40).

In summary, more studies are needed to establish the role of PC as macrophage-like cells, once unequivocal identification is warranted.

PERICYTE RESPONSE TO PRO-INFLAMMATORY CUES

It is well known that activated EC can secrete a plethora of cytokines and chemokines that are important in potentiating inflammatory responses (41). Numerous *in vitro* studies have shown that EC secrete CXC (CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11), CC (CCL2, CCL3, CCL5, CCL7), and CX3C chemokines in response to various inflammatory stimuli. These studies correlate with *in vivo* studies demonstrating a role for these endothelial-derived chemokines in mediating leukocyte recruitment during various inflammatory conditions (42).

Similarly, PC of multiple origins have been reported to secrete a plethora of chemokines and cytokines in response to pro-inflammatory stimuli released by professional innate immune cells, mainly TNF-α, IL-1β, and IFN-γ (Table 1). Interestingly, human PC have recently been shown to be much more responsive than human EC to IL-17 stimulation in producing pro-inflammatory molecules (43). Commonly upregulated pro-inflammatory factors include: CXCL8, IL-6, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, and CXCL10. These cytokines and chemokines may be important in potentiating inflammatory responses by inducing cytokine secretion by other cells and recruiting immune cells to the site of inflammation. CXCL8 and CXCL1 bind to both receptors CXCR1 and CXCR2, expressed mainly by neutrophils. Of note, IL-17-stimulated PC not only overexpressed CXCL8 but also induced neutrophil synthesis of TNF-α, IL-1α, IL-1β, and CXCL8 (43). CCR2, the CCL2 receptor, is expressed mainly by monocytes. CXCR3 is the CXCL10 receptor, involved in Th1, CD8, and NK cell trafficking. CCL3 and CCL5 bind to CCR1 and CCR5 and modulate monocyte, macrophage, Th1, CD8, and NK cell migration (44). Therefore, all these cell types may be lured by activated PC to a site of inflammation (Figure 1).

Chemokines produced by PC also have a key role in inflammation-associated angiogenesis. CXCL1 and CXCL8 belong to the CXC chemokine subgroup with glutamic acid–leucine–arginine (the ELR motif) immediately proximal to the CXC sequence,

TABLE 1 | Cytokines, chemokines, and adhesion molecules expressed by pericytes in response to pro-inflammatory stimuli.

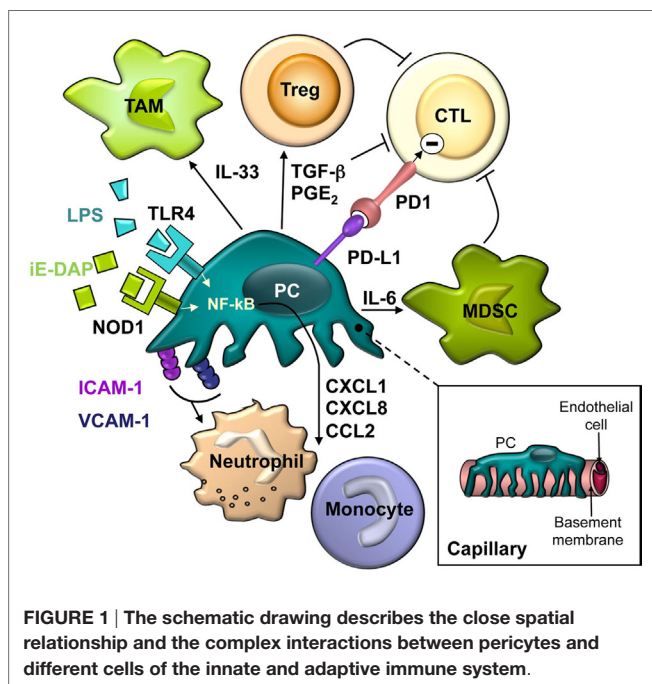
	Stimuli	Cell source	Reference
Cytokine/chemokine			
CCL2/MCP-1	LPS	HBP	(45)
	TNF-α, IL-1β, LPS	HBP	(47)
	LPS, TNF-α	HPP	(49)
	TNF-α	RBP	(51)
	TNF-α, IL-1β	HRP	(46)
	IL-1β	HBP	(48)
CCL3/MIP-1α	IL-1β	HBP	(39)
	LPS, IFN-γ	HBP	(53)
	LPS	MBP	(55)
	TNF-α	RBP	(51)
CCL4	TNF-α, IL-1β	HRP	(46)
	LPS	MBP	(55)
CCL5/RANTES	TNF-α	RBP	(51)
	HCMV	HBP	(54)
CCL11/eotaxin	TNF-α, IL-1β	HRP	(46)
	LPS	MBP	(55)
CXCL1/GROα/KC	TNF-α	HRP	(60)
	LPS	HBP	(45)
	LPS, TNF-α	HPP	(49)
CXCL10/IP-10	TNF-α	MMP	(61)
	TNF-α	RBP	(51)
	TNF-α, IL-1β, LPS	HBP	(47)
	TNF-α	RBP	(51)
	IFN-γ	HBP	(37)
CXCL11	HCMV	HBP	(54)
	IL-1α	HBP	(39)
CX3CL1	LPS	MBP	(55)
	TNF-α, IL-1β	HRP	(46)
G-CSF	TNF-α	HBP	(52)
	LPS	MBP	(55)
GM-CSF	TNF-α, IL-1β	HRP	(46)
	LPS	MBP	(55)
IFN-γ	LPS	MBP	(55)
	TNF-α	RBP	(51)
IL-1α	LPS	RBP	(60)
	High glucose	BRP	(62)
IL-2	TNF-α	RBP	(51)
	TNF-α	RBP	(51)
IL5	LPS	HBP	(45)
	TNF-α	RBP	(51)
IL-6	TNF-α	RBP	(51)
	HCMV	HBP	(54)
IL-6 (Cont.)	IL-17	HPP	(43)
	TNF-α, IL-1β	HRP	(46)
	IL-1β	HBP	(48)
	LPS	MBP	(50)
	TNF-α	HBP	(52)
IL8/CXCL8	TGF-β1	HBP	(39)
	LPS, HMGB1	HBP	(45)
	LPS, TNF-α	HPP	(49)
	HCMV	HBP	(54)
	TNF-α, IL-1β	HRP	(46)
	LPS, TNF-α, IL-1β	PBP	(56)
	IL-1β	HPP	(57)
	C12-iE-DAP	HBP	(58)
	IL-1β	HBP	(48)
	TNF-α	HBP	(52)
IL-1β	HBP	(39)	
IL-10	TNF-α	HPP	(59)
	IL-17	HPP	(43)
	LPS	MBP	(55)
	LPS	MBP	(55)
IL-12	LPS	MBP	(55)
	LPS	MBP	(55)
IL-13	LPS	MBP	(55)
	TNF-α	RBP	(51)

