



UGR | Universidad
de **Granada**

Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-
JUNTA DE ANDALUCÍA DE **GENÓMICA E**
INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

TESIS DOCTORAL

**“IMPORTANCIA DE LAS MOLÉCULAS QUE INTERACTÚAN CON TGF- β 1 SOBRE LA
BIOLOGÍA Y CAPACIDAD TERAPÉUTICA DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES
ESTROMALES (MSCs): PAPEL DE CD105 Y GARP”**

Ana Belén Carrillo Gálvez

Directores de la tesis:

Dr. Per Anderson

Dr. Francisco Martín Molina

Granada, 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana Belén Carrillo Gálvez
ISBN: 978-84-9163-823-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/50906>

El doctorando / *The doctoral candidate* **Ana Belén Carrillo Gálvez** y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: **Per Anderson y Francisco Martín Molina**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this doctortal thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Granada, Enero de 2018 / *January 2018*

Director de la tesis
Thesis supervisor

Director de la tesis
Thesis supervisor

Doctorando
Doctoral candidate



Per Anderson

Francisco Martin Molina

Ana Belén Carrillo Gálvez

Firma / *Signed*

Firma / *Signed*

Firma / *Signed*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Células Mesenquimales Estromales	11
1.1.1. Origen	11
1.1.2. Caracterización	12
1.1.3. Funciones	16
1.1.4. Terapia celular con MSCs	21
1.2. TGF- β	24
1.2.1. Definición y producción	24
1.2.2. Activación	25
1.2.3. Las MSCs producen y responden a TGF- β	26
1.2.4. Efectos de TGF- β en la proliferación de MSCs	27
1.2.5. Efectos de TGF- β en la diferenciación de MSCs	28
1.2.6. TGF- β y las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs	30
1.2.7. TGF- β de membrana (mbTGF- β)	33
1.2.8. Modulación de la respuesta inmunitaria por mbTGF- β	33
1.3. CD105 (Endoglina)	34
1.3.1. Estructura y expresión	34
1.3.2. Funciones	35
1.3.3. CD105 como marcador de MSCs	36
1.4. GARP	38
1.4.1. Descubrimiento del gen GARP	38
1.4.2. Expresión	38
1.4.3. Estructura	39

1.4.4. GARP y TGF- β	40
1.4.5. Papel de GARP en la activación de mbTGF- β	40
1.4.6. Funciones de GARP	41
2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	47
3. OBJETIVOS.....	51
4. MATERIALES Y MÉTODOS	55
4.1. Animales	55
4.2. Líneas celulares y medios de cultivo	55
4.2.1 Aislamiento y cultivo de MSCs de ratón.....	55
4.2.2 Macrófagos de ratón	56
4.2.3 Cultivo de MSCs humanas	56
4.2.4 Línea celular HEK-293T	57
4.3. Plásmidos y vectores lentivirales.....	57
4.4. Producción de vectores lentivirales.....	58
4.5. Transducción de MSCs.....	59
4.6. Titulación de vectores	60
4.7. Citometría de flujo.....	60
4.8. Análisis de proliferación de MSCs.....	61
4.9. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de las mASCs <i>in vitro</i>	62
4.10. Extracción de RNA y PCR cuantitativa de transcripción inversa (RTqPCR)	63
4.11. Purificación y estimulación de mASCs CD105 ⁻ y CD105 ⁺	64
4.12. Ensayo de capacidad de formación de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)	65
4.13. Diferenciación de MSCs	65
4.14. Co-cultivo de macrófagos	66
4.15. Medida de la producción de TGF- β 1 por las ASCs.....	66
4.16. Medida de la producción de citoquinas y Prostaglandina E2 (PGE ₂) por las mASCs.	67
4.17. Western Blot.....	67

4.18. Microscopia confocal.....	67
4.19. Tinción con Anexina V	68
4.20. Perfil de expresión génica y análisis de datos	68
4.21. Cuantificación de secuencias de shRNA	69
4.22. Ensayo de incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU).....	70
4.23. Medida de la producción de ROS	70
4.24. Análisis de la fosforilación de H2AX	70
4.25. Análisis estadísticos	71
5. RESULTADOS	75
5.1. OBJETIVO 1: Analizar la expresión de CD105 en MSCs derivadas de tejido adiposo de ratón (mASCs) y caracterizar las subpoblaciones CD105 ⁺ y CD105 ⁻	75
5.1.1. <i>La expresión de CD105-Largo (CD105L) es heterogénea en MSCs de ratón.....</i>	<i>75</i>
5.1.2. <i>CD105 define dos poblaciones de MSCs en ratón.....</i>	<i>79</i>
5.1.3. <i>La subpoblación de mASCs CD105⁻ es más propensa a diferenciarse en adipocitos y osteocitos</i>	<i>83</i>
5.1.4. <i>La subpoblación de mASCs CD105⁻ presenta mejor capacidad inmunomoduladora in vitro que la subpoblación CD105⁺</i>	<i>85</i>
5.2. OBJETIVO 2: Comprender el papel de GARP en la biología de las MSCs.....	87
5.2.1. <i>Las células mesenquimales estromales expresan GARP y LAP/TGF-β1 en su superficie.....</i>	<i>87</i>
5.2.2. <i>GARP une LAP/TGF-β1 a la superficie celular de las mASCs.....</i>	<i>90</i>
5.2.3. <i>El silenciamiento de GARP aumenta la secreción y activación de TGF-β1 por las mASCs</i>	<i>92</i>
5.2.4. <i>GARP también regula la secreción y activación de TGF-β1 en ASCs humanas. .</i>	<i>94</i>
5.2.5. <i>Efecto del TGF-β1 de membrana (mbTGF-β1) en la capacidad inmunomoduladora de las mASCs</i>	<i>96</i>
5.3. OBJETIVO 3: Estudiar en profundidad las implicaciones de GARP sobre la regulación de la proliferación de las MSCs.....	98
5.3.1 <i>El silenciamiento de GARP reduce la proliferación de las MSCs</i>	<i>98</i>
5.3.2. <i>El silenciamiento de GARP afecta el programa transcripcional de las hASCs, modulando genes involucrados en supervivencia y regulación del ciclo celular</i>	<i>105</i>

5.3.3. Las hASC GARP ⁺ se bloquean en la fase G2/M y exhiben una mayor sensibilidad al daño de ADN.....	110
5.3.4. Las hASC GARP ⁻ muestran mayores niveles de mtROS.....	112
5.3.5. La inhibición de mtROS reduce el número de DBS y revierte el bloqueo en proliferación de las hASCs GARP ⁺	114
5.3.6. La inhibición de la señalización de TGF- β en hASCs GARP ⁺ , reduce los niveles de ROS, de daño en ADN y revierte parcialmente el bloqueo en proliferación	116
5.3.7. La sobreexpresión de GARP en hASCs resulta en una ventaja selectiva de crecimiento en cultivos a largo plazo y aumenta la resistencia a la apoptosis.....	117
6. DISCUSIÓN.....	123
6.1. CD105	123
6.2. GARP	127
7. CONCLUSIONES	139
8. BIBLIOGRAFÍA.....	143
ANEXO I: PUBLICACIÓN	181

ABREVIATURAS

NOTA

A lo largo del texto se utilizarán abreviaturas de varios términos en inglés. Esto es debido al uso extendido del inglés en publicaciones científicas y al uso de abreviaturas en inglés de manera cotidiana en el lenguaje científico. Para simplificar el texto se mantendrán éstas últimas. Entre paréntesis se indican los términos en inglés.

7AAD: (*7-Aminoactinomycin D*): 7-aminoactinomicina D

AGIF: (*Adipogenesis inhibitory factor*): Factor inhibidor de adipogénesis

ALP: (*Alkaline phosphatase*): Fosfatasa alcalina

APC: (*Antigen presenting cell*): Célula presentadora de antígenos

ASCs: (*Adipose tissue derived mesenchymal stromal cells*): Células mesenquimales estromales derivadas de tejido adiposo

BM: (*Bone marrow*): Médula ósea

BM-MSCs: (*Bone marrow derived mesenchymal stromal cells*): Células mesenquimales estromales derivadas de médula ósea

BMPs: (*Bone morphogenetic proteins*): Proteína morfogénica ósea

BrdU: (*Bromodeoxyuridine*): Bromodesoxiuridina

CAFs: (*Cancer associated fibroblasts*): Fibroblastos asociados a cáncer

CD-AT: (*Collagenase type 1-digested adipose tissue*): Tejido adiposo digerido con colagenasa tipo 1

cDNA: (*Complementary deoxyribonucleic acid*): Ácido desoxirribonucleico complementario

CFSE: (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*): Carboxifluoresceína succinimidil ester

CFU-F: (*Colony-forming unit fibroblast*): Unidad formadora de colonias de fibroblastos

CMV: (*Cytomegalovirus*): Citomegalovirus

Colon-MSCs: (*Colon derived mesenchymal stromal cells*): Células mesenquimales estromales derivadas de colon

DCFDA: (*Dichlorofluorescein diacetate*): Diacetato de diclorofluoresceína

DCs: (*Dendritic cells*): Células dendríticas

DMEM: (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*): Medio de cultivo modificado de Dulbecco

DNA: (*deoxyribonucleic acid*): Ácido desoxirribonucleico

DSBs: (*Double strand breaks*): Roturas de cadena doble

EAE: (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*): Encefalomiелitis autoinmune experimental

ECM: (*Extracellular matrix*): Matriz extracelular

EDTA: (*Ethylenediaminetetraacetic acid*): Ácido etilendiaminotetraacético

EMT: (*Epithelial to mesenchymal transition*): Transición epitelio-mesénquima

FBS: (*Fetal bovine serum*): Suero bovino fetal

FDA: (*Food and Drug Administration*): Administración de Alimentos y Medicamentos

Flt3-L (FL): (*Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*): Ligando de tirosina quinasa 3 relacionada con fms

GARP: (*Glycoprotein A repetitions predominant*): Glicoproteína A en repeticiones predominantes

GFP: (*Green fluorescent protein*): Proteína verde fluorescente

GM-CSF: (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*): Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GRP78: (*Glucose-regulated protein 78*): Proteína regulada por glucosa 78

GVHD: (*Graft versus host disease*): Enfermedad injerto contra huésped

HBSS: (*Hank's Balanced Salt Solution*): Solución salina balanceada de Hank

HSCs: (*Hematopoietic stem cells*): Células troncales hematopoyéticas

HSP90: (*Heat shock protein 90*): Proteína de choque térmico 90

IDO: (*Indoleamine-2,3-dioxygenase*): Indolamina-2,3-dioxigenasa)

INF- γ : (*Interferon gamma*): Interferon gamma

IL: (*Interleukin*): Interleucina

iNOS: (*Inducible nitric oxide synthase*): Óxido nítrico sintasa inducible

IPGT: (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*): Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ISCT: (*International Society for Cellular Therapy*): Sociedad internacional de terapia celular

LAP: (*Latency associated peptide*): Péptido asociado de latencia

LAPTMP4B: (*Lysosomal-associated transmembrane protein*): Proteína transmembrana asociada a lisosomas 4B

LLC: (*Large latency complex*): Complejo grande latente

LPL: (*Lipoprotein lipase*): Lipoproteína lipasa

LPS: (*Lipopolysaccharide*): Lipopolisacárido

LRR: (*Leucin rich repeats*): Repeticiones ricas en leucina

LRRC32: (*Leucin rich repeats containing 32*): Repeticiones ricas en leucina que contienen 32

LTBP: (*Latent transforming growth factor beta binding protein*): Proteína de unión al factor de crecimiento transformante beta latente

MACS: (*Magnetic-activated cell sorting*): Separador de células activadas magnéticamente

mbTGF- β : (*membrane bound transforming growth factor beta*): Factor de crecimiento transformante beta unido a la membrana

MFI: (*Mean fluorescence intensity*): Intensidad media de fluorescencia

MHC-I: (*Major histocompatibility complex 1*): Complejo mayor de histocompatibilidad clase 1

MHC-II: (*Major histocompatibility complex 2*): Complejo mayor de histocompatibilidad clase 2

MMPs: (*Matrix metalloproteinases*): Metaloproteinasas de la matriz

mMSCs: (*Mouse mesenchymal stromal cells*): Células mesenquimales estromales de ratón

mRNA: (*Messenger ribonucleic acid*): Ácido ribonucleico mensajero

MSCs: (*Mesenchymal stromal cells*): Células mesenquimales estromales

mtROS: (*Mitochondrial reactive oxygen species*): Especies reactivas del oxígeno de mitocondria

NAC: (*N-acetylcysteine*): N-acetilcisteína

NK: del inglés "Células Natural Killer"

NO: (*Nitric oxide*): Óxido nítrico

NT: (*Non-transduced cells*): Células no transducidas

PBS: (*Phosphate buffered saline*): Buffer fosfato salino

PCR: (*Polymerase chain reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: (*Paraformaldehyde*): Paraformaldeído

PGE2: (*Prostaglandin E2*): Prostaglandina E2

PLK: (*Polo-like kinases*): Quinasas tipo polo

PPAR- γ : (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*): Receptor de peroxisoma-proliferador-activado

RFP: (*Red fluorescent protein*): Proteína roja fluorescente

RGD: (*Arg-Gly-Asp tripeptide*): Tripéptido Arginina-Glicina-Aspartato

RNA: (*Ribonucleic acid*): Ácido ribonucleico

ROS: (*Reactive oxygen species*): Especies reactivas del oxígeno

RTqPCR: (*Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa

SD: (*Standard deviation*): Desviación estándar
SDF1:(*Stromal cell-derived factor 1*): Factor 1 derivado de células estromales
shRNA: (*small hairpin ribonucleic acid*): Ácido ribonucleico en horquilla pequeña
SLC: (*Small latency complex*): Complejo pequeño latente
SMAP: (*Small acidic protein*): Proteína ácida pequeña
SNP: (*Single nucleotide polymorphism*): Polimorfismo de nucleótido único
SSBs: (*Single strand breaks*): Roturas de cadena sencilla
TGF-β: (*Transforming Growth factor beta*): Factor de crecimiento transformante beta
Th: (*T-helper cells*): Células T colaboradoras
TLR:(*Toll like receptor*): Receptor de tipo Toll
TNF-α: (*Tumor necrosis factor alpha*): Factor de necrosis tumoral alpha
TPO: (*Thyroid peroxidase*): Yoduro peroxidasa
Tregs: (*Regulatory T cells*): Células T reguladoras
TSA: (*Trichostatin A*): Tricostatina A
WJ-MSCs: (*Warthon Jelly derived mesenchymal stromal cells*): Células mesenquimales estromales derivadas de la gelatina de Warthon

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de las MSCs sobre las células del sistema inmunitario	21
Figura 2. Utilización de MSCs en terapia	24
Figura 3. Biodistribución de TGF- β	27
Figura 4. Papel de TGF- β en la diferenciación de las MSCs	31
Figura 5. Inmunomodulación de las MSCs mediada por TGF- β	34
Figura 6. Papel de GARP en la activación de TGF- β	42
Figura 7. Las MSCs de ratón son heterogéneas en su expresión de CD105L	80
Figura 8. La expresión de CD105 disminuye en cultivos confluentes de mASCs	81
Figura 9. CD105 define dos subpoblaciones diferentes de MSCs en ratón	82
Figura 10. La población CD105 ⁻ no representa células más diferenciadas que la CD105 ⁺	84
Figura 11. Las ASCs CD105 ⁻ son más propensas a diferenciarse hacia adipocitos y osteocitos	86
Figura 12. Comparación de la capacidad inmunomoduladora de las mASCs CD105 ⁻ y CD105 ⁺	88
Figura 13. Las MSCs expresan GARP y LAP/TGF- β en su membrana	91
Figura 14. GARP une LAP/TGF- β 1 a la superficie de las mASCs	93
Figura 15. GARP modula la secreción y activación de TGF- β 1	95
Figura 16. Expresión de GARP en ASCs humanas	97
Figura 17. Papel de GARP en la inmunomodulación mediada por ASCs	99
Figura 18. El silenciamiento de GARP afecta a la proliferación de las mASCs	102
Figura 19. Expresión de GARP en superficie e intracelularmente en MSCs humanas derivadas de varios tejidos	103
Figura 20. El silenciamiento de GARP inhibe la expansión de las hMSCs <i>in vitro</i> e induce apoptosis	105
Figura 21. La sobreexpresión de GARP en hASCs transducidas con LV#19 rescata su bloqueo en proliferación y previene la apoptosis	106

Figura 22. Las hASCs transducidas expresan niveles similares de transcritos de shRNAs inespecíficos y específicos para GARP	107
Figura 23. Dendrograma de grupo de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 y diagramas de Venn de las hASCs LV#18 y LV#19	108
Figura 24. El silenciamiento de GARP afecta al programa transcripcional de las hASCs, modulando genes involucrados en regulación del ciclo celular, apoptosis y reparación de DNA	110
Figura 25. IPA revela un bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular	111
Figura 26. Las hASCs GARP ⁻ se encuentran bloqueadas en la fase G2/M y exhiben un incremento en la sensibilidad al en DNA	113
Figura 27. Las hASCs GARP ⁻ muestran niveles más altos de mtROS	115
Figura 28. La inhibición de mtROS reduce las DSBs y revierte el bloqueo en proliferación de las hASCs GARP ⁻	117
Figura 29. La inhibición de la señalización por TGF- β en hASCs GARP ⁻ reduce ROS, daño en DNA y revierte parcialmente el bloqueo en proliferación	119
Figura 30. Las hASCs que sobreexpresan GARP muestran una ventaja selectiva de crecimiento	120
Figura 31. Las hASCs que sobreexpresan GARP son más resistentes a la apoptosis y al daño en DNA	122
Figura 32. Modelo propuesto del papel de GARP en la supervivencia de las MSCs	13

RESUMEN

Las células mesenquimales estromales (MSCs) son células multipotentes no hematopoyéticas presentes en prácticamente todos los tejidos y que presentan un alto potencial de inmunomodulación y de secreción de factores tróficos. Debido a estas propiedades, las MSCs han mostrado su potencial terapéutico en diferentes ensayos clínicos. Sin embargo, el beneficio clínico no ha sido homogéneo, obteniéndose resultados diferentes tanto en función de la patología como del grupo de investigación. Esto es en parte debido a la ausencia de una uniformidad en la caracterización de las MSCs así como a la necesidad de su expansión, que está asociada con numerosos problemas como son la pérdida de su capacidad de migración y diferenciación así como el incremento en mutaciones en el ADN.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una molécula pleiotrópica involucrada en múltiples procesos biológicos como proliferación, diferenciación, migración y respuesta inmunitaria. Se sabe que las MSCs son capaces de producir y de responder a TGF- β lo que tiene un gran impacto en su biología y potencial terapéutico. Dada la importancia de esta molécula sobre la biología de las MSCs, en la presente tesis nos hemos centrado en el estudio de dos moléculas presentes en las MSCs y que interactúan con TGF- β : CD105 (endoglina) y GARP (del inglés *Glycoprotein A repetitions predominant*). El objetivo de la presente tesis es entender las implicaciones de estas dos moléculas en la biología y capacidad terapéutica de las MSCs.

En primer lugar nos centramos en estudiar las subpoblaciones de MSCs CD105⁺ y CD105⁻ y encontramos que la subpoblación CD105⁻ presenta una mayor capacidad de diferenciación adipo y osteogénica, así como una mejor capacidad de inhibir la proliferación de las células T *in vitro*. Estos resultados podrían ser de gran utilidad a la hora de diseñar terapias con MSCs para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes así como para regeneración ósea.

En segundo lugar, estudiamos las implicaciones de GARP sobre la biología de las MSCs. Demostramos por primera vez que GARP se encuentra en la superficie de las MSCs en cultivo, uniendo TGF- β a la superficie celular y regulando su secreción y activación. Por lo tanto GARP podría ser utilizado como un nuevo marcador de superficie para la identificación de las MSCs. El silenciamiento de GARP mediante shRNA demostró el papel fundamental que juega esta proteína no solo en la capacidad de inmunomodulación de las MSCs (como cabría esperar por su papel como proteína de unión de TGF- β) sino también en su capacidad de proliferación. Efectivamente, la eliminación de GARP de las MSCs hacía que estas células perdieran parte de su capacidad de inhibir la proliferación de las células T y que dejaran de proliferar casi por completo.

Dado el efecto tan drástico que tenía la eliminación de GARP sobre la proliferación de las MSCs, procedimos a investigar los mecanismos involucrados. El silenciamiento de GARP en las MSCs dio como resultado un aumento de MSCs bloqueadas en la fase G2/M del ciclo celular y mayores niveles de roturas de ADN de doble cadena (DSBs). También observamos niveles elevados de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (mtROS) en las células GARP⁻ y que al añadir inhibidores de estas mtROS éramos capaces de revertir el bloqueo en proliferación. Por último, también vimos que la inhibición de la señalización por TGF- β en las células GARP⁻ producía una disminución de los niveles de mtROS y de DSBs y restauraba la habilidad de proliferación de estas células. Todos estos datos indican que GARP es imprescindible para la viabilidad de las MSCs evitando que los niveles de mtROS se incrementen en exceso como consecuencia de la señalización por TGF- β 1. Por último demostramos que la sobreexpresión de GARP proporciona una ventaja selectiva de crecimiento al evitar la muerte por daño en el DNA. Por lo tanto la sobreexpresión de GARP en MSCs podría ser una estrategia para la generación de MSCs con mejores características terapéuticas, mejorando su capacidad proliferativa e incrementando su resistencia a apoptosis.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Células mesenquimales estromales

1.1.1. Origen

El concepto actual de célula mesenquimal estromal (MSC) se definió tras varios experimentos que demostraron que el trasplante de médula ósea (BM) a diferentes sitios anatómicos da como resultado la generación de nuevos hueso y médula ectópicos.

Aunque los primeros ejemplos de estos estudios se remontan al siglo XIX, fueron los trabajos de Friedenstein y de Tavassoli los que demostraron que el potencial osteogénico observado tras el trasplante de médula, estaba asociado con una subpoblación minoritaria de células en la médula ósea (1,2).

Casi al mismo tiempo, en una serie de estudios de Owen y Macpherson se consiguió rastrear la cinética de las células óseas *in vivo* (3,4). No por casualidad, las líneas de pensamiento de Owen y Friedenstein se unieron en un punto que fue crucial para formular el concepto no sólo de una célula troncal para el hueso, sino también para otros tejidos. Por primera vez, condrocitos, osteoblastos y adipocitos de médula ósea se unieron en un sistema unificado. Friedenstein y Owen denominaron a las células de esta población como “células troncales estromales de médula ósea” (5,6).

Estos primeros experimentos proporcionaron evidencia de un potencial osteogénico inherente de las células en la médula ósea. Los siguientes pasos incluyeron el uso del cultivo celular como una forma de separar las células hematopoyéticas de las no hematopoyéticas (células estromales) que, en contraste con las primeras, pueden adherirse a un sustrato plástico. El trasplante de células estromales procedentes de cultivo *in vitro* con la finalidad de generar hueso, demostró que la fracción estromal estaba dotada de potencial osteogénico. Usando este mismo enfoque experimental, el mismo potencial se atribuyó más tarde a la fracción clonogénica de las células

estromales, es decir, a células capaces de llevar a cabo un crecimiento clonal y que son vistas por tanto como progenitoras (7–9).

Como se ha citado previamente, Friedenstein, a quien generalmente se le atribuye el descubrimiento de las MSCs, en un principio las denominó “células troncales estromales de médula ósea”. Varios años después, Caplan se centró en el potencial de diferenciación hacia varios linajes celulares de células estromales aisladas de médula ósea y las denominó “células mesenquimales troncales” (10). Sin embargo, estas células estromales que pueden encontrarse en prácticamente todos los tejidos y órganos no pueden considerarse una célula troncal por definición, ya que hay pocas evidencias de que estas células sean capaces de regenerar tejido a largo plazo, por lo que en el año 2005, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) intentó resolver la confusión generada sugiriendo el nombre de “células multipotentes mesenquimales estromales” para distinguirlas de las descritas por Friedenstein en médula ósea (11).

1.1.2. Caracterización

1.1.2.1. MSCs in vitro

Las poblaciones de MSCs son muy heterogéneas y su caracterización se ha visto dificultada por la pérdida de marcadores específicos cuando se aíslan y se mantienen en cultivo y la falta de modelos eficientes de trasplante *in vivo* que puedan demostrar la naturaleza de estas células (12).

Por todo ello, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha establecido tres criterios mínimos que cualquier MSC humana aislada de médula ósea y otros tejidos debe cumplir para ser considerada una verdadera MSC (13):

1. Capacidad para adherirse al plástico cuando se cultivan *ex vivo*, donde adquieren una morfología fibroblastoide.

2. Presencia de un patrón específico de expresión de antígenos de superficie: CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD11b⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD79a⁻, HLA-DR⁻.

3. Potencial de diferenciación hacia adipocitos, condroblastos y osteoblastos (*in vitro*).

Además de estos criterios, las MSCs también se identifican por su capacidad de auto renovación (14) y de generar unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-Fs) en cultivo (15).

La definición de Dominici se aplica a MSCs humanas, sin embargo, estos criterios no son válidos entre distintas especies y, en ocasiones, también difieren dentro de la misma especie. En modelos de ratón, las MSCs difieren en expresión de marcadores y comportamiento *in vitro*, no solo de las MSCs humanas, sino incluso entre distintas cepas (16). Aunque se sabe que las MSCs humanas son CD34⁻ *in vitro* (17) algunos estudios han reportado una expresión variable de este marcador en MSCs de ratón (16). Las MSCs de ratón también pierden o son heterogéneas para los marcadores CD73, CD90 (18) y CD105 (19).

Sin embargo, es importante señalar que estos criterios son dependientes de las condiciones de cultivo. Las diferencias en la expresión de muchos marcadores pueden estar influenciadas por factores secretados por el resto de células presentes en el cultivo, sobre todo en los pasajes iniciales y la expresión *in vitro* de muchos marcadores no siempre se correlaciona con la expresión *in vivo* (20,21).

1.1.2.2. MSCs *in vivo*

La definición de MSC descrita por Dominici en 2006, se basa exclusivamente en el fenotipo observado *in vitro*, lo que no da ninguna pista sobre las características innatas de estas células *in vivo*. Sin embargo, varios estudios en los que se han aislado pericitos (donde se incluyen capilares y microvasos), han mostrado que estos pericitos, independientemente de su tejido de origen, son indistinguibles de las MSCs convencionales en términos de adherencia, morfología, fenotipo y capacidad de

proliferación (22). Sin embargo, en función del tejido de origen, las características de estas células *in vivo* pueden variar. Se ha demostrado que las MSCs perivasculares de médula ósea están intrínsecamente orientadas a generar hueso y estroma de médula ósea, que incluye adipocitos, pero no son células con capacidad de diferenciación miogénica ni se diferencian espontáneamente hacia condroblastos *in vivo* (23). Esto mismo, se ha confirmado en otros estudios donde se ha visto que en trasplantes *in vivo* de células de médula ósea, estas células son capaces de formar hueso y apoyar la formación de médula, mientras que células estromales derivadas de grasa y cordón umbilical no lo son (24,25).

Los pericitos no son las únicas células perivasculares dotadas de potencial para dar lugar a MSCs. Una población de progenitores localizada en la capa más externa de arterias y venas, la túnica adventicia, también se ha identificado como una fuente de MSCs. Los progenitores adventicios son fenotípicamente y anatómicamente diferentes de los pericitos pero también expresan de forma nativa los marcadores de MSCs (26).

1.1.2.3. Fuentes de obtención de MSCs

Las MSCs se pueden aislar de numerosos tejidos además de médula ósea, como sangre periférica (27), sangre de cordón umbilical (28), gelatina de Wharton (29), tejido adiposo (30), líquido amniótico (In `t Anker et al. 2003), hueso compacto (32), periostio (33), membrana sinovial (34), cartílago (35) y tejidos fetales (Miao et al. 2006; Campagnoli et al. 2001).

Las células derivadas de los diferentes tejidos muestran heterogeneidad fenotípica y diferente capacidad de crecimiento *in vitro*, pero también presentan algunas similitudes como el potencial de diferenciación hacia las líneas mesenquimales clásicas y la expresión de los marcadores de superficie típicos de MSCs (38). Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que existen diferencias marcadas en la biología de las MSCs que dependen de su tejido de origen. Estas diferencias, parecen ser la principal fuente de variación de las propiedades biológicas de las MSCs (39). Dentro de cada tejido específico, se sabe que

las células derivadas de MSCs procedentes de clones diferentes, son altamente heterogéneas en su potencial de proliferación y diferenciación (40).

1.1.2.4. Capacidad de diferenciación

Como se ha citado previamente, entre los criterios utilizados para definir las MSCs se encuentra su capacidad de diferenciación *in vitro* hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

- Diferenciación osteogénica: La osteogénesis es un conjunto organizado de procesos celulares estrictamente dirigidos por diversos factores solubles, como citoquinas y moléculas de la matriz extracelular (41). La diferenciación osteogénica se consigue utilizando β -glicerolfosfato y ácido ascórbico en el medio de cultivo. La adición de estos compuestos da como resultado una inducción de la actividad de la fosfatasa alcalina y la deposición de matriz mineralizada (15). En la diferenciación osteogénica también están involucradas otras moléculas como las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), o el factor de transcripción Runx2 (42,43).

- Diferenciación adipogénica: Este proceso se puede dividir en 2 fases. En la primera, las MSCs multipotentes se comprometen a diferenciarse hacia adipocitos. Morfológicamente, los pre-adipocitos presentan fenotipo fibroblastoide y no se pueden distinguir claramente de las MSCs precursoras. En la segunda fase, los pre-adipocitos se vuelven adipocitos y adquieren nuevas funciones como la síntesis y el almacenamiento de lípidos, así como la producción de proteínas específicas (44). *In vitro*, la diferenciación adipogénica requiere el tratamiento con dexametasona, insulina, isobutil metilxantina e indometacina. En general, la adipogénesis es un proceso secuencial y temporalmente ordenado que involucra múltiples cascadas de señalización que convergen a nivel de la actividad transcripcional del receptor de peroxisoma-proliferador-activado (PPAR- γ) (45).