(Continued)

TABLE 1 | Continued

	Stimuli	Cell source	Reference
MIF	LPS, TNF- α	HPP	(49)
TNF- α	LPS, TNF- α	MBP	(55)
	High glucose	BRP	(62)
Adhesion molecule			
ICAM-1	TNF- α , IFN- γ	RBP	(32)
	LPS	HBP	(45)
	TNF- α	MMP	(61)
	TNF- α , LPS	HPP	(49)
	TNF- α , IFN- γ	HBP	(63)
	IL-1 β	HPP	(57)
	High glucose	BRP	(62)
	IL-1 β	HBP	(48)
	TNF- α	HPP	(59)
	TNF- α , IFN- γ	HPP	(64)
VCAM-1	LPS, IFN- γ	HBP	(53)
	TNF- α	RBP	(32)
	LPS	HBP	(45)
	TNF- α	HBP	(63)
	TNF- α	HPP	(59)

BRP, bovine retinal pericytes; HBP, human brain pericytes; HCMV, human cytomegalovirus; HPP, human placental pericytes; HRP, human retinal pericytes; MBP, mouse brain pericytes; MMP, mouse muscle pericytes; PBP, pig brain pericytes; RBP, rat brain pericytes; RLP, rat lung pericytes.



which promote the migration and proliferation of CXCR1- and CXCR2-expressing EC (65). In addition to the ELR+ CXC chemokine family, CCL2 is the best known CC chemokine mediator of neovascularization. This pattern of chemokine production may shed new light on PC-EC interactions, suggesting a dual role for PC according to their activation status. In physiological conditions, PC are necessary to maintain a quiescent stable endothelium; however, activated PC could act as drivers of angiogenesis during inflammatory processes.

Increased vascular permeability is a hallmark of inflammation, and PC may play a role in this response. It has been shown that TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ promote the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by porcine (36) and rat (51) brain PC. The generation of NO by PC can act in both an autocrine and paracrine manner as a relaxing factor, which leads to vasodilation. In addition, an iNOS-independent pathway by which lung PC contractility is regulated by lipopolysaccharide (LPS) has been suggested (66). VEGF modifies the contractile response of lung PC, and this mechanism may play a role in the increased permeability demonstrated in inflammatory conditions (67). PC also upregulate cyclooxygenase-2 (COX-2), responsible for production of inflammatory prostaglandins, and generate reactive oxygen and nitrogen species after the stimulation with TNF- α , IL-1 β , or IFN- γ (36). In another study, microarray analysis of PDGFR β^+ , SMA $^+$ human brain PC treated with IFN- γ and IL-1 β revealed widespread changes in gene expression including upregulation of interleukins, chemokines, adhesion molecules, *PTGS2/COX2*, and *SOD2* (47). Increased superoxide dismutase expression by PC could confer tolerance to oxidative stress in the inflammatory context.

Aside from participating in the onset of inflammatory responses, autolimiting mechanisms have also been identified in PC. The transcription factor C/EBP δ is induced in a concentration- and time-dependent fashion in PDGFR β^+ , SMA $^+$, and NG2 $^+$ human brain PC by IL-1 β , limiting PC production of CCL2 and thereby preventing further inflammatory responses (48).

All these works support the potential of PC to take part in immunological responses under inflammatory conditions (36). However, their role is complex: Pdgfr $\beta^{+/-}$ mice showed an age-dependent progressive loss of PC coverage in the brain associated with neutrophil infiltration and expression of several inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL2) and ICAM-1 (68).

PC AS SENTINELS OF THE INNATE IMMUNITY

Several classes of receptors, collectively termed pattern-recognition receptors (PRR) are responsible for sensing microorganisms and endogenous molecules released during cell injury. These germ line-encoded PRR recognize conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and danger-associated molecular patterns (DAMP). Five families of PRR have been identified in mammals, of which toll-like receptors (TLRs) and NOD-like receptors (NLRs) are the most studied and characterized (69). Beyond the passive role of PC in the amplification of inflammatory responses above described, expression of functional PRR suggests that brain PC may directly contribute to the onset of innate immune responses.

Human EC are known to express several TLRs, whereas inflamed endothelium has significant upregulation of TLR2 (receptor for di/triacyl lipopeptides) and TLR4 (LPS receptor) (70, 71). However, expression of these receptors in PC has been scarcely addressed. In a series of pioneering works by Edelman et al., the authors demonstrated TLR4 upregulation (72), increased vessel permeability (73), and production of IL-1 β (60) in rat lung PC treated with LPS, suggesting an

active role of PC in inflammation. Subsequently, the release of NO and several cytokines and chemokines by SMA⁺, CD13⁺ mouse brain vascular PC in response to LPS was reported (55). More recently, we have documented the expression of TLR4 by human brain PC and their responsiveness to both LPS and the endogenous ligand HMGB1 (45). In this study, the transcriptional profile of LPS-treated PC was characterized using DNA microarrays. Shortly after, Jansson et al. confirmed the ability of human brain PC to respond to different pro-inflammatory stimuli, including LPS (47).

Pattern-recognition receptors signaling in innate immune cells results in the production of a variety of pro-inflammatory molecules. In LPS-treated human brain PC, six genes were found to be upregulated more than 15-fold: *CXCL10*, *CCL20*, *CXCL8*, *CXCL1*, *IL-6*, and *CCL2* (45) (Table 1). Interestingly, these data corroborated a different capacity in synthesis of pro-inflammatory factors between vascular cells and leukocytes in response to PAMPs or analogs. It had been described that vascular VSMC and EC cells produce 10- to 100-fold more IL-6, CXCL8, and CXCL10, whereas leukocytes are nearly exclusive producers of IFN- γ and TNF- α , at least in humans (74). Intriguingly, LPS induces in human coronary artery EC mRNA expression of *IL-1 α* , *IL-1 β* , and *TNF- α* , but no release of the proteins (75). Similarly, a significant upregulation of *IL-1 α* and *IL-1 β* mRNA in human brain PC was observed, but expression at protein level could not be detected (45). The profiles of cytokines and chemokines released by human and mouse brain PC in response to LPS also differ considerably, supporting major species differences in vascular cell immunological functions, as highlighted by Pober and Tellides (76). Indeed, it is controversial how closely the gene-expression patterns in mouse models recapitulate those in human inflammatory conditions (77, 78).

A recent report described that LPS-induced secretion of certain inflammatory cytokines/chemokines such as CCL2 and CXCL1 by HUVEC was inhibited by the axon guidance molecule Slit2 and its receptor Robo4 pathway (79). Previously, it had been shown that Robo4-dependent Slit2 signaling reduces the endothelial hyperpermeability induced by LPS *in vivo* (80). Interestingly, we described the expression of Robo4 in human brain PC and their response to Slit2 (81), which inhibited spontaneous and PDGF-B-induced migration of PC. It remains to be addressed whether the Slit2-Robo4 axis also modulates the inflammatory response in human brain PC.

NOD1 and NOD2, the prototypical members of the NLR family of PRR, mediate the cytoplasmic recognition of peptidoglycan (PGN) fragments (82). NOD1 is expressed in a variety of cell types of both hematopoietic and non-hematopoietic origin, including EC, where it has been shown to be critical in sensing pathogens (83) and mediating vascular inflammation (84). The expression of these PRR in PC had not been addressed, but a recent report by our group showed that NOD1 is functionally expressed by PC, whereas NOD2 expression is barely detectable. The NOD1 agonist C12-iE-DAP induced *IL-6* and *CXCL8* gene expression by PC as well as their release into culture supernatant. Moreover, the synergistic effect of NOD1 and TLR4 agonists on the induction of *CXCL8* was demonstrated (58).

Recently, it has been reported that human brain primary PC cultures contain at least two functionally distinct CD73⁺ cell types: one being the more proliferative, CD90⁺ (Thy-1) cells, and CD90⁻ cells, which show a greater inflammatory response to LPS and IFN- γ stimulation (53). In fact, the primary human brain PC we used to characterize the response to LPS, HMGB1, and C12-iE-DAP expressed canonical high levels of PDGFR- β , NG2, CD13, CD73, and CD105 but unexpectedly lacked CD90, as assessed by flow cytometry (81). It will be interesting to learn more about the biological significance of CD90 and the discrete roles of these PC subpopulations in physiological and pathological conditions.

PERICYTE CONTROL OF IMMUNE CELL TRAFFICKING

Leukocyte trafficking to target tissues is orchestrated by adhesion molecules and chemokines that stabilize dynamic interactions between immune cells and EC. While PC have long been disregarded as players in this process, accumulating evidence have shed light on the significance of these cells as regulators of leukocyte recruitment to inflammation sites. This new understanding has been enabled by advances in microscopy techniques and the generation of genetically fluorescent animal models. Intravital imaging studies have revealed the events following leukocyte transendothelial migration *in vivo*: to fully exit venular walls, infiltrating cells must breach the basement membrane and cross the PC sheath to enter the perivascular space, which creates a special milieu that controls the behavior and fate of infiltrated immune cells (85, 86).

Recent works have demonstrated that PC facilitate neutrophil transmigration in a model of TNF- α - or IL-1 β -stimulated mouse cremaster muscle *in vivo* (61, 87). Namely, PC were observed to provide a substrate for neutrophils creeping along their processes (“abluminal crawling”) to gaps between adjacent PC which are enlarged in inflamed tissues and used as exit points. This response was mediated through the interaction of PC-expressed ICAM-1 with neutrophil Mac-1 and LFA-1 (61). Previous studies by the same group had shown that these gaps were aligned with regions of low densities of the extracellular matrix proteins collagen IV and laminin 10 in the basement membrane (low-expression regions, LERs) (88–90). PC relaxation rather than contraction contributes to the opening of the gaps between PC and to the widening and thinning of LERs, facilitating neutrophil extravasation (87).

Moreover, capillary and arteriolar NG2⁺ PC can “instruct” extravasating neutrophils and monocytes with migratory cues after exiting through postcapillary venules covered by NG2⁻ PC (49). In response to inflammatory mediators, NG2⁺ PC upregulated expression of ICAM-1 and released the chemoattractant MIF, which directed interstitial leukocyte trafficking. In this setting, PC-driven migration of monocytes was mediated mainly by MIF and CCL2, whereas neutrophil migration involved MIF and CXCL8. These interactions with the abluminal face of NG2⁺ PC were crucial for the efficient navigation of cells of the innate immune system and enhanced

the ability of the latter cells to screen the interstitial space for damaged tissue and to execute their effector functions at foci of sterile inflammation.

Significantly, the *in vitro* coculture of human umbilical vein EC and CD90⁺, NG2⁺ human placental PC indicated that transendothelial migration itself, which increases neutrophil Mac-1 surface expression, can prime neutrophils for enhanced interactions with PC (57). Another *in vitro* model showed that porcine brain PC are able to chemoattract neutrophils by CXCL8 after stimulation with LPS, TNF- α , or IL-1 β (56). Remarkably, LPS-treated human brain PC showed a strong increase in the expression of both ICAM-1 and VCAM-1 which promoted a significant increase in adhesion of peripheral blood lymphocytes to human brain PC (45). Notably, VCAM-1/VLA-4 interaction was proposed more than 20 years ago as a mechanism mediating T cell–human brain PC crosstalk (63). In a much more recent study, PC have been shown to control mature T cell transmigration across the endothelium from the thymus into circulation (91).

Collectively, these findings showed that interactions of PC with different types of leukocytes modulate their trafficking through vessel walls. The impact of such interactions on the phenotype and activation state of immune cells requires further investigations.