-Diferenciación condrogénica: La condrogénesis se consigue cultivando las MSCs en presencia de factores de crecimiento de la súper-familia TGF- β (Factor de crecimiento transformante- β) (46). La diferenciación de MSCs en cartílago se caracteriza por la

inducción de genes específicos de cartílago, de colágeno tipo II y IX, de agregano y por la biosíntesis de proteoglicanos. La condrogénesis engloba una serie de procesos moleculares y celulares altamente regulados e interconectados (47). El proceso está controlado por interacciones celulares con la matriz circundante, con factores de crecimiento y de diferenciación y con otros factores que inducen o inhiben determinadas vías de señalización. Además, también están implicados en el control del desarrollo de tejido cartilaginoso, un número elevado de factores morfogénéticos como proteínas Wnt o ligandos del receptor Notch (48).

Es importante señalar que bajo las condiciones adecuadas, las MSCs se han mostrado capaces de diferenciarse hacia otros linajes mesenquimales como miocitos y tenocitos del tejido esquelético (49,50). Además, hay estudios que indican que las MSCs tienen capacidad de diferenciarse hacia linajes no mesenquimales como neuronas. Sin embargo, la relevancia clínica de este presunto potencial no mesenquimal de las MSCs se ha visto cuestionado, ya que las células similares a las neuronas que se han derivado de las MSCs no parecen ser capaces de funcionar de la misma forma que las auténticas neuronas (51).

1.1.3. Funciones

1.1.3.1. Regulación de la hematopoyesis

Como se citó previamente, se sabe que las MSCs son elementos no hematopoyéticos en la médula ósea que proporcionan un sistema de apoyo estructural para el desarrollo de células hematopoyéticas (52). Conceptualmente, una célula mesenquimal estromal es capaz de generar un hueso heterotópico completo *in vivo*, incluyendo un compartimento de células estromales perivasculares con fenotipo y características similares que la célula originalmente explantada (53,54). La producción de células hematopoyéticas ocurre principalmente en la médula ósea. Las MSCs actúan como precursores *in vivo* de algunos de los componentes no hematopoyéticos de la médula ósea que regulan la hematopoyesis, como osteoblastos, adipocitos y células reticulares fibroblásticas. (1).

Las MSCs pueden liberar diferentes citoquinas. Algunas de estas citoquinas pueden afectar a los procesos de maduración, proliferación y diferenciación de las células

troncales hematopoyéticas (HSCs) como la interleucina (IL)-6, el ligando Flt3-L (FL), el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), la trombopoyetina (TPO) o el factor derivado de células estromales¹ (SDF1) (55).

Además de la producción de estas citoquinas y factores de crecimiento, el contacto directo entre MSCs y HSCs apoya la diferenciación de las últimas hacia glóbulos rojos maduros.

Por último, en el microambiente de la médula ósea, las HSCs residen en nichos creados por las células circundantes, factores solubles y proteínas de la matriz extracelular que promueven el mantenimiento de las células hematopoyéticas. Los osteoblastos parecen tener un papel crucial durante el proceso de elaboración de estos nichos y para el mantenimiento de la homeostasis de las HSCs a través de interacciones celulares o a través de la secreción de otros factores solubles. El estroma de la médula ósea también se compone de adipocitos derivados de MSCs que parecen tener una función como reguladores negativos de los progenitores hematopoyéticos tempranos (56).

1.1.3.2. Efecto de las MSCs en el sistema inmunitario

Las MSCs expandidas *in vitro* pueden migrar a sitios de inflamación (57) y son potentes reguladoras de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa tanto *in vitro* como *in vivo* (58).

- Las MSCs modulan la respuesta inmunitaria in vitro

Cultivos *ex vivo* de MSCs con células T suprimen la proliferación de dichas células T. También disminuyen los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como la Interleucina 12 (IL-12), el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y el interferón (IFN)- γ , a la vez que aumentan los niveles de citoquinas anti-inflamatorias como la Interleucina 10 (IL-10). Los mecanismos por los que se produce la inhibición de los linfocitos T son variados. Se ha visto que hay varias moléculas involucradas en este proceso: TGF- β , Prostaglandina E-2 (PGE₂), Indolamina 2,3 Dioxigenasa (IDO) y Oxido Nítrico (NO) entre otras (12).

Las MSCs también son capaces de modular la función de las células B. En algunos estudios se ha visto que las MSCs son capaces de inhibir la proliferación de las células B estimuladas con anti-CD40L en combinación con Interleucina 4 (IL-4). Las MSCs también pueden inhibir la diferenciación de las células B y su expresión constitutiva de receptores de quimioquinas. Estos efectos dependen de la liberación de factores solubles y del contacto célula-célula (59).

Por otro lado, las MSCs pueden inhibir la actividad citotóxica y la proliferación de las células NK (*Natural Killer*), así como la producción de IFN- γ , por la disminución de la expresión de NKG2D (receptor activador presente en las células NK).

También se sabe que las MSCs inhiben la generación de células dendríticas (DCs) maduras y dificultan su habilidad para inducir activación de células T. Las MSCs interfieren en la diferenciación de DCs, ya que son capaces de inducir en estas células una apariencia de célula inmadura que exhibe un fenotipo inhibitorio (60). Este fenómeno está asociado con la síntesis de IL-6, del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) o de PGE₂ (61).

Finalmente, también se sabe que cuando se co-cultivan macrófagos con MSCs se produce un incremento en la producción de IL-10 e IL-6 y una disminución de la producción de IL-12 y TNF- α . Estos macrófagos, han sido definidos como un tipo de macrófagos activados alternativamente, diferente del resto de los macrófagos (62).

En resumen, las MSCs son capaces de modular la función de diferentes células, tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, involucradas en la respuesta inmunitaria (Figura 1).

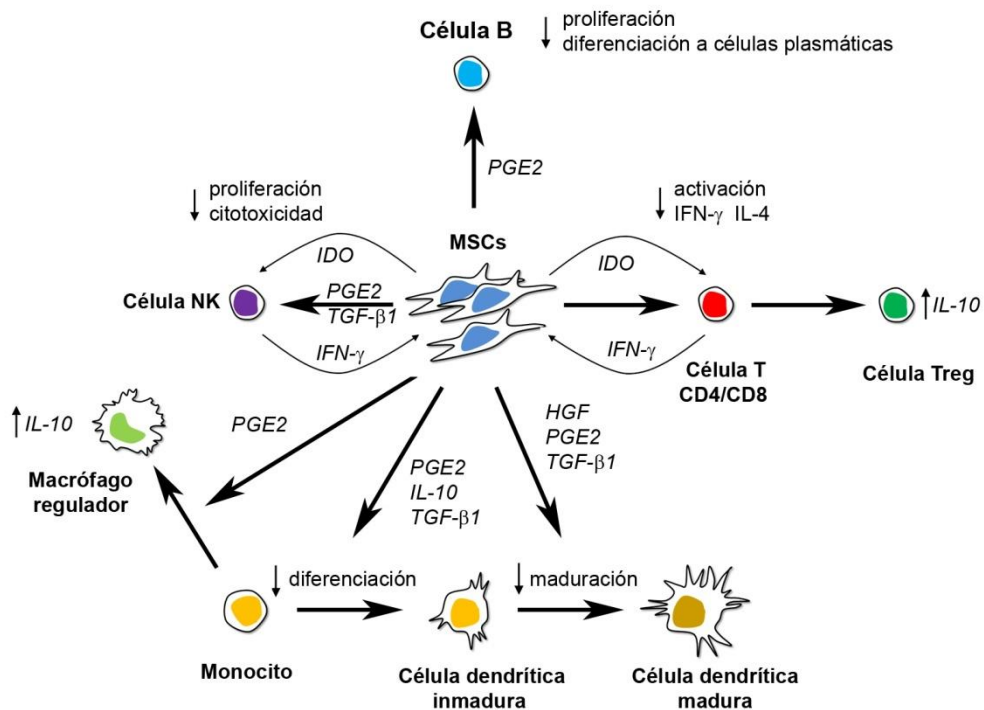


Figura 1: Efecto de las MSCs sobre las células del sistema inmunitario

- Las MSCs modulan la respuesta inmunitaria *in vivo*

La capacidad inmunomoduladora de las MSCs también se ha estudiado *in vivo*. La administración de MSCs es capaz de mejorar la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) en ratones mediante la regulación de la respuesta de las células T autorreactivas y la función de las células dendríticas (63). La terapia con MSCs también se ha mostrado capaz de mejorar de forma eficiente la patogénesis de la diabetes en ratones atenuando la respuesta Th1 junto con la expansión/proliferación de las células T reguladoras (Tregs) (64). Las MSCs derivadas de tejido adiposo inducen macrófagos inmunomoduladores capaces de disminuir la progresión y evitar la recurrencia de la colitis experimental así como de proteger a los ratones con sepsis severa reduciendo la infiltración de células inflamatorias (65). Además, la administración de MSCs aisladas de BM, cordón umbilical o tejido adiposo provoca un aumento pronunciado de los macrófagos alveolares e inhibe

las características distintivas del asma, incluida la hiperreactividad de las vías respiratorias, la acumulación de eosinófilos y la producción de citocinas Th2 (66). También se ha comprobado que las MSCs son capaces de prevenir el daño tisular en un modelo de artritis inducida por colágeno mediante la producción de células Tregs específicas (67). Finalmente, las MSCs se han utilizado con éxito para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) en modelos de ratón (68).

Estos resultados pre-clínicos, muestran que las MSCs poseen una amplia actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria en modelos animales de enfermedad *in vivo* lo que sugiere que las MSC pueden ser un candidato prometedor para una posible aplicación clínica en el tratamiento de trastornos de base inmunitaria en humanos.

1.1.3.3. Reparación de tejidos

Un aspecto clave para poder estudiar la función de las MSCs *in vivo* es definir su localización anatómica en diversos órganos. Como se ha citado previamente, hay varios estudios que apoyan la localización perivascular de estas células.

Cuando se produce un daño tisular los las células perivasculares son capaces de separarse del vaso sanguíneo y de transformarse en MSCs activas. Estas MSCs, migran al tejido dañado y participan activamente en la reparación del mismo. Las MSCs llevan a cabo esta función a través de la secreción de moléculas tróficas capaces de inhibir la apoptosis y los procesos de cicatrización. Cuando las MSCs llegan al tejido dañado también se produce una estimulación de la angiogénesis mediada por dichas células y una secreción de mitógenos capaces de estimular a los progenitores del tejido intrínseco a dividirse y diferenciarse apropiadamente (69).

1.1.3.4. Papel de las MSCs en Cáncer

La progresión tumoral ya no se considera un evento autónomo de células cancerosas, sino que involucra múltiples tipos de células presentes en el microambiente tumoral. Las MSCs procedentes de médula ósea y de tejido adiposo pueden migrar hacia el tumor (70),

incorporarse al microambiente tumoral y promover el crecimiento tumoral y la metástasis (71). Estos procesos los llevan a cabo a través de su diferenciación a fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) (72) y de la expresión de factores de crecimiento y/o citoquinas inmunomoduladoras que pueden promover la angiogénesis y el crecimiento tumoral, inhibir las respuestas inmunitarias anti-cancerígenas e inducir la transición epitelio-mesenquimal (EMT) en células tumorales (73).

Sin embargo, en otros estudios también se han mostrado las propiedades anti-tumorales de las MSCs *in vitro* (74,75). Las MSCs se han usado como herramienta terapéutica para el tratamiento del carcinoma hepatocelular *in vivo* (76), mieloma (77) y melanoma (78). En otro estudio, se ha visto que la administración de MSCs puede potenciar el efecto anti-tumoral de la irradiación *in vivo* (79).

1.1.4. Terapia celular con MSCs

1.1.4.1. Aplicaciones clínicas de las MSCs

Las MSCs poseen características únicas que las convierten en una herramienta prometedora para la terapia de varias enfermedades. Primero, su habilidad de diferenciación hacia diferentes linajes celulares. Segundo, la secreción de factores tróficos y la capacidad inmunomoduladora de estas células que puede proporcionar importantes beneficios terapéuticos. Finalmente, la capacidad de las MSCs de migrar hacia zonas de daño tisular y hacia ambientes tumorales también es una característica que las hace ideales para su uso en clínica (Figura 2) (80).

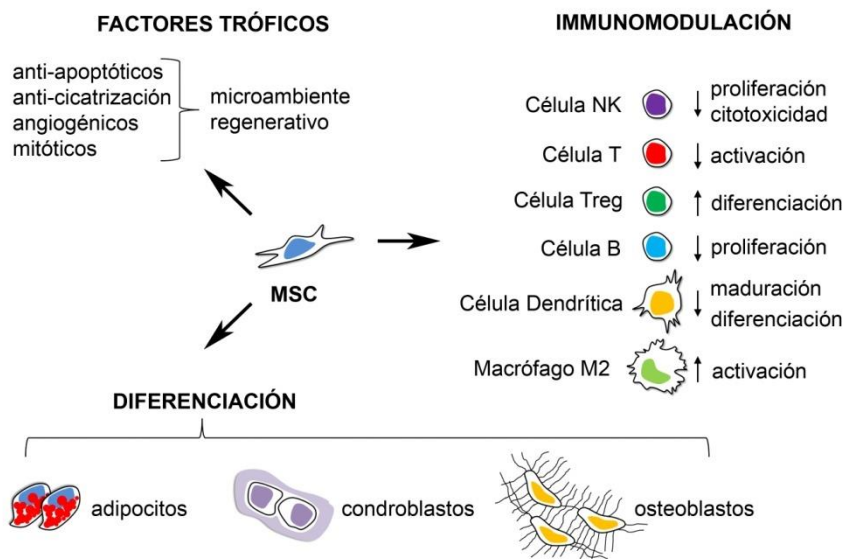


Figura 2: Utilización de MSCs en terapia: La secreción de moléculas tróficas y su capacidad inmunomoduladora y de diferenciación hace de las MSCs una herramienta prometedora para su uso en medicina regenerativa y en el tratamiento de enfermedades inflamatorias/autoinmunes.

A pesar de ello, también se presentan algunos problemas a la hora de usar estas células como herramienta terapéutica. Uno de los principales problemas es la necesidad de expandirlas *in vitro* debido al gran número de células que se requiere por paciente (81). La expansión de las MSCs está asociada con varios problemas como la pérdida de su capacidad de migración (82), inicio del proceso de senescencia (83), disminución de su capacidad de diferenciación (84) y un aumento de la susceptibilidad a la transformación maligna y a la inestabilidad genómica (85), lo que limita la utilidad de estas células en clínica.