MODULATION OF ADAPTIVE IMMUNE RESPONSES BY PC

If PC can regulate T cell trafficking, it is obvious that they are also positioned to modulate T cell activation (76) (Table 2). Human EC have been considered amateur APC, since they lack expression of key co-stimulatory molecules such as CD80 and CD86, as it has been reported for PC. But PC also display higher levels of PD-L1 and PD-L2, ligands for the inhibitory immune checkpoint molecule PD1 expressed by activated T cells. In agreement with these observations, IFN- γ -treated MHC class II⁺ human placental PC, unlike EC, cannot stimulate resting allogeneic CD4 T cell proliferation or cytokine production. Instead, coculture with PC renders T cells anergic (64). These placental PC express characteristic markers NG2, CD90, CD146, and SMA. Like PC, the ontogenetically related MSC have been reported to inhibit T cell proliferation (92).

Retinal PC also have immunosuppressive properties, and coculture with activated T cells decreased proliferation and IFN- γ and TNF- α production in a dose-dependent manner (93). Both cell–cell contact and soluble factors are involved in retinal PC-mediated T cell inhibition, since it was decreased by the addition of blocking anti-PD-L1 and anti-IL-10 antibodies, and in transwell experiments. Interestingly, retinal PC protected EC

TABLE 2 | Modulation of T cell activation and antitumoral immune response by pericytes.

Pericyte type/origin	<i>In vitro</i> effect	Tumor model	<i>In vivo</i> effect	Reference
HBP	T cell adhesion, VCAM-mediated	N/A	N/A	(63)
HPP	T cell anergy	N/A	N/A	(64)
HRP, MRP	T cell inhibition, PDL1/IL-10-mediated	N/A	N/A	(93)
HPSC-derived PC, HBP, HPP	T cell hyporesponsiveness, induction of Tregs, PD-L1/TGF β -mediated	N/A	N/A	(40)
C3H10T1/2- <i>in vitro</i> differentiated, tumor-conditioned PC; B16 tumor-derived PC	CD4 ⁺ T cell anergy, RGS5- and IL-6-dependent	B16 mouse melanoma	N/A	(94)
HBP	T cell anergy, PGE2-, NO-, HGF, TGF β -mediated	Human malignant glioma	N/A	(95)
PDGF-B ret/ret mouse model (pericyte-deficient)	N/A	B16 melanoma, LLC mouse lung cancer	Recruitment of T-cell suppressive MDSC, IL-6 mediated. Increased tumor growth and metastasis	(96)
Rgs5 ^{-/-} mouse model	N/A	RIP1-Tag5 (insulinoma) \times Rgs5 ^{-/-} mouse model	Vascular normalization and enhanced infiltration of CD8 ⁺ T cells. Increased survival	(97)
FVB/N mice	N/A	NT-2 mouse breast cancer	Increased infiltration of CD8 ⁺ cells after vaccination against pericyte antigens. Delayed tumor growth	(98)
C57BL/6, HDD (HLA-A2 transgenic) mice	N/A	MC38 mouse colon carcinoma, B16 melanoma	Increased infiltration of CD8 ⁺ cells after vaccination against pericyte antigens. Tumor eradication	(99)
SCID, C57BL/6, C57BL/6 IL-33 ^{-/-} mice. Isolated LMP	PDGF-BB-induced IL-33 expression in LMP. Increased migration of IL-33-primed macrophages	<i>pdgfb</i> -shRNA A431 human epidermoid carcinoma, <i>pdgfb</i> -overexpressing murine T241 fibrosarcoma and LLC cells	Recruitment of TAM, IL-33 mediated. Metastasis promotion	(100)

HBP, human brain pericytes; HPP, human placental pericytes; HPSC, human pluripotent stem cells; HRP, human retinal pericytes; LLC, Lewis lung carcinoma; LMP, lung mouse pericytes; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; MRP, mouse retinal pericytes; TAM, tumor-associated macrophages.

from T cell-induced death, suggesting that their loss under hyperglycemic conditions favors retinal inflammation and contributes to the pathogenesis of diabetic retinopathy.

Characterization of different subsets of lymph node stromal cells (LNSC) identified a novel gp38- and CD31-double-negative population. These cells expressed high levels of autoimmune regulator (AIRE) and showed a strong response to inflammation by upregulating peripheral tissue-restricted antigen expression. Of interest, double-negative LNSC upregulated PD-L1 in PolyI:C-treated mice, suggesting a potential contribution to shaping the T cell repertoire and peripheral tolerance (101). In a subsequent study, transcriptional profiling of LNSC analyzing each subset's expression signature identified double-negative LNSC as PC able to respond to inflammatory or infectious triggers (102).

In another study, human brain or placental PC and PC derived from human pluripotent stem cells (hPSC) mediated a significant increase in the frequency of allogeneic CD25 high FoxP3⁺ regulatory T cells (Tregs) when cocultured with non-activated peripheral blood T cells. PD-L1/2 expression and secretion of TGF- β by hPSC PC directly regulated generation of Tregs favoring allostimulation of Tregs over T cell activation, suggesting that hPSC PC could be applied to allogeneic cell therapy in the clinic, not only without provoking immediate immune responses but also actively modulating suppressive immunity (40).

In summary, PC are not only players in innate immunity and inflammation but they can also participate, at least under certain circumstances, in adaptive immunity.