Hay algunos grupos tratando de minimizar el efecto de la expansión de las MSCs en su capacidad terapéutica. La senescencia celular se puede reducir modulando los niveles de estrés oxidativo, ya que este estrés es una de las principales causas de senescencia. Algunos estudios han sugerido que las MSCs cultivadas bajo condiciones de hipoxia pueden escapar de la senescencia y muestran una mayor esperanza de vida (86,87). Los

antioxidantes pueden ser otra alternativa segura y efectiva para superar la senescencia de las MSCs. La adición de ácido ascórbico o N-acetilcisteína (NAC) a los cultivos celulares prolonga la esperanza de vida replicativa de estas células (88,89). También se ha tratado de disminuir el efecto deletéreo de la expansión de las MSCs mediante la modulación de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, mediante la adición de diferentes factores de crecimiento (90) o mediante la utilización de medios de cultivo alternativos (91), se ha podido observar un aumento en la capacidad de proliferación de las MSCs. Aunque algunos estudios están mostrando resultados prometedores, sigue siendo necesario investigar como mejorar la proliferación y supervivencia de las MSCs para poder trasladar su uso a clínica de forma más satisfactoria.

1.1.4.2. Ensayos clínicos

Según la base de datos oficial de ensayos clínicos (<http://clinicaltrials.gov>), actualmente hay alrededor de 500 ensayos utilizando MSCs. Uno de los ensayos clínicos más exitosos utilizando MSCs para el tratamiento de GVHD fue el llevado a cabo por el grupo de Katarina Le Blanc en el instituto Karoliska de Suecia. En este ensayo, se inyectaron MSCs haploidénticas en un paciente que había desarrollado GVHD agudo a los 2 meses de haber recibido un trasplante de médula ósea. Presentaba la enfermedad en estadio IV, mostrando resistencia severa al tratamiento, alta frecuencia de diarrea, importantes daños en el hígado e infecciones recurrentes. Pocos días después de la administración de MSCs empezaron a remitir los signos característicos de esta enfermedad y el paciente terminó por recuperarse por completo (92). Posteriormente se han seguido utilizando las MSCs para el tratamiento de GVHD tras el trasplante de médula ósea (93), para la recuperación del tejido cardíaco tras un infarto de miocardio (94) o para el tratamiento de enfermedades como la esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica (95), entre otras. La mayoría de estos ensayos están en fases tempranas (I o II) y solo un pequeño número de esos ensayos, se encuentran en fase III. En uno de estos ensayos en fase III, en el que se utilizan MSCs para el tratamiento de las fístulas que aparecen en pacientes con enfermedad de Crohn, se han obtenido respuestas clínicas alentadoras además de

demostrar que se pueden utilizar estas células de forma segura (96). Además, existen dos productos basados en MSCs (Holoclar y Prochymal) que han sido aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) para la reparación de la córnea y para el tratamiento de GVHD, respectivamente.

A pesar de ello, algunos ensayos en fase III, en los que se utilizan MSCs para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, no han sido capaces de mostrar beneficios clínicos significativos, lo cual sugiere que aún se necesita una mejor caracterización de las preparaciones de MSCs y una mejor comprensión de la biología de las mismas.

1.2. TGF- β

1.2.1. Definición y producción

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es una molécula pleiotrópica involucrada en múltiples procesos biológicos como proliferación, diferenciación y migración. Lleva a cabo un papel importante en el proceso de modulación de la inflamación, homeostasis y tolerancia inmunológica (97,98). Defectos en la función de TGF- β están asociados con un gran número de estados patológicos, incluyendo crecimiento de células tumorales, fibrosis y enfermedades autoinmunes (99). Ratones deficientes en TGF- β manifiestan desordenes inflamatorios multifocales y mueren a las cuatro semanas de su nacimiento (100).

En mamíferos, hay tres genes situados en cromosomas diferentes que codifican para tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3). Estas isoformas presentan sobre un 70% de homología entre ellas (101).

Las tres isoformas de TGF- β se codifican como una proteína precursora que tiene de 390 a 412 aminoácidos. Esta proteína se somete a varios pasos de procesamiento intracelular antes de su secreción por parte de la célula. El paso más importante parece ser la digestión proteolítica del precursor por medio de una endopeptidasa (furina), que

produce un corte en esta proteína entre los aminoácidos 278 y 279. Los dos productos de la proteólisis se ensamblan en dos homodímeros, uno de 75kDa en la región N-terminal, que se denomina péptido asociado de latencia (LAP) y otro de 25kDa en la región C-terminal, que se denomina TGF- β maduro. Estos dos homodímeros se ensamblan entre sí formando la estructura LAP/TGF- β . Esta estructura forma el complejo pequeño latente (SLC), que puede permanecer en la célula originando el TGF- β asociado a la membrana (mbTGF- β), secretarse fuera de la célula dando lugar al TGF- β soluble o puede unirse con una proteína denominada proteína de unión a TGF- β latente (LTBP), que forma un enlace disulfuro con una de las cadenas de LAP, dando lugar al complejo grande latente (LLC). Es este complejo el que se secreta fuera de la célula donde se une a la matriz extracelular (ECM) a través de sitios de unión presentes en LTBP (Figura 3) (102).

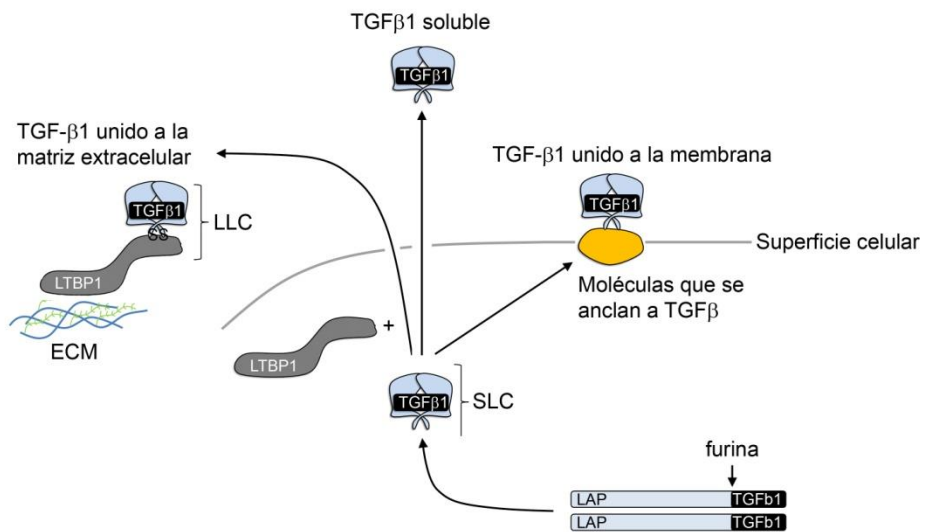


Figura 3: Biodistribución de TGF- β : Procesamiento de TGF- β en el interior celular. Formación del TGF- β de membrana (mbTGF- β), del TGF- β soluble y de la forma anclada a la matriz extracelular.

1.2.2. Activación

La concentración extracelular de TGF- β se encuentra regulada por la conversión del TGF- β latente a activo. La mayoría de los tejidos contienen cantidades significativas de TGF- β

latente y la activación de solo una pequeña fracción de este TGF- β puede generar la máxima respuesta por parte de la célula (103).

La activación de TGF- β requiere su liberación de LAP. En el caso del TGF- β que permanece anclado a la membrana (mbTGF- β) esta liberación se produce a través de integrinas (α V β 6 y α V β 8). Estas integrinas son capaces de unirse a motivos RGD (tripéptido arginina-glicina-aspartato) que hay presentes en LAP, provocando un cambio conformacional del mismo y permitiendo la liberación de TGF- β (104).

En el caso del TGF- β que se une a la matriz extracelular, TGF- β tiene que liberarse de LAP y de LTBP en el LLC. Primero se produce la liberación de LLC de la matriz extracelular y, a continuación, un cambio conformacional o la proteólisis de LAP, para que se libere TGF- β y pueda unirse a sus receptores específicos y producir una respuesta celular (101).

Perturbaciones de la ECM debido a la angiogénesis, cicatrización e inflamación da como resultado la liberación de TGF- β activo (103) a través de la acción de varias proteínas, incluyendo trombospondina, plasmina, metaloproteinasas de matriz (MMP) -2 y -9, neuropilina e integrinas (101).

1.2.3. Las MSCs producen y responden a TGF- β

Las MSCs humanas de distintos tejidos producen TGF- β 1 (Ryan et al. 2007; Zhou et al. 2011; Heo et al. 2016). Además, también hay estudios donde se muestra que estas células también producen TGF- β 2 y TGF- β 3 (108,109). La producción de TGF- β por las MSCs puede ser modulada por citoquinas pro-inflamatorias, agonistas de los receptores tipo Toll (TLR), rigidez del sustrato e hipoxia (105,110,111). A consecuencia de ello, las MSCs aisladas de pacientes que sufren enfermedades inflamatorias o cáncer, exhiben niveles alterados de TGF- β 1 en comparación con los niveles producidos por MSCs de donantes sanos (112,113). En un estudio reciente, se ha visto que las MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs) aisladas de pacientes con enfermedad de Crohn, secretan significativamente menos niveles de TGF- β y son menos efectivas en inducir macrófagos M2 que las aisladas de donantes sanos (114).

Las MSCs también son capaces de responder a TGF- β lo que tiene un gran impacto en su biología y potencial terapéutico. Los miembros de la súper-familia TGF- β inducen señalización a través de su unión a sus receptores transmembrana (TGF β R1 y TGF β R2) (115). El TGF- β se une al receptor TGF β R2, lo que permite el reclutamiento de TGF β R1. Entonces, TGF β R2 activa la quinasa de TGF β R1 (ALK5) que propaga la señalización a través de la activación de proteínas SMAD. La señalización de TGF- β a través de ALK5 induce la activación de SMAD2 y SMAD3 (116). TGF β R2 también puede activar ALK1 que propaga la señalización a través de la fosforilación de SMAD1 y SMAD 5 (117). Además, las MSCs expresan varios co-receptores de TGF- β como el receptor TGF β R3 (betaglicano) (118), la endoglina (CD105) que facilita la unión de TGF- β al receptor TGF β R2 y promueve la señalización vía SMAD2 (119) o CD109 que es un inhibidor de la señalización de TGF- β (120).

1.2.4. Efectos de TGF- β en la proliferación de MSCs

TGF- β se ha descrito como un regulador bifuncional del crecimiento celular desde hace más de 30 años (121). Aunque TGF- β inhibe la proliferación de células epiteliales, es capaz de promover la proliferación de varios tipos de células mesenquimales (122).

La expansión de las MSCs para su utilización en clínica disminuye su eficacia terapéutica. La comprensión del efecto de TGF- β en la proliferación de las MSCs es un paso importante para la composición de medios libres de suero con los que poder expandir estas células con la finalidad de usarlas en clínica (123). Varios grupos han demostrado que TGF- β 1 promueve la proliferación de las células mesenquimales estromales humanas derivadas de médula ósea (hBM-MSCs) y que la sobreexpresión de TGF- β 1 aumenta significativamente la proliferación en MSCs derivadas de líquido sinovial (124,125). Por el contrario, en otros estudios se ha visto que la señalización por TGF- β en MSCs puede inhibir su proliferación (126,127). Se ha visto que tanto TGF- β 1 como TGF- β 2 pueden inhibir la proliferación de las hBM-MSCs (128,129).

Estos resultados contradictorios se pueden deber a efectos bifásicos dependientes de la dosis de TGF- β , de forma similar a lo que ocurre en células troncales hematopoyéticas y células endoteliales (130,131). De acuerdo con esos resultados, en dos estudios utilizando células mesenquimales derivadas de BM y de próstata se ha visto que a bajas dosis de TGF- β 1 ($\leq 0,25$ ng/ml) se aumenta la proliferación de las células, mientras que a altas dosis (≤ 1 ng/ml) se inhibe (Zhou et al. 2003; Ng et al. 2012).

1.2.5. Efectos de TGF- β en la diferenciación de MSCs

TGF- β es un regulador importante en el proceso de diferenciación de las MSCs. En varios estudios, utilizando MSCs derivadas de diferentes tejidos se ha visto que las células presentan una mejor capacidad de diferenciación hacia condroblastos tras la estimulación con TGF- β 1 tanto *in vitro* como *in vivo* (134,135). Aunque normalmente se usa TGF- β 1 para inducir condrogénesis en MSCs humanas (hMSCs), hay varios estudios que demuestran que TGF- β 2 y TGF- β 3 son factores condrogénicos más eficientes (solos o en combinación con otros factores) ya que son capaces de inducir niveles más altos de colágeno II y una mayor deposición de glucosaminoglicanos (136). Además del isotipo de TGF- β utilizado y de la dosis, algunos grupos han logrado mejorar el potencial condrogénico de las MSCs a través de la sobreexpresión de TGF- β 1 o alguno de sus receptores (Figura 4) (137,138).

TGF- β también es importante en el proceso de diferenciación osteogénica de las MSCs. En condiciones fisiológicas, un gradiente controlado de TGF- β 1 recluta BM-MSCs a los sitios de remodelación ósea donde se someten a la diferenciación hacia osteoblastos en respuesta a factores osteotrópicos locales. La sobreexpresión de TGF- β 1 activo en la médula ósea, interrumpe este gradiente de TGF- β 1 e inhibe el reclutamiento de BM-MSCs, lo que da lugar a una remodelación ósea defectuosa (139). Aunque TGF- β 1 promueve la osteogénesis a través del reclutamiento y la proliferación de MSCs, varios estudios han mostrado que TGF- β también puede inhibir su maduración, mineralización y transición hacia osteocitos (Figura 4) (140).

TGF- β también está involucrado en la modulación de la adipogénesis. Varios estudios han demostrado que TGF- β 1 inhibe la adipogénesis de las MSCs (Figura 4). El bloqueo de la señalización de TGF- β utilizando inhibidores o reduciendo la expresión del receptor TGF β R2, aumenta de forma significativa la capacidad de diferenciación adipogénica de las MSCs (141,142).

Finalmente, varios grupos han mostrado evidencias de que TGF- β puede promover la diferenciación hacia células musculares (143,144) y hacia células del tendón (Figura 4)(145,146).

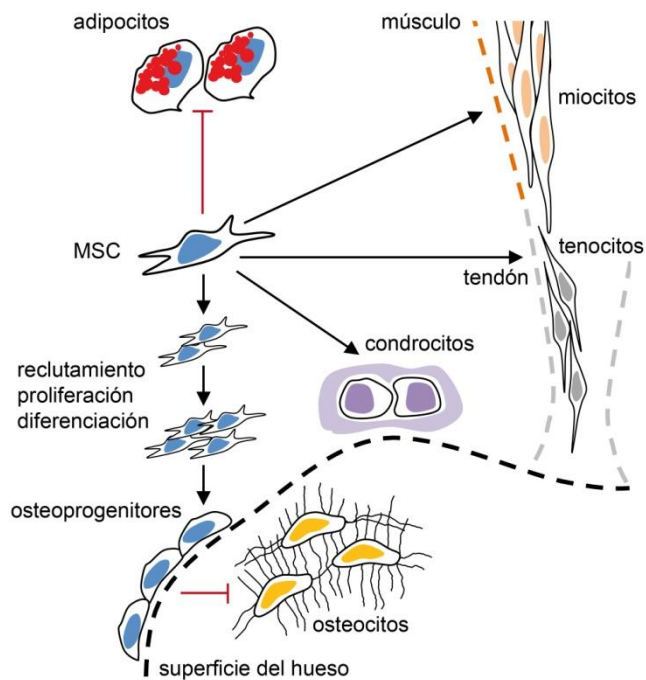


Figura 4: Papel de TGF- β en la diferenciación de las MSCs: TGF- β es capaz de promover (líneas negras) la diferenciación hacia condrocitos, tenocitos y miocitos así como de reclutar y promover la diferenciación de los progenitores osteogénicos. Sin embargo, también es capaz de inhibir (líneas rojas) la diferenciación hacia adipocitos y la maduración de los osteoprogenitores hacia osteocitos.