IMMUNE REGULATION BY PC IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT

The role of stromal cells in the tumor microenvironment (TME) has attracted great interest, and PC are *bona fide* components of the TME, although its coverage of tumor microvasculature is controversial (103–105). Undoubtedly, the immunomodulatory properties of PC may have an impact in the context of antitumor immune responses. Along with PD-L1 and PD-L2 expression, PC from normal human brain and human malignant glioma (both PDGFR β ⁺, desmin⁺, SMA⁺, and NG2⁺) have been shown to secrete various factors with immunosuppressive properties, such as NO, PGE2, and TGF- β (95). Not surprisingly, previous *in vitro* results have a correlation with the antitumor immune response *in vivo*. PC derived from subcutaneously implanted B16 or CT26 tumors expressed, unlike their normal counterparts, MHC class II and CD80 molecules (94). In this work, PD-L1 expression was upregulated in normal PC after culture in tumor-conditioned media. Tumor-derived PC, but not normal PC, negatively influence CD4⁺ T cell activation and proliferation *in vitro*, and promote anergy in OVA-specific cells in culture. This immunoregulatory capacity was dependent on TME-induced RGS5 expression and IL-6, and could help tumors to evade immune responses (94). Similarly, PC isolated from human malignant glioma were equally capable of suppressing allogeneic or mitogen-activated T cell responses *in vitro* through the production of PGE2, TGF- β , and NO. Moreover, CD90⁺ PDGFR- β ⁺ perivascular cells accumulated in human gliomas with increasing degree of malignancy and negatively correlated with the presence of blood vessel-associated leukocytes and CD8⁺ T cells (95).

In line with these findings, PC targeting has shown antitumor effects *in vivo*. A study with the RIP1-Tag5 mouse model of pancreatic carcinoma showed that deletion of the Rgs5 gene induced changes in the vasculature and enhanced infiltration of CD8⁺ T cells in tumors after adoptive transfer. As a consequence, the immune-mediated tumor rejection was exacerbated, resulting in improved survival of tumor-bearing mice (97). Notably, RGS5 is also overexpressed in tumor PC in this model, similar to what has been documented for several human tumors, including kidney, liver, and head and neck cancers (97, 106).

Tumor PC have also been targeted using vaccination approaches. In a breast carcinoma model, immunization with a *Listeria monocytogenes*-based vaccine against NG2 was shown to promote tumor infiltration of CD8⁺ T cells and tumor regression (98). Indeed, vaccination with peptides derived from PDGFR- β and RGS5 were also effective in preventing HLA-A2⁻ colon carcinoma (MC38) establishment or resulted in the regression of tumors in HLA-A2 transgenic mice (99). Effective vaccination resulted in profound infiltration of tumor lesions by CD8⁺ cells and supported the idea that targeting tumor PC can alleviate local immunosuppression.

However, the role of PC in TME is complex, as they may contribute to different cancer hallmarks beyond immune evasion (107), and consequently their role as potential targets in cancer immunotherapy approaches should be carefully evaluated. In the PDGF-B (*ret/ret*) mouse model, PC deficiency produced defective tumor vasculature, resulting in a more hypoxic microenvironment. Hypoxia promoted IL-6 upregulation in the malignant cells and increased transmigration of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in experimentally induced tumors. MDSC accumulation in tumors led to increases in tumor growth, whereas restoring the PC coverage in tumors abrogated the increased MDSC trafficking to PC-deficient tumors (96). Though, another study reported that IL-33 produced by PDGF-B-stimulated PC promoted metastasis through recruitment of tumor-associated macrophages in several human and mouse graft tumor models (100). Further extensive studies will be required to understand the crosstalk of PC with immune cells different from T cells.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Pericytes have demonstrably been shown to possess an immunological role beyond their structural role in the microvasculature. PC can respond to a series of pro-inflammatory stimuli and are also able to discriminate between several types of danger and mount a complex secretory response: upon PAMP engagement, PRR trigger intracellular signaling cascades ultimately culminating in the expression of a variety of pro-inflammatory molecules. At the same time, PC overexpress adhesion molecules that guide and instruct innate immune cells after transendothelial migration. Moreover, PC are implicated in shaping adaptive immunity, with several studies that point to an immunosuppressive role. This role may have an impact on the antitumor immune response, since PC are constituents of the TME. A better understanding of the mechanisms by which PC communicate with their neighboring cells and modulate immune responses in tumors can be expected to yield exciting new insights as well as help

in the development of new therapeutic targets with important implications for cancer immunotherapy.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

REFERENCES

- Zimmermann KW. Der feinere Bau der Blutcapillaren. *Z Anat Entwickl Gesch* (1923) 68:29–109. doi:10.1007/BF02593544
- Dore-Duffy P, Cleary K. Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol* (2011) 686:49–68. doi:10.1007/978-1-60761-938-3_2
- Diaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* (2009) 24:909–69. doi:10.14670/HH-24.909
- Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* (2011) 21:193–215. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001
- Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* (2003) 314:15–23. doi:10.1007/s00441-003-0745-x
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* (2005) 97:512–23. doi:10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7
- Trost A, Lange S, Schroedl F, Bruckner D, Motloch KA, Bogner B, et al. Brain and retinal pericytes: origin, function and role. *Front Cell Neurosci* (2016) 10:20. doi:10.3389/fncel.2016.00020
- Schallek J, Geng Y, Nguyen H, Williams DR. Morphology and topography of retinal pericytes in the living mouse retina using in vivo adaptive optics imaging and ex vivo characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2013) 54:8237–50. doi:10.1167/iov.13-12581
- Hill RA, Tong L, Yuan P, Murikinati S, Gupta S, Grutzendler J. Regional blood flow in the normal and ischemic brain is controlled by arteriolar smooth muscle cell contractility and not by capillary pericytes. *Neuron* (2015) 87:95–110. doi:10.1016/j.neuron.2015.06.001
- Whitesell TR, Kennedy RM, Carter AD, Rollins EL, Georgijevic S, Santoro MM, et al. An α -smooth muscle actin (acta2/ α SMA) zebrafish transgenic line marking vascular mural cells and visceral smooth muscle cells. *PLoS One* (2014) 9:e90590. doi:10.1371/journal.pone.0090590
- Birbrair A, Zhang T, Wang ZM, Messi ML, Enikolopov GN, Mintz A, et al. Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential. *Stem Cell Res* (2013) 10:67–84. doi:10.1016/j.scr.2012.09.003
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* (2003) 9:685–93. doi:10.1038/nm0603-685
- Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci* (2016) 19:771–83. doi:10.1038/nn.4288
- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* (2011) 146:873–87. doi:10.1016/j.cell.2011.08.039
- Ozerdem U, Stallcup WB. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* (2003) 6:241–9. doi:10.1023/B:ANGEN.0000021401.58039.a9
- Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29:630–8. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161521
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* (2014) 508:55–60. doi:10.1038/nature13165
- Attwell D, Mishra A, Hall CN, O'Farrell FM, Dalkara T. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab* (2016) 36:451–5. doi:10.1177/0271678X15610340
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* (2008) 3:301–13. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003
- Bexell D, Gunnarsson S, Tormin A, Darabi A, Gisselsson D, Roybon L, et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther* (2009) 17:183–90. doi:10.1038/mt.2008.229
- Barlow KD, Sanders AM, Soker S, Ergun S, Metheny-Barlow LJ. Pericytes on the tumor vasculature: jekyll or hyde? *Cancer Microenviron* (2013) 6:1–17. doi:10.1007/s12307-012-0102-2
- Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci* (2011) 14:1398–405. doi:10.1038/nn.2946
- Balabanov R, Washington R, Wagnerova J, Dore-Duffy P. CNS microvascular pericytes express macrophage-like function, cell surface integrin α M, and macrophage marker ED-2. *Microvasc Res* (1996) 52:127–42. doi:10.1006/mvre.1996.0049
- Pardridge WM, Yang J, Buciac J, Tourtellotte WW. Human brain microvascular DR-antigen. *J Neurosci Res* (1989) 23:337–41. doi:10.1002/jnr.490230314
- Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J* (1993) 7:1031–8.
- Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Rev* (1999) 31:42–57. doi:10.1016/S0165-0173(99)00024-7
- Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW. Identity of ED2-positive perivascular cells in rat brain. *J Neurosci Res* (1989) 22:103–6. doi:10.1002/jnr.490220114
- Nyland H, Nilsen R. Localization of Fc gamma receptors in the human central nervous system. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C* (1982) 90:217–21.
- Sasaki A, Nakazato Y, Ogawa A, Sugihara S. The immunophenotype of perivascular cells in the human brain. *Pathol Int* (1996) 46:15–23. doi:10.1111/j.1440-1827.1996.tb03528.x
- Kristensson K, Olsson Y. Accumulation of protein tracers in pericytes of the central nervous system following systemic injection in immature mice. *Acta Neurol Scand* (1973) 49:189–94. doi:10.1111/j.1600-0404.1973.tb01290.x
- Majno G, Palade GE. Studies on inflammation. *J Biophys Biochem Cytol* (1961) 11:571–605. doi:10.1083/jcb.11.3.571
- Balabanov R, Beaumont T, Dore-Duffy P. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J Neurosci Res* (1999) 55:578–87. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990301)55:5<578::AID-JNR5>3.0.CO;2-E
- Fabry Z, Sandor M, Gajewski TF, Herlein JA, Waldschmidt MM, Lynch RG, et al. Differential activation of Th1 and Th2 CD4+ cells by murine brain microvessel endothelial cells and smooth muscle/pericytes. *J Immunol* (1993) 151:38–47.
- Krueger M, Bechmann I. CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia* (2010) 58:1–10. doi:10.1002/glia.20898
- Kida S, Steart PV, Zhang ET, Weller RO. Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol* (1993) 85:646–52. doi:10.1007/BF00334675
- Pieper C, Marek JJ, Unterberg M, Schwerdtle T, Galla HJ. Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS in vitro. *Brain Res* (2014) 1550:1–8. doi:10.1016/j.brainres.2014.01.004
- Smith AM, Graham ES, Feng SX, Oldfield RL, Bergin PM, Mee EW, et al. Adult human glia, pericytes and meningeal fibroblasts respond similarly to IFN γ but not to TGF- β 1 or M-CSF. *PLoS One* (2013) 8:e80463. doi:10.1371/journal.pone.0080463
- Olson LE, Soriano P. PDGFR- β signaling regulates mural cell plasticity and inhibits fat development. *Dev Cell* (2011) 20:815–26. doi:10.1016/j.devcel.2011.04.019
- Rustenhoven J, Aalderink M, Scotter EL, Oldfield RL, Bergin PS, Mee EW, et al. TGF- β 1 regulates human brain pericyte inflammatory processes