1.2.6. TGF- β y las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs

La capacidad de inmunomodulación de las MSCs depende en gran medida de la capacidad de estas células de producir y responder a TGF- β . El TGF- β presente en los tejidos diana modula las respuestas de las MSCs principalmente a través de su reclutamiento. Algunos estudios han mostrado que el TGF- β activo liberado de la ECM cuando se produce daño e inflamación, es capaz de reclutar MSCs que participan en la reparación del tejido y la regulación inmunitaria. TGF- β 1 es importante para la movilización de MSCs de la médula ósea a la sangre periférica y su subsecuente reclutamiento a sitios de reparación arterial (147).

Una vez que las MSCs llegan al sitio diana, son activadas por mediadores inflamatorios, especialmente IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , que inducen enzimas inmunosupresoras como la óxido nítrico sintasa (iNOS) y la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) (148) y aumentan la expresión de citoquinas inmunosupresoras como el TGF- β 1 (149).

Se ha demostrado que el TGF- β derivado de las MSCs modula la actividad de las células T, las células NK, mastocitos y macrófagos/microglia tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.2.6.1. Inhibición de la proliferación de células T

TGF- β 1 es un regulador fundamental del sistema inmunitario adaptativo, pero el papel específico que lleva a cabo en la inhibición de la activación/proliferación de las células T no está muy claro (150).

Varios grupos han mostrado que MSCs derivadas de distintos tejidos (médula ósea, pulpa dental y cordón umbilical) son capaces de suprimir la proliferación de las células T *in vitro* en parte debido a la producción de TGF- β 1 (110,151,152). Al mismo tiempo, otros grupos no han podido demostrar que TGF- β 1 juegue un papel clave en la supresión de células T mediada por MSCs *in vitro* (153,154). Estos datos contradictorios sugieren un papel de TGF- β 1 redundante y/o dependiente del ensayo. El efecto del TGF- β derivado de MSCs puede ser tanto directo como indirecto actuando tanto en células presentadores de antígenos (APCs), como en células dendríticas, macrófagos y células B. Sin embargo, este

TGF- β no parece modular la diferenciación/maduración de las células dendríticas, al menos *in vitro* (60,155).

Además, también hay datos que indican que la señalización por TGF- β en MSCs puede reducir su potencial inmunomodulador. Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo por Xu y colaboradores se ha demostrado que TGF- β 1 y TGF- β 2 (tanto añadidos de forma exógena como el que producen las MSCs) bloquea la inducción de iNOS (Óxido nítrico sintasa inducible) en las MSCs, lo que da lugar a una reducción de su capacidad para inhibir la proliferación de las células T (156). También se ha visto que TGF- β 1 es un inhibidor deIDO en fibroblastos humanos (157) y en MSCs derivadas de cordón umbilical (a nivel de mRNA), lo que sugiere que TGF- β también podría reducir la capacidad inmunomoduladora de las MSCs humanas. En esa misma línea, en otro estudio reciente se ha mostrado que TGF- β 1 y TNF- α promueven un fenotipo pro-inflamatorio de las MSCs, caracterizado por la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias (CCL2, IL-8 y cox-2) (158) .

1.2.6.2. Inducción de células T reguladoras (Tregs) y modulación de las células T colaboradoras

La inducción de tolerancia inmunológica es clave para obtener una solución a largo plazo de enfermedades inflamatorias/autoinmunes y TGF- β 1 es un inductor importante de células T reguladoras en el timo y en la periferia (159). MSCs derivadas de varios tejidos, pueden inducir células Tregs Foxp3⁺ *in vitro* mediante mecanismos que involucran TGF- β 1 (155,160).

Además de la inhibición de la proliferación de células T y de la inducción de Tregs, el TGF- β 1 derivado de MSCs también puede modular la diferenciación de células T colaboradoras (Th). Por ejemplo, tanto las MSCs de ratón como de rata promueven la respuesta de las células Th2 mientras que inhiben la de las Th17 *in vitro* mediante la secreción de TGF- β 1 (161,162).

1.2.6.3. Activación de macrófagos/microglia

TGF- β puede llevar a los macrófagos hacia un estado de activación M2 antiinflamatorio que participa en la cicatrización de heridas y la inhibición de la respuesta inmunitaria (163). El TGF- β 1 derivado de MSCs puede inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias inducida por Lipopolisacárido (LPS) en microglia, cambiando así su fenotipo de un estado de activación M1 a uno M2 (164). En otro estudio, utilizando un modelo de asma inducido por ovoalbúmina, se encontró que la inyección de hBM-MSCs producía una mejora en la enfermedad que se correlacionaba con un aumento de macrófagos M2 en el pulmón. La inhibición *in vivo* de TGF- β disminuía la inducción de macrófagos M2 al igual que los efectos terapéuticos del trasplante de MSCs (165).

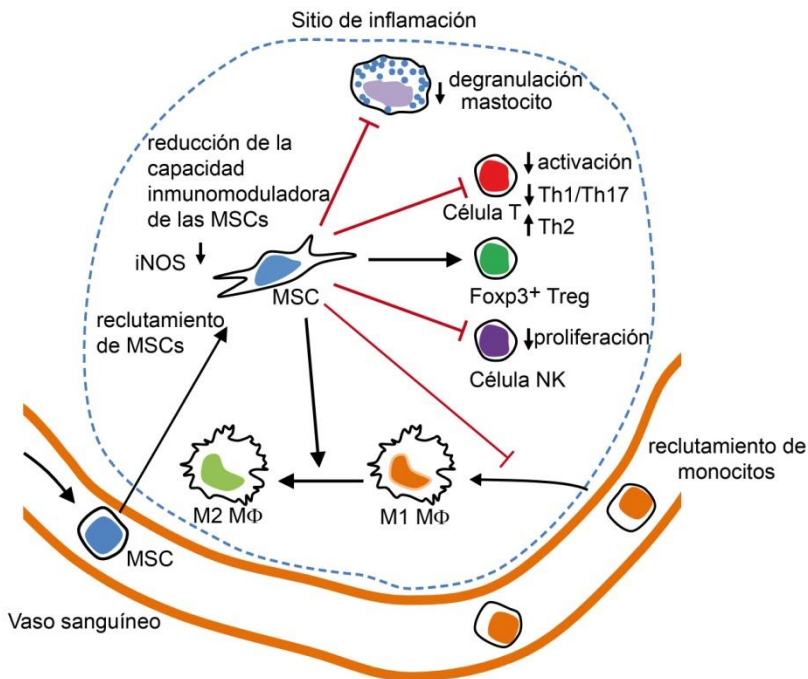


Figura 5: Inmunomodulación de las MSCs mediada por TGF- β : En lugares de inflamación, las MSCs son capaces de responder a TGF- β y de promover mediante esta respuesta la inducción de células T reguladoras, la respuesta Th2 por parte de las células T, el paso de macrófagos M1 a M2 y el reclutamiento de más MSCs hacia la zona dañada. Así mismo, las MSCs pueden inhibir la activación de las células T, la respuesta Th1/Th17,

la proliferación de las células NK y el reclutamiento de monocitos que puedan diferenciarse a macrófagos M1 a la zona inflamada.

1.2.7. TGF- β de membrana (mbTGF- β)

Varias citoquinas y factores de crecimiento, como M-CSF, IL-1, TNF- α y TGF- β existen en forma secretada y también pueden permanecer anclados a la membrana celular (166). Al contrario que la forma secretada, la respuesta de las citoquinas/factores de crecimiento que se encuentran anclados a la membrana requiere contacto celular, que puede dar lugar a diferentes respuestas debido a una mayor concentración local del ligando en la sinapsis (167) y a la presencia de interacciones celulares adicionales que pueden modular su respuesta de una manera que la forma secretada no puede imitar. En esa dirección, se ha visto que la expresión de TGF- β de membrana en células Tregs media la función inmunosupresora *in vitro* e *in vivo* a través de la activación de la vía NOTCH1-HES1 en células T CD4⁺. Estas células, cuando pierden mbTGF- β , son capaces de secretar niveles similares de TGF- β 1 soluble, pero éste es incapaz de activar NOTCH1 y las células T CD4⁺ dejan de ser inmunosupresoras (168).

La expresión de mbTGF- β se ha encontrado en MSCs de cordón umbilical (169), de médula ósea (170) y de micro-vesículas derivadas de MSCs tanto de ratón (171) como humanas (172). Sin embargo, no se conoce muy bien la forma en la que TGF- β se ancla a la membrana. Se conocen varias moléculas implicadas, como el heparán sulfato (173), β -Glicano (174), neuropilina-1 (175) y GRP78 (Proteína regulada por glucosa de 78 kDa) (176).

1.2.8. Modulación de la respuesta inmunitaria por mbTGF- β

Las MSCs pueden inhibir las células T a través de mediadores solubles o por contacto célula-célula. Sin embargo, si el mbTGF- β 1 en MSCs desempeña un papel importante en la modulación de la respuesta de las células T casi no se ha abordado aún. En un estudio, se muestra que la expresión del RNA mensajero (mRNA) de mbTGF- β 1 en MSCs se encuentra inducida tras el contacto directo con células T, mientras que esa expresión aparece inhibida cuando las MSCs se mantienen separadas de las células T usando

pocillos especiales durante su cultivo que permiten el intercambio de factores solubles pero no el contacto directo (177). Esto sugiere un papel específico de TGF- β 1 derivado de MSCs en la inhibición de células T dependiente de contacto celular.

El mbTGF- β procedente de vesículas también es diferente del TGF- β soluble. Se ha demostrado que los exosomas que expresan altos niveles de mbTGF- β 1 inducen un programa transcripcional en fibroblastos que es parecido pero no idéntico al que induce el TGF- β 1 soluble (174). Además, en cuerpos apoptóticos, el mbTGF- β 1, pero no la forma soluble, induce la vía de señalización ERK y la producción de IL-10 por los macrófagos (178).

1.3. CD105 (Endoglina)

1.3.1. Estructura y expresión

El CD105 (endoglina) humano es una glicoproteína transmembrana de 180 kDa formada por 633 aminoácidos. Contiene un dominio extracelular largo, un dominio transmembrana hidrofóbico y otro dominio intracelular corto (179,180). El dominio extracelular contiene un tripéptido arginina-glicina-aspartato (RGD). Este tripéptido está ausente en el CD105 de ratón (181). El dominio intracelular contiene varios residuos de serina y treonina, alguno de los cuáles presenta sitios de fosforilación (182). Existen dos isoformas de CD105, larga (L) y corta (S), cuya expresión se ha detectado en células endoteliales y mieloides, aunque la forma larga es la más predominante en estas células. El CD105L contiene 47 aminoácidos en su cola citoplasmática mientras que el CD105S contiene solamente 14 aminoácidos.

Como ya se ha mencionado, CD105 se expresa predominantemente en células endoteliales (183,184) y su promotor se encuentra fuertemente activo en estas células (185). Consecuentemente, se han detectado elevados niveles de expresión de CD105 en las células endoteliales presentes en tejidos donde se encuentra activo el proceso de angiogénesis así como en tejidos inflamados o tumores (183,184,186). Sin embargo, también se ha visto una alta expresión de CD105 en MSCs (187,188) y de manera más

débil en células no endoteliales como precursores de células B, monocitos activados, macrófagos diferenciados, precursores eritroides (189).

1.3.2. Funciones

CD105 es un co-receptor accesorio de TGF- β que se une con gran afinidad a TGF- β 1 y TGF- β 3 mediante su asociación con el receptor TGF β R2 (190). Esto activa la actividad citoplasmática quinasa del receptor TGF β R2 lo que da lugar a la fosforilación del receptor TGF β R1 que interactúa con diferentes moléculas de señalización como la familia de proteínas SMAD (191). Como se citó previamente, existen dos rutas de señalización por TGF β R1 que compiten entre sí. La primera es la fosforilación de SMAD 2/3 inducida por ALK5 (116), que inhibe respuestas celulares a TGF- β y la segunda, la fosforilación de SMAD 1/5 inducida por ALK1, que aumenta dichas respuestas (117). Algunos estudios han sugerido que CD105 solo se requiere para la vía de señalización por ALK1 y no por ALK5 (117,192), mientras que otros estudios muestran que el dominio citoplasmático de CD105 está regulado por la fosforilación de ALK5 (193).

Las dos isoformas de CD105 se comportan como proteínas de unión a TGF- β (190,194). Se ha comprobado, en células endoteliales, que la forma corta (CD105S) es capaz de interactuar tanto con ALK5 como con ALK1, aunque la interacción con ALK5 es mayor que con ALK1. Esto es una diferencia con la forma CD105L, que tiene mayor afinidad por ALK1 (195). Como el dominio extracelular es común para ambas isoformas, la cola citoplasmática parece ser la responsable de estas diferencias.

La unión de TGF- β 1 a CD105 reduce la fosforilación de CD105 (196). La inhibición de la expresión de CD105 aumenta la habilidad de TGF- β 1 de suprimir el crecimiento, la migración y la capacidad de formar tubos capilares de las células endoteliales (197). En monocitos, se ha visto que TGF- β es capaz de inducir la expresión de CD105, al igual que se puede eliminar casi por completo neutralizando TGF- β (198). En ese mismo estudio, se transfectaron monocitos para sobreexpresar las dos isoformas de CD105 y se vió que la inhibición de la proliferación celular que se induce normalmente por TGF- β 1 aparecía

muy disminuida en los monocitos que sobreexpresaban CD105S mientras que desapareció totalmente en los que sobreexpresaban CD105L. En mioblastos también se ha visto que la sobreexpresión de CD105 conlleva una disminución de la respuesta de TGF- β a la inhibición del crecimiento celular (199).

1.3.3. CD105 como marcador de MSCs

1.3.3.1. Expresión

Como se ha citado previamente, se considera que CD105 es una de las moléculas que una célula debe expresar *in vitro* para ser considerada una verdadera MSC (13).

La expresión de CD105 en MSCs se describió por primera vez en un estudio publicado por Barry y colaboradores (200). La identificación de CD105 se llevó a cabo mediante la determinación de la secuencia y la masa de varios péptidos derivados de la proteína por inmunoprecipitación en MSCs humanas procedentes de médula ósea.

Aunque CD105 se considera un marcador importante de MSCs, su expresión es variable dependiendo de su tejido de procedencia. Por ejemplo, varios estudios han demostrado que la expresión de CD105 en MSCs derivadas de tejido adiposo y de médula ósea, es mayor que en MSCs derivadas de cordón umbilical (201,202). Esta expresión también varía cuando las células se encuentran *in vivo* o *in vitro*. Jiang y colaboradores mostraron que las MSCs recién aisladas de tejido adiposo expresaban niveles muy bajos de CD105 (<2%). Sin embargo, la proporción de células CD105⁺ aumentaba rápidamente durante el cultivo *in vitro*, alcanzando en torno al 15% a las 16 horas de su cultivo, sobre un 42% a los 4 días, 70% a los 7 días y alrededor de un 80% a los 10 días de su cultivo *in vitro* (Jiang et al. 2010). Esta inducción de CD105 *in vitro* confirma el resultado que ya se había obtenido en un estudio previo (204). Sin embargo, también se ha visto que la expresión de CD105 se va perdiendo cuando las células se mantienen en cultivos por tiempos muy prolongados (a partir de 7-8 pases) (202).

Además, se sabe que en MSCs derivadas de cordón umbilical, tras la diferenciación osteo, condro y adipogénica se produce una disminución de la expresión de CD105. Por lo que, en este tipo celular, CD105 se podría usar como un marcador de MSCs multipotentes porque su expresión disminuye considerablemente una vez diferenciadas (205).

Finalmente, también se sabe que cuando se asilan MSCs de médula ósea de ratón, las células estromales no multipotentes (CD105⁻) presentes en el cultivo son capaces de inhibir la proliferación de las MSCs CD105⁺ de manera que para poder mantener en cultivo las MSCs multipotentes CD105⁺ durante un periodo prolongado habría que eliminar la fracción CD105⁻. Esta inhibición de las MSCs multipotentes se puede deber a una mayor proliferación por parte de las células CD105⁻ y a la capacidad de estas células de secretar diferentes factores capaces de inhibir el crecimiento de las MSCs (206).

1.3.3.2. Funciones

Se sabe poco del papel que lleva a cabo CD105 en las MSCs. La mayoría de los estudios publicados se centran en su relevancia en los procesos de diferenciación de las MSCs, ya que, como se ha citado anteriormente, CD105 es un co-receptor de TGF- β (190) y TGF- β juega un papel fundamental durante la diferenciación de MSCs.

Hay varios estudios que han demostrado que la subpoblación CD105⁺ presente en la población total de MSCs procedentes de distintos tejidos (médula ósea, tejido adiposo, o líquido sinovial) presenta una mayor capacidad de diferenciación condrogénica que la subpoblación CD105⁻ (207–209). El mecanismo por el cual CD105 es capaz de promover el proceso de condrogénesis en MSCs puede estar relacionado con su función como miembro de la súper-familia de receptores de TGF- β . Como TGF- β es el factor más crucial que dirige los procesos de diferenciación condrogénica, la expresión de CD105 debe estar relacionada con la condrogénesis mediada por TGF- β (Jiang et al. 2010).

Sin embargo durante la diferenciación osteogénica y adipogénica CD105 parece llevar a cabo el efecto contrario. Se ha visto que la fracción CD105⁻ de MSCs derivadas de tejido adiposo es capaz de mejorar la diferenciación osteogénica y adipogénica en relación con

la fracción CD105⁺. Como se sabe que el tratamiento continuado con TGF- β inhibe la osteo y adipogénesis, células con expresión más baja de CD105 y por tanto con menos señalización por TGF- β , podrían diferenciarse más rápidamente hacia osteoblastos y adipocitos (211).

1.4. GARP

1.4.1. Descubrimiento del gen GARP

La proteína GARP (del inglés *Glycoprotein A Repetitions Predominant*) también denominada LRRRC32 (del inglés *Leucine Rich Repeats Containing 32*), es una proteína perteneciente a la súper-familia LRR (Repeticiones Ricas en Leucina). Este gen se describió por primera vez en un estudio llevado a cabo por Ollendorf y colaboradores (212). En dicho estudio, se mostró por primera vez la secuencia del gen *GARP* humano, que se identificó en la región q13-14 del cromosoma 11. Basándose en la homología de la secuencia con GARP humano, la proteína en ratón se encontró en la región E-F del cromosoma 7. Ambas proteínas comparten el 80% de identidad a nivel de aminoácidos. Además, presentan una estructura similar, con solo 2 exones codificantes. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) localizados en regiones no codificantes de GARP, están asociados con alto riesgo de desarrollar varias enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario (asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica o enfermedad de Crohn) y también algunos tipos de cáncer (213).

1.4.2. Expresión

Los primeros estudios describieron expresión de GARP en placenta, pulmón y riñón y poco después también se describió en corazón, hígado, músculo esquelético y páncreas, pero se desconocía que tipo de células expresaban GARP en esos tejidos (Ollendorff et al. 1994). Poco tiempo después se estudió la expresión de GARP en diferentes líneas celulares primarias. GARP se detectó por primera vez en megacariocitos humanos y de ratón (215,216), poco después se encontró su expresión en células Tregs humanas y de ratón (Wang *et al.*, 2008; Takatoku Oida and Weiner, 2010). Más recientemente, se han

detectado niveles de expresión a nivel de mRNA en hMSCs (219) así como expresión de GARP en células endoteliales (220), células hepáticas estrelladas (221), células madre embrionarias y fibroblastos (222).

Curiosamente, la expresión de mRNA de GARP no siempre se correlaciona con la expresión de la proteína. Se ha visto que hay microRNAs, como miR-142-3p, miR-181 y miR-185 que inhiben la expresión de la proteína GARP en células T no reguladoras, que expresan altos niveles de mRNA de GARP (Gauthy, et al. 2013; Q. Zhou et al. 2013). De esta forma se evidencia que la expresión de GARP se encuentra altamente regulada incluso a nivel post-transcripcional.

1.4.3. Estructura

Como se ha citado previamente, GARP pertenece a la súper-familia LRR. Las proteínas de esta familia pueden aparecer unidas a la membrana pero también en forma soluble. LRR se encuentra en moléculas tan diversas como proteoglicanos, moléculas de adhesión, enzimas y receptores asociados a proteínas G. El dominio LRR parece estar involucrado en interacciones proteína-proteína y lleva a cabo un papel importante en numerosos procesos biológicos como el desarrollo embrionario, morfogénesis celular, migración celular y coagulación sanguínea. Estos dominios son esenciales para que la proteína sea capaz de llevar a cabo su actividad específica (Ollendorff et al. 1994).

El gen GARP codifica para una proteína transmembrana con una región extracelular constituida por 20 regiones LRR. Estas 20 regiones se agrupan en dos bloques, separadas por un corto segmento rico en prolina y constituyen aproximadamente el 70% de la proteína. La proteína GARP presenta similitudes estructurales con las proteínas LRR. Residuos específicos encontrados en las regiones amino y carboxi-terminal de moléculas LRR también aparecen en GARP. Estos datos sugieren que GARP también puede estar involucrado en interacciones proteína-proteína en la superficie celular, especialmente en procesos de adhesión (Ollendorff et al. 1994).

1.4.4. GARP y TGF- β

Todas las funciones conocidas de GARP están relacionadas con su capacidad para interactuar con TGF- β latente. De manera muy probable, inmediatamente después de la síntesis de la proteína GARP en el retículo endoplasmático, se forman enlaces disulfuro entre GARP y TGF- β 1 latente. En células Tregs el complejo GARP/TGF- β 1 latente se ancla a la membrana celular debido al dominio transmembrana de GARP. Además, también se ha encontrado una forma soluble de este complejo (225). Esta forma soluble parece ser el resultado de un corte proteolítico de GARP cerca de su dominio transmembrana pero se desconoce cuál es la proteasa implicada en este proceso. El complejo GARP/TGF- β 1 es secretado por las células Tregs, sin embargo, en células HEK 293T transfectadas con GARP no se produce esta secreción, lo que indica que el mecanismo de corte no funciona en todos los tipos celulares y podría estar restringido a células Tregs (226).

1.4.5. Papel de GARP en la activación de mbTGF- β

Se ha comprobado que TGF- β se puede activar mediante el complejo GARP-LAP/ TGF- β a través de integrinas. Para esta activación se requiere que GARP se encuentre unido a la membrana, ya que su forma soluble es incapaz de apoyar esta activación. Como se ha descrito previamente, cuando el TGF- β se encuentra anclado a la membrana, algunas integrinas pueden unirse a los motivos RGD presentes en LAP y provocar la liberación y activación de TGF- β . Las integrinas α V β 6 y α V β 8 son dos de las más estudiadas en los procesos de activación de mbTGF- β . En este proceso, GARP se encarga de mantener el complejo LAP/TGF- β anclado a la membrana y de presentarlo a estas integrinas (Figura 6).

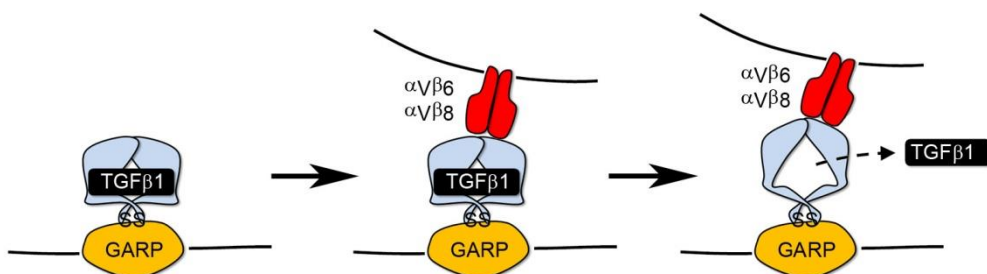


Figura 6: Papel de GARP en la activación de TGF- β : GARP es capaz de unirse al complejo LAP/TGF- β y anclarlo a la membrana celular. De esta forma el complejo GARP/LAP/TGF- β queda accesible para las integrinas que pueden unirse a LAP, provocar un cambio conformacional del mismo y liberar TGF- β activo.

En efecto, en un estudio realizado por Wang y colaboradores se observó que las integrinas $\alpha V\beta 6$ y $\alpha V\beta 8$ eran capaces de inducir la activación de TGF- $\beta 1$ en el complejo GARP/mbTGF- $\beta 1$ de células HEK 293T pero no eran capaces de activarlo en su forma soluble(226). Las células Tregs no expresan el gen que codifica la integrina $\alpha V\beta 6$ pero sí el que expresa la $\alpha V\beta 8$. En varios estudios se ha demostrado que esta integrina es la responsable de la activación del mbTGF- $\beta 1$ en células Tregs tanto de ratón (227) como de humano (104).

Por tanto, se ha propuesto que GARP es capaz de regular la biodisponibilidad y activación de TGF- β en la superficie celular mediante 2 mecanismos (226):

1. Inhibiendo la secreción de TGF- β , y de esta forma, impidiendo su unión a la matriz extracelular.
2. Proporcionando una plataforma para la presentación de TGF- β latente a las integrinas necesarias para que pueda tener lugar la activación de mbTGF- β .

1.4.6. Funciones de GARP

El papel que lleva a cabo GARP en los diferentes tipos celulares en los que se ha detectado su expresión es poco conocido. TGF- β es capaz de inducir la generación de células Tregs (228). Como se ha dicho previamente, GARP se expresa en Tregs y esta expresión se correlaciona con la actividad supresora que estas células son capaces de llevar a cabo. El silenciamiento de GARP en Tregs es capaz de dañar significativamente esta actividad (Wang et al. 2008). GARP también es capaz de convertir células T respondedoras en células Tregs (Foxp3⁺) cuando se produce la activación de ambos tipos celulares por medio del TCR (Receptor de linfocitos T)(Wang et al. 2008). Las células Tregs que expresan el complejo GARP/LAP/TGF- β también son capaces de inducir la diferenciación de las células Th17 (230). Recientemente se ha demostrado que también

las plaquetas expresan GARP en sumembrana siendo esta molécula esencial para la expresión de TGF- β latente (GARPLAP/TGF- β) (228). Sobre el papel que juega GARP en plaquetas hay un estudio realizado en pez cebra donde se ha visto que GARP juega un papel fundamental en los procesos de coagulación (231), sin embargo, en otro estudio realizado en ratones no se pudo detectar ninguna diferencia en estos procesos entre ratones con plaquetas GARP⁺ y GARP⁻ (232).

También se conoce alguna función de GARP en células tumorales, en un estudio reciente se ha visto que GARP se expresa en varios tipos de tumores humanos y que la intensidad de su expresión se correlaciona con una peor prognosis. En este estudio también se ha visto que al transfectar células tumorales con GARP, estas células son capaces de producir tumores de mayor tamaño cuando son trasplantadas en ratones. Como en estos tumores se observa un aumento en la fosforilación de Smad 2/3, los autores sugieren que el efecto de GARP sobre el crecimiento tumoral puede ser debido a la producción de más TGF- β 1 activo por parte de las células transfectadas (233).

Finalmente, GARP también ha sido involucrado en la proliferación de algunos tipos celulares. Por ejemplo, algunos estudios han indicado un papel de GARP en la proliferación de las células T (Probst-Kepper *et al.*, 2009). En este estudio se ha demostrado que la expresión ectópica de GARP en células T colaboradoras reduce su capacidad de proliferación. En otro estudio se ha visto que al silenciar la expresión de GARP en células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ se reduce su capacidad de proliferación. Además, en ese mismo estudio se analizó el papel de GARP en la proliferación de líneas celulares que normalmente no expresan GARP y se vio que al transfectar células HeLa con un vector que codifica GARP, los clones que expresaban cantidades menores de GARP en su membrana proliferaban más despacio que aquellos que expresaban cantidades más elevadas. Los cambios en el crecimiento celular de los clones fueron reflejo de una desaceleración de la progresión de su ciclo celular y de la acumulación de proteínas inhibitoras del ciclo. Además, silenciando GARP con RNAs interferentes en los clones que presentaban una mayor expresión de esta proteína, se consiguió reducir de forma

significativa la expresión de GARP así como la capacidad de proliferar de dichos clones. Estas observaciones confirman que una disminución de la expresión de GARP disminuye la proliferación celular (224).

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

2. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

Las células mesenquimales estromales (MSCs) tienen importantes funciones inmunomoduladoras y son capaces de secretar moléculas bioactivas que intervienen en procesos de reparación tisular. Estas funciones, hacen de estas células una herramienta prometedora para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Sin embargo, los resultados en cuanto a su actividad terapéutica han mostrado una alta variabilidad tanto en modelos animales como en ensayos clínicos. Esta elevada variabilidad refleja las diferencias entre las MSCs utilizadas en los diferentes estudios tanto a nivel de su origen, del método de cultivo/aislamiento así como del número de pases. Es por tanto necesaria una mejor caracterización de las preparaciones de MSCs así como una mejor comprensión de la biología de las mismas para mejorar su eficacia terapéutica.