- involved in neurovasculature function. *J Neuroinflammation* (2016) 13:37. doi:10.1186/s12974-016-0503-0
40. Domev H, Milkov I, Itskovitz-Eldor J, Dar A. Immuno-vascular pericytes from human pluripotent stem cells preferentially modulate induction of allogeneic regulatory T cells. *Stem Cells Transl Med* (2014) 3:1169–81. doi:10.5966/sctm.2014-0097
 41. Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang XF. An evolving new paradigm: endothelial cells—conditional innate immune cells. *J Hematol Oncol* (2013) 6:61. doi:10.1186/1756-8722-6-61
 42. Speyer CL, Ward PA. Role of endothelial chemokines and their receptors during inflammation. *J Invest Surg* (2011) 24:18–27. doi:10.3109/08941939.2010.521232
 43. Liu R, Lauridsen HM, Amezcua RA, Pierce RW, Jane-Wit D, Fang C, et al. IL-17 promotes neutrophil-mediated immunity by activating microvascular pericytes and not endothelium. *J Immunol* (2016) 197:2400–8. doi:10.4049/jimmunol.1600138
 44. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:659–702. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120145
 45. Guijarro-Muñoz I, Compte M, Álvarez-Cienfuegos A, Álvarez-Vallina L, Sanz L. Lipopolysaccharide activates toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF- κ B signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. *J Biol Chem* (2014) 289:2457–68. doi:10.1074/jbc.M113.521161
 46. Nehme A, Edelman J. Dexamethasone inhibits high glucose-, TNF- α -, and IL-1 β -induced secretion of inflammatory and angiogenic mediators from retinal microvascular pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2008) 49:2030–8. doi:10.1167/iovs.07-0273
 47. Jansson D, Rustenhoven J, Feng S, Hurley D, Oldfield RL, Bergin PS, et al. A role for human brain pericytes in neuroinflammation. *J Neuroinflammation* (2014) 11:104. doi:10.1186/1742-2094-11-104
 48. Rustenhoven J, Scotter EL, Jansson D, Kho DT, Oldfield RL, Bergin PS, et al. An anti-inflammatory role for C/EBP δ in human brain pericytes. *Sci Rep* (2015) 5:12132. doi:10.1038/srep12132
 49. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Brühl ML, et al. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and ‘instruct’ them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* (2013) 14:41–51. doi:10.1038/ni.2477
 50. Fabry Z, Fitzsimmons KM, Herlein JA, Moninger TO, Dobbs MB, Hart MN. Production of the cytokines interleukin 1 and 6 by murine brain microvessel endothelium and smooth muscle pericytes. *J Neuroimmunol* (1993) 47:23–34. doi:10.1016/0165-5728(93)90281-3
 51. Matsumoto J, Takata F, Machida T, Takahashi H, Soejima Y, Funakoshi M, et al. Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett* (2014) 578:133–8. doi:10.1016/j.neulet.2014.06.052
 52. Herland A, van der Meer AD, FitzGerald EA, Park TE, Sleebom JF, Ingber DE. Distinct contributions of astrocytes and pericytes to neuroinflammation identified in a 3D human blood-brain barrier on a chip. *PLoS One* (2016) 11:e0150360. doi:10.1371/journal.pone.0150360
 53. Park TI, Feisst V, Brooks AE, Rustenhoven J, Monzo HJ, Feng SX, et al. Cultured pericytes from human brain show phenotypic and functional differences associated with differential CD90 expression. *Sci Rep* (2016) 6:26587. doi:10.1038/srep26587
 54. Alcendor DJ, Charest AM, Zhu WQ, Vigil HE, Knobel SM. Infection and upregulation of proinflammatory cytokines in human brain vascular pericytes by human cytomegalovirus. *J Neuroinflammation* (2012) 9:95. doi:10.1186/1742-2094-9-95
 55. Kovac A, Erickson MA, Banks WA. Brain microvascular pericytes are immunoactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* (2011) 8:139. doi:10.1186/1742-2094-8-139
 56. Pieper C, Pieloch P, Galla HJ. Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res* (2013) 1524:1–11. doi:10.1016/j.brainres.2013.05.047
 57. Ayres-Sander CE, Lauridsen H, Maier CL, Sava P, Pober JS, Gonzalez AL. Transendothelial migration enables subsequent transmigration of neutrophils through underlying pericytes. *PLoS One* (2013) 8:e60025. doi:10.1371/journal.pone.0060025
 58. Navarro R, Delgado-Wicke P, Nuñez-Prado N, Compte M, Blanco-Toribio A, Nuñez G, et al. Role of nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) in pericyte-mediated vascular inflammation. *J Cell Mol Med* (2016) 20:980–6. doi:10.1111/jcmm.12804
 59. Lauridsen HM, Pober JS, Gonzalez AL. A composite model of the human postcapillary venule for investigation of microvascular leukocyte recruitment. *FASEB J* (2014) 28:1166–80. doi:10.1096/fj.13-240986
 60. Edelman DA, Jiang Y, Tyburski JG, Wilson RF, Steffes CP. Cytokine production in lipopolysaccharide-exposed rat lung pericytes. *J Trauma* (2007) 62:89–93. doi:10.1097/TA.0b013e31802dd712
 61. Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, Whiteford J, D’Acquisto F, Jones GE, et al. Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med* (2012) 209:1219–34. doi:10.1084/jem.20111622
 62. Kowluru RA, Zhong Q, Kanwar M. Metabolic memory and diabetic retinopathy: role of inflammatory mediators in retinal pericytes. *Exp Eye Res* (2010) 90:617–23. doi:10.1016/j.exer.2010.02.006
 63. Verbeek MM, Westphal JR, Ruiter DJ, de Waal RM. T lymphocyte adhesion to human brain pericytes is mediated via very late antigen-4/vascular cell adhesion molecule-1 interactions. *J Immunol* (1995) 154:5876–84.
 64. Maier CL, Pober JS. Human placental pericytes poorly stimulate and actively regulate allogeneic CD4 T cell responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011) 31:183–9. doi:10.1161/ATVBAHA.110.217117
 65. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res* (2011) 317:685–90. doi:10.1016/j.yexcr.2010.10.020
 66. Speyer CL, Steffes CP, Tyburski JG, Ram JL. Lipopolysaccharide induces relaxation in lung pericytes by an iNOS-independent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2000) 278:L880–7.
 67. Donoghue L, Tyburski JG, Steffes CP, Wilson RF. Vascular endothelial growth factor modulates contractile response in microvascular lung pericytes. *Am J Surg* (2006) 191:349–52. doi:10.1016/j.amjsurg.2005.10.034
 68. Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, et al. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* (2010) 68:409–27. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.043
 69. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* (2015) 33:257–90. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240
 70. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol* (2007) 178:6017–22. doi:10.4049/jimmunol.178.10.6017
 71. Pober JS, Sessa WC. Inflammation and the blood microvascular system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2014) 7:a016345. doi:10.1101/cshperspect.a016345
 72. Edelman DA, Jiang Y, Tyburski J, Wilson RF, Steffes C. Toll-like receptor-4 message is up-regulated in lipopolysaccharide-exposed rat lung pericytes. *J Surg Res* (2006) 134:22–7. doi:10.1016/j.jss.2006.03.007
 73. Edelman DA, Jiang Y, Tyburski JG, Wilson RF, Steffes CP. Lipopolysaccharide up-regulates heat shock protein expression in rat lung pericytes. *J Surg Res* (2007) 140:171–6. doi:10.1016/j.jss.2006.12.560
 74. Tellides G, Pober JS. Inflammatory and immune responses in the arterial media. *Circ Res* (2015) 116:312–22. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.301312
 75. Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H. TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res* (2002) 56:126–34. doi:10.1016/S0008-6363(02)00512-6
 76. Pober JS, Tellides G. Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends Immunol* (2012) 33:49–57. doi:10.1016/j.it.2011.09.006
 77. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110:3507–12. doi:10.1073/pnas.1222878110
 78. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112:1167–72. doi:10.1073/pnas.1401965111