Las MSCs expresan TGF- β y también son capaces de responder a TGF- β activo, una molécula fundamental en muchos procesos involucrados en inmunomodulación, homeostasis y regeneración tisular. Por lo tanto, nuestra idea de partida es que una comprensión más en profundidad del papel de TGF- β en las MSCs es fundamental a la hora de diseñar terapias utilizando MSCs. Partiendo de estudios previos de nuestro grupo en los que se observó expresión heterogénea de CD105 en MSCs de ratón, así como datos en la literatura que indicaban que GARP podría estar expresándose en MSCs humanas y análisis de expresión de mRNA en nuestro grupo donde se confirmó dicha expresión en MSCs de ratón, propusimos las siguientes hipótesis:

1. CD105 identifica dos subpoblaciones de MSCs con diferente capacidad de diferenciación e inmunomodulación.
2. Las MSCs de ratón y humanas expresan GARP/TGF- β y su expresión tiene un papel relevante en la biología de las MSCs.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis es entender las implicaciones de CD105 y GARP en la biología y capacidad terapéutica de las MSCs, más específicamente:

1. Analizar la expresión de CD105 en MSCs derivadas de tejido adiposo de ratón (mASCs) y caracterizar las subpoblaciones CD105⁻ y CD105⁺, con respecto a:

1.1. Propiedades troncales de estas células.

1.2. Capacidad inmunomoduladora (Células T y macrófagos).

2. Comprender el papel de GARP en la biología de las MSCs:

2.1. Comprobar los niveles de expresión de GARP en MSCs de ratón y humanas.

2.2. Estudiar el impacto de GARP en la regulación de la secreción y activación de TGF- β por parte de las ASCs de ratón y humanas (hASCs).

2.3. Estudiar el papel de GARP sobre la función inmunomoduladora de las mASCs *in vitro*.

3. Estudiar en profundidad las implicaciones de GARP sobre la regulación de la proliferación de las MSCs:

3.1. Efecto del silenciamiento de GARP sobre la capacidad de proliferación y supervivencia de las MSCs.

3.2 Efecto de la sobreexpresión de GARP sobre dichas capacidades.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Animales

Se utilizaron machos de ratones Balb/c (6-10 semanas) y C57Bl/6 (6-8 semanas) (Charles River, Barcelona, España) para la extracción de células mesenquimales estromales derivadas de tejido adiposo (mASCs) o de médula ósea (mBM-MSCs) y para la generación de suspensiones celulares de esplenocitos. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las pautas institucionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio en investigación y con el consentimiento del comité ético local del Hospital Virgen de la Macarena en Sevilla.

4.2. Líneas celulares y medios de cultivo

4.2.1 Aislamiento y cultivo de MSCs de ratón

- MSCs derivadas de tejido adiposo (mASCs): La grasa fue extraída en esterilidad, cortada en pequeños trozos, resuspendida en 2,5 ml de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen) con 2 mg/ml de colagenasa tipo I (Sigma Aldrich) por gramo de tejido e incubada a 37°C durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos. La suspensión se lavó 2 veces con HBSS y se filtró con filtros celulares de 100 µm primero y 40 µm después. Las células se resuspendieron en medio MesenCult (Stem Cell) con un 20% de Suplementos estimuladores de células mesenquimales estromales de ratón (Stem Cell) y 100 unidades de penicilina/estreptomicina (GIBCO) por cada mililitro de medio de cultivo. Finalmente, estas células se contaron, se plaquearon a una densidad de 15-30.000 células/cm² y se cultivaron en condiciones de hipoxia (5% O₂ y 5% CO₂). A las 24 horas se eliminaron las células no adheridas. En los pases siguientes las células se plaquearon a una densidad de 10.000 células/cm² en medio MesenCult completo.

- MSCs derivadas de médula ósea (mBM-MSCs): Las células de médula ósea se extrajeron mediante la inyección de medio Mesencult en el fémur y la tibia, previamente extraídas en esterilidad, de ambas patas traseras del ratón. Tras lavar dos veces y filtrar por filtro de 40 µm, se plaquearon 1,5 x 10⁶ células/cm² en frascos de cultivo celular. Las células se

cultivaron en medio Mesencult con un 20% de Suplementos y 100 Unidades de penicilina/estreptomicina. A las 24 horas se eliminaron las células no adheridas. Las mBM-MSCs se utilizaron a pase > 5.

4.2.2 Macrófagos de ratón

Los macrófagos se obtuvieron llevando a cabo el mismo procedimiento que se usó para purificar MSCs de médula ósea. Tras el conteo de las células, se plaquearon $0,4 \times 10^6$ células en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con 2mM L-glutamina, 100 Unidades/ml de penicilina estreptomicina y 20% de suero inactivado por calor. En dicho medio se añadieron 20 ng/ml de M-CSF (Peprotech) y se dejaron las células en cultivo durante 5 -7 días para permitir su diferenciación a macrófagos.

4.2.3 Cultivo de MSCs humanas

- MSCs derivadas de tejido adiposo (hASCs): Las hASCs se obtuvieron del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Centro de investigación Biomédica, Granada). Para ver la inducción de GARP en hASCs recién aisladas, se extrajeron hASCs de tejido graso humano obtenido de donantes sanos, que también fue proporcionado por el Biobanco. El procesamiento de la grasa se llevó a cabo del mismo modo con el que se procesó la grasa procedente de ratón.

- MSCs derivadas de médulas ósea (hBM-MSCs): Las hBM-MSCs fueron cedidas por Jose M. Moraleda y Ana M^a García Hernández (Unidad de terapia celular y Trasplante Hematopoyético, Servicio de Hematología, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia).

- MSCs derivadas de gelatina de Wharton (WJ-MSCs): Las células WJ-MSCs fueron cedidas por José Mariano Ruíz de Almodovar (Centro de Investigaciones Biomédicas, Granada).

- MSCs derivadas de colon (colon-MSCs): Las muestras de colon de donantes sanos se obtuvieron del Departamento de Cirugía del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada). Para el aislamiento de las MSCs, las muestras de colon se sometieron a dos lavados con HBSS donde se habían añadido 2,5 µg/ml de anfotericina B (Sigma Aldrich) y

200 U/ml de penicilina/estreptomicina (GIBCO). Tras cortar la muestra en pequeños trozos, se resuspendió en HBSS con 2mg/ml de colagenasa IV y 0,5 mg/ml de DNAsa I (ambas de Sigma Aldrich) por cada gramo de tejido y se incubó durante 45 minutos a 37°C, agitando cada 5 minutos. Los pasos posteriores se llevaron a cabo de forma idéntica a como se realizó el procesamiento del tejido graso.

Para el cultivo de todas las MSCs humanas, se utilizó medio DMEM advanced (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Biowest), Glutamax (GIBCO, Thermo Fisher Scientific) y 100 Unidades/ml de penicilina/estreptomicina. Las células se cultivaron en condiciones de normoxia (21% O₂ y 5% CO₂). Se realizaron pases cada 2-3 días, según su confluencia, usando TrypLE durante 5 minutos a 37°C para la disociación celular, tras un lavado previo con PBS.

4.2.4 Línea celular HEK-293T

(ATCC® CRL-11268) Línea celular empaquetadora, utilizada para la producción de vectores lentivirales. Las células HEK-293T se cultivaron en medio DMEM High Glucose (Biowest) suplementado con 10% de FBS a 37°C y 10% CO₂. Se realizaron pases cada 2-3 días, según su confluencia, usando TrypLE 0,4X durante 5 minutos a 37°C para la disociación celular, tras lavar con PBS.

4.3. Plásmidos y vectores lentivirales

- Vectores lentivirales para silenciamiento de GARP de ratón: Se utilizaron dos plásmidos con dos shRNAs (*small hairpin RNAs*) específicos para GARP de ratón (MISSION shRNA, RefSeq: SHCLND-NM_001113379, Sigma Aldrich). En el texto se citarán como LV#3 y LV#6.
- Vectores lentivirales para silenciamiento de GARP humano: Se utilizaron dos plásmidos con dos shRNAs específicos para GARP humano (RefSeq: SHCLND-NM_005512, Sigma Aldrich): En el texto se citarán como LV#18 y LV#19.

- Vector lentiviral Control (MISSION pLKO.1-puro nonmammalian shRNA control plasmid, Sigma Aldrich): Como control, se utilizó un plásmido que codifica shRNAs que no tienen como diana ningún gen conocido de ratón o de humano pero que activan la vía de interferencia del ARN. En el texto se citará como LV-CTRL.
- Vector lentiviral para la sobreexpresión de GARP: el cDNA (DNA complementario) con el codón optimizado de GARP humano fue sintetizado por Genscript y se subclonó en el vector lentiviral CEWP (236) bajo el promotor CMV (citomegalovirus), escindiendo el GFP e introduciendo en su lugar el cDNA de GARP. En el texto se citará como LV-GARP.
- Vector lentiviral CEWP (236): Vector lentiviral expresando GFP (Proteína Verde Fluorescente) bajo el promotor CMV. En el texto se citará como LV-CEWP.
- Vector lentiviral dsRED (237): Vector lentiviral expresando RFP (Proteína Roja Fluorescente) derivada de *Dicosoma* sp., bajo el promotor EF1 α . En el texto se citará como LV-dsRED.
- Plásmidos de empaquetamiento y envuelta: Los plásmidos usados para las proteínas de empaquetamiento y envuelta fueron, pCMV Δ R8.91 y pMD.G, respectivamente. El plásmido de empaquetamiento codifica para las proteínas gag, pol, tat y rev, mientras que el de la envuelta codifica para la proteína VSVg.

4.4. Producción de vectores lentivirales

Los vectores fueron producidos mediante un sistema de co-transfección de células HEK-293T con tres plásmidos: 1) Plásmido vector (el requerido según la ocasión), 2) Plásmido de empaquetamiento pCMV Δ R8.91 y 3) Plásmido de la envuelta pMD.G, en proporción 3:2:1 respectivamente. Las células HEK-293T se plaquearon 24h antes de la transfección en placas Petri de 10 cm de diámetro procurando poner el número de células necesario para que en el momento de la transfección se encontraran entre un 80-90% de confluencia. Los 3 plásmidos con los que se realiza la transfección se resuspendieron en medio DMEM sin suero y se mezclaron con el reactivo de transfección LipoD293™

(SignaGen Laboratories). A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes que contenían las partículas virales y se concentraron (25-35X) utilizando filtros concentradores de 100 kD (Amicon Ultra-15, Merck).

4.5. Transducción de MSCs

Para el silenciamiento de GARP, las MSCs de ratón y humanas fueron transducidas utilizando $0,7 \times 10^6$ células y mezclándolas con los virus concentrados (LV-CTRL, LV#3, LV#6, LV#18 o LV#19 según corresponda). Estas células, se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron a placas de 6 pocillos y se mantuvieron a 37°C durante 5 horas. Posteriormente, las células se lavaron y se volvieron a plaquear en frascos T75. Las células se mantuvieron en condiciones de hipoxia (en el caso de células de ratón) o normoxia (en el caso de células humanas). La expresión de GARP se analizó a los 3 y 5 días por citometría de flujo y PCR cuantitativa (qPCR), respectivamente.

Para la sobreexpresión de GARP, se transdujeron hASCs de igual forma que para el silenciamiento utilizando virus concentrados de LV-GARP, pero a las 24 horas de la transducción se volvió a realizar el mismo procedimiento, de manera que las células se sometieron a una doble transducción. A los 4 días se analizó la expresión de GARP por citometría de flujo. Estas células se citan en el texto como hASCs GARP⁺⁺.

La transducción de hASCs con los vectores controles (LV-CEWP y LV-dsRED) se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento que para el silenciamiento de GARP.

Para recuperar la expresión de GARP en hASCs con GARP silenciado, citadas en el texto como LV#19+LV-GARP, se mezclaron 0.6×10^6 ASCs con virus concentrados de LV#19 y LV-GARP durante 5 horas. Posteriormente el medio se reemplazó por medio fresco. Al día siguiente, las células se volvieron a transducir con virus concentrados de LV-GARP durante 5 horas y después se expandieron a frascos T75 y se mantuvieron en condiciones de normoxia a 37°C. La expresión de GARP se analizó por citometría de flujo 4 días después de la transducción.

4.6. Titulación de vectores

El número de copias por célula de los diferentes vectores empleados se determinó por qPCR con el kit QuantiTect SYBRGreen PCR (Qiagen) utilizando el termociclador a tiempo real Stratagene MX30005Pro (Agilent Technologies).

Se utilizaron 0,06 µg de DNA genómico (=10.000 células) y DNA plasmídico (de 10^2 a 10^6 copias) para la curva estándar como se había descrito previamente (238). Se utilizaron los siguientes primers: LV-backbone FW: 5'-GACGGTACAGGCCAGACAA-3', LV-backbone RV: 5'- TGGTGCAAATGAGTTTTCCA-3'.

4.7. Citometría de flujo

Las mASCs recién aisladas o procedentes de cultivos se incubaron con 7-aminoactinomicina D (7AAD)(Sigma Aldrich) y 2.4G2 (eBioscience) y después se tiñeron con anticuerpos específicos para CD11b, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD49d, CD49f, CD61, CD73, CD105, CD140a, CD146, sca-1, MHC de clase I y II (todos de eBioscience), anti-TGFβR1 (ALK5) o anti-TGFβR2 (ambos de R&D Systems). Se utilizaron los correspondientes isotipos para determinar la tinción de fondo.

Para la tinción de LAP/TGF-β1, ASCs (de ratón o humanas) se plaquearon a una densidad de 5.000 células/cm² y tras 24-48 horas estas células se levantaron utilizando PBS con 2mM de EDTA. Las células se incubaron con 7AAD y 2.4G2 (en el caso de mASCs). Posteriormente se añadieron los anticuerpos anti-LAP/TGF-β1 de ratón o humano (ambos de Biolegend) seguido de los anticuerpos secundarios de ratón IgG-APC (Jackson ImmunoResearch) o IgG-Alexa488 (life technologies), respectivamente.

Para analizar la expresión de GARP, mASCs y hMSCs de diferentes tejidos se levantaron utilizando TrypLE y se tiñeron con los anticuerpos de ratón o humano anti-GARP (GARP-PE y GARP-eFluor660 respectivamente, ambos de eBioscience). Para la tinción intracelular de GARP, se fijaron y permeabilizaron mASCs y las diferentes líneas de MSCs humanas y se tiñeron para GARP siguiendo las instrucciones del kit BD Cytofix/Cytoperm (BD

Biosciences). Se utilizó el isotipo IgG2a kappa-eFluor660 (eBioscience) para determinar el fondo.

Las células se adquirieron utilizando el citómetro de flujo FACs Canto II y se analizaron utilizando el software FACS Diva (BD Biosciences).

Las hASCs GARP⁺⁺ se separaron de las hASCs sin transducir (NT) utilizando el citómetro de flujo FACSAria II. Estas células se citan en el texto como GARP⁺⁺(S) y NT(S) respectivamente.

4.8. Análisis de proliferación de MSCs

La proliferación celular se analizó de 3 formas diferentes:

1) Para el análisis de la proliferación de las mASC_{tot}, CD105⁺ y CD105⁻ se plaquearon 2.500 células/cm² de cada tipo celular en frascos de cultivo T25. Cuando las células alcanzaron un 70-80%, se levantaron, se contaron y se volvieron a plaquear a la misma densidad durante 10 pases. El mismo procedimiento se llevó a cabo para estudiar la proliferación a largo tiempo de las células que sobreexpresan GARP. Para ello se plaquearon 5.000 células/cm² de hASCs GARP⁺⁺, LV-GFP y LV-dsRED y una vez a la semana se analizó el número de células por citometría de flujo o mediante el conteo usando el colorante *trypan blue*.