79. Zhao H, Anand AR, Ganju RK. Slit2-Robo4 pathway modulates LPS-induced endothelial inflammation and its expression is dysregulated during endotoxemia. *J Immunol* (2014) 192:385–93. doi:10.4049/jimmunol.1302021
80. London NR, Zhu W, Bozza FA, Smith MCP, Greif DM, Sorensen LK, et al. Targeting Robo4-dependent slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. *Sci Transl Med* (2010) 2:23ra19. doi:10.1126/scitranslmed.3000678
81. Guijarro-Muñoz I, Cuesta AM, Álvarez-Cienfuegos A, Geng JG, Álvarez-Vallina L, Sanz L. The axonal repellent Slit2 inhibits pericyte migration: potential implications in angiogenesis. *Exp Cell Res* (2012) 318:371–8. doi:10.1016/j.yexcr.2011.12.005
82. Caruso R, Warner N, Inohara N, Nuñez G. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity* (2014) 41:898–908. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.010
83. Gatheral T, Reed DM, Moreno L, Gough PJ, Votta BJ, Schon CA, et al. A key role for the endothelium in NOD1 mediated vascular inflammation: comparison to TLR4 responses. *PLoS One* (2012) 7:e42386. doi:10.1371/journal.pone.0042386
84. Nishio H, Kanno S, Onoyama S, Ikeda K, Tanaka T, Kusuhara K, et al. Nod1 ligands induce site-specific vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2011) 31:1093–9. doi:10.1161/ATVBAHA.110.216325
85. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2010) 11:366–78. doi:10.1038/nrm2889
86. Weninger W, Biro M, Jain R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* (2014) 14:232–46. doi:10.1038/nri3641
87. Wang S, Cao C, Chen Z, Bankaitis V, Tzima E, Sheibani N, et al. Pericytes regulate vascular basement membrane remodeling and govern neutrophil extravasation during inflammation. *PLoS One* (2012) 7:e45499. doi:10.1371/journal.pone.0045499
88. Voisin MB, Woodfin A, Nourshargh S. Monocytes and neutrophils exhibit both distinct and common mechanisms in penetrating the vascular basement membrane in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2009) 29:1193–9. doi:10.1161/ATVBAHA.109.187450
89. Voisin MB, Pröbstl D, Nourshargh S. Venular basement membranes ubiquitously express matrix protein low-expression regions. *Am J Pathol* (2010) 176:482–95. doi:10.2353/ajpath.2010.090510
90. Wang S, Voisin MB, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, et al. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med* (2006) 203:1519–32. doi:10.1084/jem.20051210
91. Zachariah MA, Cyster JG. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction. *Science* (2010) 328:1129–35. doi:10.1126/science.1188222
92. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* (2007) 110:3499–506. doi:10.1182/blood-2007-02-069716
93. Tu Z, Li Y, Smith DS, Sheibani N, Huang S, Kern T, et al. Retinal pericytes inhibit activated T cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2011) 52:9005–10. doi:10.1167/iovs.11-8008
94. Bose A, Barik S, Banerjee S, Ghosh T, Mallick A, Majumdar SB, et al. Tumor-derived vascular pericytes anergize Th cells. *J Immunol* (2013) 191:971–81. doi:10.4049/jimmunol.1300280
95. Ochs K, Sahm F, Opitz CA, Lanz TV, Oezen I, Couraud PO, et al. Immature mesenchymal stem cell-like pericytes as mediators of immunosuppression in human malignant glioma. *J Neuroimmunol* (2013) 265:106–16. doi:10.1016/j.jneuroim.2013.09.011
96. Hong J, Tobin NP, Rundqvist H, Li T, Lavergne M, García-Ibáñez Y, et al. Role of tumor pericytes in the recruitment of myeloid-derived suppressor cells. *J Natl Cancer Inst* (2015) 107(10):djv209. doi:10.1093/jnci/djv209
97. Hamzah J, Jugold M, Kiessling F, Rigby P, Manzur M, Marti HH, et al. Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction. *Nature* (2008) 453:410–4. doi:10.1038/nature06868
98. Maciag PC, Seavey M, Pan ZK, Ferrone S, Paterson Y. Cancer immunotherapy targeting the HMW-MAA protein results in a broad antitumor response and reduction of pericytes in the tumor vasculature. *Cancer Res* (2008) 68:8066–75. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0287
99. Zhao X, Bose A, Komita H, Taylor JL, Chi N, Lowe DB, et al. Vaccines targeting tumor blood vessel antigens promote CD8+ T cell-dependent tumor eradication or dormancy in HLA-A2 transgenic mice. *J Immunol* (2012) 188:1782–8. doi:10.4049/jimmunol.1101644
100. Yang Y, Andersson P, Hosaka K, Zhang Y, Cao R, Iwamoto H, et al. The PDGF-BB-SOX7 axis-modulated IL-33 in pericytes and stromal cells promotes metastasis through tumour-associated macrophages. *Nat Commun* (2016) 7:11385. doi:10.1038/ncomms11385
101. Fletcher AL, Lukacs-Kornek V, Reynoso ED, Pinner SE, Bellemare-Pelletier A, Curry MS, et al. Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med* (2010) 207:689–97. doi:10.1084/jem.20092642
102. Malhotra D, Fletcher AL, Astarita J, Lukacs-Kornek V, Tayalia P, Gonzalez SF, et al. Transcriptional profiling of stroma from inflamed and resting lymph nodes defines immunological hallmarks. *Nat Immunol* (2012) 13:499–510. doi:10.1038/ni.2262
103. Bose A, Ghosh T, Baral R. An overlooked tumor promoting immunoregulation by non-hematopoietic stromal cells. *Immunol Lett* (2016) 176:114–21. doi:10.1016/j.imlet.2016.06.002
104. Cortez E, Roswall P, Pietras K. Functional subsets of mesenchymal cell types in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* (2014) 25:3–9. doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.010
105. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* (2015) 15:669–82. doi:10.1038/nri3902
106. Furuya M, Nishiyama M, Kimura S, Suyama T, Naya Y, Ito H, et al. Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J Pathol* (2004) 203:551–8. doi:10.1002/path.1543
107. Ribeiro AL, Okamoto OK. Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment. *Stem Cells Int* (2015) 2015:868475. doi:10.1155/2015/868475

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer X-YW and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process nevertheless met the standards of a fair and objective review.

Copyright © 2016 Navarro, Compte, Álvarez-Vallina and Sanz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.