2) También se estudió la proliferación celular utilizando el reactivo CellTiter-Blue siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega). En resumen, se añadieron 1.000 células/pocillo de mASCs sin transducir (NT), LV-CTRL, LV#3 y LV#6 a placas de 96 pocillos y se cultivaron en condiciones de hipoxia a 37°C. En los días 1, 3 y 7 se añadió el reactivo CellTiter-Blue a los pocillos durante las últimas 4 horas de cultivo y se midió la fluorescencia a 560 nm en un sistema Glomax multidetection (Promega).

3) La proliferación celular también se analizó utilizando el sistema de análisis en tiempo real xCelligence (Roche Applied Science). Para ello se añadieron, 4 días después de la transducción, 1.000 células/pocillo de mASCs NT, LV-CTRL, LV#3 o LV#6; de hMSCs NT,

CTRL, LV#18 o LV#19; o de hASCs LV-GARP o LV#19+GARP a placas de 16 pocillos (E-plates) como se había descrito previamente (239). La placa se situó en el xCelligence dentro del incubador en condiciones de normoxia para la grabación continua de impedancia, reflejada por el índice celular. En algunos experimentos realizados con MSCs de ratón, se añadieron a los pocillos, a día 1 y 3, 2,5 mg/ml de un anticuerpo neutralizante de TGF- β 1/2/3 (R&D Systems) o 10 μ M del inhibidor de TGF- β SB431542 (Sigma). En algunos experimentos realizados con MSCs humanas, se añadieron a las células, al día siguiente de la transducción y antes de añadirlas a las placas de xCelligence, 10 μ M de SB431543, 1 mM de N-acetilcisteína (NAC), 0,5 mM de apocinina (Sigma Aldrich) o 25 μ M de mitoTEMPO (Sigma Aldrich). A los 4 días de la transducción, las células se añadieron a las placas de xCelligence. A día 1 y 3, se cambió el medio por medio fresco conteniendo o no los diferentes inhibidores.

4.9. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de las mASCs *in vitro*

Para estudiar la actividad inmunosupresora de las mASCs, se trataron mASCs (ASC_{tot}, CD105⁺, CD105⁻, NT, LV-CTRL o LV#6) con mitomicina C (50 μ g/ml, Sigma Aldrich) durante 20 minutos a 37°C, se plaquearon a diferentes concentraciones en placas de 96 pocillos de fondo plano y se permitió que las células se adhirieran al fondo durante 3-4 horas. Paralelamente, se marcaron esplenocitos con 5 μ M de CFSE (Carboxifluoriscina succinimidil ester, Sigma Aldrich) y se añadieron sobre los cultivos de ASCs. Sobre esos cultivos se añadió anti-CD3 (1 μ g/ml, BD Biosciences) como un estímulo mitogénico para las células T. Las células se recogieron a día 3, se tiñeron con un anticuerpo anti-CD4 y se analizó en el citómetro de flujo (FACS Canto II, BD Biosciences). La división celular se analizó usando el software FlowJo (Tree Star Inc).

Los sobrenadantes de los cultivos de mASC (NT, LV-CTRL, LV#3 y LV#6) se recogieron y se midió el contenido de NO₂ utilizando el ensayo de Griess. Brevemente, se añadieron 100 μ l del reactivo de Griess (una mezcla 1/1 de p-aminobenzeno-sulfonamida al 1% en H₃PO₄ al 5% y de dihidrocloruro de naftiletilendiamina al 0,1% en agua destilada) sobre 100 μ l de sobrenadante de cultivos y estándar (NaNO₂) en placas de 96 pocillos. Las placas se

incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 550 nm.

En algunos cocultivos de mASC con esplenocitos se añadieron 50, 100 y 500 nM de Compuesto E (*Compound E*, Enzo Life Sciences). Para analizar la expresión de HES1 en células T respondedoras, se establecieron cocultivos de mASCs y esplenocitos como se ha explicado previamente. Después de 1 día de estimulación, se recogieron los esplenocitos y se analizó la expresión de HES1 por RTqPCR.

Para estudiar la capacidad de las mASCs para inhibir la función de las células NK (*Natural Killer*), se purificaron estas células de bazo de ratón utilizando un kit específico de purificación (NK cell isolation kit II, Miltenyi Biotech) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se añadieron 60.000 células NK sobre 60.000 células mASCs (NT, LV-CTRL, LV#3 o LV#6) tratadas con mitomicina C en placas de 24 pocillos, en presencia o ausencia de 100 ng/ml de IL-15 recombinante (Peprotech). Las células no adherentes de estos cocultivos se recogieron, se tiñeron para CD49b y NKG2D (ambos de eBioscience) y se analizaron por citometría de flujo.

4.10. Extracción de RNA y PCR cuantitativa de transcripción inversa (RTqPCR)

El RNA total se aisló utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), mediante separación por fases con cloroformo y posterior precipitación con isopropanol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación del cDNA se utilizó el kit *QuantiTect Reverse Transcription* (Qiagen). La RTqPCR se llevó a cabo en el termociclador a tiempo real Stratagene Mx3005Pro (Agilent Technologies) usando el kit *QuantiTect SYBRGreen PCR* (Qiagen). Los primers utilizados se pueden ver en la tabla inferior.

Primer	Secuencia Sentido	Secuencia Anti-sentido
CD105L	5'-GCACTCTGGTACATCTATTCTCACACACGTGG-3'	5'-GGGCACTACGCCATGCTGCTGGTGG-3'
CD105S	5'-TGAGTATCCCAAGCCTCCACCCCAT-3'	5'-CTGAGGGGCGTGGGTGAAGGTCAG-3'
β -glicano	5'-AGCTTCACCGTTCTGTCTGG-3'	5'-AACTGGACCACAGAACCCCTC-3'
ALK1	5'-GGCCTTTTGATGCTGTGCG-3'	5'-ATGACCCCTGGCAGAATG-3'
ALK2	5'-TTGCTCTCCCCTCCCCTA-3'	5'-AGCACTGCTGGCCTTCAC-3'
ALK5	5'-TGTGCACCATCTTCAAAAACA-3'	5'-ACCAAGGCCAGTGACTG-3'
MMP-14	5'-GTGCCCTATGCCTACATCCG-3'	5'-CAGCCACCAAGAAGATGTCA-3'
ALP	5'-TGTCATCATGTTCTGGGAG-3'	5'-ACACAAGTAGGCAGTGGCAG-3'
Osteocalcin	5'-CTGACCCTGGCTGCGCTCTG-3'	5'-GGCTGGGGACTGAGGCTCCA-3'
PPAR- γ	5'-AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3'	5'-TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3'
LPL	5'-TCCACCTTtagggTACAGC-3'	5'-AATGTCAACATGCCCTACTG-3'
SOX-9	5'-AAGACTCTGGGCAAGCTCTG-3'	5'-AGATCAACTTTGCCAGCTTG-3'
Nanog	5'-TTGCCTAGTTCTGAGGAAGC-3'	5'-AACACAGTCCGCATCTTCTG-3'
iNOS	5'-GTTCTCAGCCCAACAATAAGA-3'	5'-GTGGACGGGTCGATGTAC-3'
IL-6	5'-TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC-3'	5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
IL-11	5'-TCCTTCCCTAAAGACTCTGG-3'	5'-TTCAGTCCCAGTCACAGTC-3'
β -actin	5'-AATCGTGCCTGACATCAAAG-3'	5'-ATGCCACAGGATTCATACC-3'
GARP	5'-ACCAGATCCTGCTACTCTCG-3'	5'-ACGAAGCGCTGTATAGAAGC-3'
TGF- β 1	5'-TGCCTTGCAGAGATTAATA-3'	5'-AGCCCTGT ATTCGCTCCTC-3'
cnn-1	5'-AC AAGAGCGGAGATTTGAGC-3'	5'-TGAGTGTGTCG CAGTGTCC-3'
HES1	5'-CGGCATTCCAAGCTAGAGAAGG-3'	5'-GGTAGGTCATGGCGTTGATCTG-3'
hGARP	5'-ACAACACCAAGACAAAGTGC-3'	5'-ACGAAGTGCTGTGTAGAAGC-3'
hIL-11	5'-GACCTACTGTCTACTGCG-3'	5'-AGTCTTcAGCAGCAGCAGTC-3'
hGAPDH	5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'	5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'

4.11. Purificación y estimulación de mASCs CD105⁻ y CD105⁺

Para la purificación de mASCs CD105⁻ y CD105⁺, se marcaron mASCs (pase 2-4) con anticuerpos anti-CD105-PE (eBioscience) y seguidamente se añadieron microesferas anti-PE siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech). Estas células se separaron utilizando un separador celular AUTOMACSpro (Miltenyi Biotech). Las poblaciones celulares obtenidas presentaron más de un 90% de pureza.

Para la estimulación con TGF- β 1, se cultivaron células durante 24 horas en medio Mesencult con un 1% de suplementos y posteriormente se estimularon con 10 ng/ml de TGF- β 1 recombinante humano (Peprotech) durante diferentes periodos de tiempo.

Las mASCs totales (ASC_{tot}) CD105⁺ y CD105⁻ se estimularon con 10 ng/ml de INF- γ y TNF- α (Peprotech) durante 12 y 24 horas para extracción de RNA y durante 24 horas para citometría de flujo. La confluencia celular se cuantificó utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para inhibir metaloproteinasas de matriz (MMPs) se añadieron 25 μ M de GM6001 (Millipore).

4.12. Ensayo de capacidad de formación de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)

El ensayo de CFU-F se llevó a cabo como se había descrito previamente (210). Brevemente, se plaquearon 2.000 mASCs (ASC_{tot}, CD105⁺ o CD105⁻) en placas de Petri de 10 cm y se cultivaron durante 14 días en medio MesenCult completo. La mitad del medio se reemplazó por medio fresco cada 3-4 días. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se fijaron con 3,7% de paraformaldehído (15 minutos a temperatura ambiente) y se tiñeron con 1% de cristal violeta. Se contaron las colonias mayores de 2 mm.

4.13. Diferenciación de MSCs

Para estudiar la capacidad de diferenciación de las MSCs se plaquearon ASC_{tot}, CD105⁺ o CD105⁻ (pase 3-5) a una densidad de 20.000 células/cm² en pocillos de 6 para adipogénesis, de 10.000 células/cm² para osteogénesis o 0,5-1 x 10⁶ células/tubo de 15 ml para condrogénesis. La diferenciación fue inducida usando kits específicos de diferenciación adipogénica, osteogénica o condrogénica (BulletKits, LONZA) siguiendo las instrucciones del fabricante. En paralelo, se mantuvieron células en cultivo con medio MesenCult como controles de diferenciación espontánea.

Los adipocitos se visualizaron a los 14 días utilizando OilRED (Sigma Aldrich). Brevemente, se fijaron las células usando paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron dos veces con PBS. Después las células se pre-incubaron

con propanol al 60% en agua destilada y seguidamente, se tiñeron con OilRED al 0,3% en propanol (60%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la cuantificación, las células se lavaron con PBS, se dejaron secar al aire y se extrajo el OilRED con isopropanol. Se cuantificó midiendo la absorbancia a 450 nm.

Para la osteogénesis, las células se tiñeron con Alizarin RED (Sigma Aldrich) a día 16 de la diferenciación. El área teñida se cuantificó usando el software ImageJ y se representa como el porcentaje del área total.

Para la condrogénesis, los pellets de condrocitos se fijaron con paraformaldehído al 4%, se incrustaron en parafina y se tiñeron secciones (5µm) con Alcian blue (pH 1).

4.14. Co-cultivo de macrófagos

Se plaquearon ASC_{tot}, CD105⁺ o CD105⁻ en placas de 24 pocillos (40.000 células/pocillo) con macrófagos (0,5 x 10⁶ células/pocillo) y se cultivaron durante 48 horas en normoxia. En paralelo, se cultivaron mASCs y macrófagos por separado para usarlos como controles. Las células se cultivaron durante otras 24 horas con o sin 1 µg/ml de LPS (Sigma Aldrich). Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se congelaron a -20°C para la posterior cuantificación de IL-10 y IL-12 por ELISA.

4.15. Medida de la producción de TGF-β1 por las ASCs.

Para medir TGF-β1, se plaquearon 20.000 células/cm² de ASC_{tot}, CD105⁺ o CD105⁻, LV-CTRL, LV#3 o LV#6 en el caso de células de ratón, o de NT, LV-CTRL, LV#18 o LV#19 en el caso de ASCs humanas. Estas células se mantuvieron en cultivo durante 48 horas y se recogieron los sobrenadantes de las mismas. Posteriormente se analizaron los niveles de TGF-β1 utilizando un kit de ELISA específico (TGF-β1 Ready-SET-go, eBioscience) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Algunas de las muestras fueron tratadas con 1M de HCl y neutralizadas con 1M de NaOH para activar el TGF-β1. En paralelo, se añadió MesenCult o DMEM advanced a pocillos vacíos y se recogieron los sobrenadantes para medir el fondo. Los valores representados se obtuvieron sustrayendo los niveles de TGF-

β 1 obtenidos en el medio MesenCult o DMEM, de los sobrenadantes procedentes de los cultivos celulares.

4.16. Medida de la producción de citoquinas y Prostaglandina E2 (PGE₂) por las mASCs.

Se realizó un cultivo de ASC_{tot}, CD105⁺ o CD105⁻ (20.000 células/cm²) con o sin IFN- γ y TNF- α y tras 24 y 48 horas se recogieron los sobrenadantes. El contenido en citoquinas y los niveles de PGE₂ se analizaron usando los kits de ELISA (Ready-SET-go) para IL10, IL-12 (eBioscience) o un kit de ELISA específico para PGE₂ (Cayman Chemicals), siguiendo las instrucciones del fabricante en todos los casos.

4.17. Western Blot

Para llevar a cabo el Western Blot, se lisaron células en RIPA buffer con inhibidores de proteasas (ambos de Sigma Aldrich) a una concentración de 1 x 10⁶ células/100 ml de buffer. Los lisados (20 mg/muestra) se sometieron a electroforesis en geles de Dodecilsulfato sódico (del inglés SDS)- Poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con 5% de leche desnatada y se marcaron con anti-LRRC32 (Plato-1, ENZO Life Sciences) a una dilución 1:500 y se dejaron incubar a 4°C durante toda la noche. Seguidamente, se incubaron una hora con un anticuerpo anti-ratón IgG-IRDye680 a dilución 1:20.000 (LI-COR Biosciences). Las proteínas se detectaron utilizando un sistema de escaneado de imagen Odyssey (LI-COR Biosciences).

4.18. Microscopia confocal

Para la tinción de LAP/GARP, se levantaron mASCs con EDTA como se ha descrito arriba y se tiñeron con GARP-PE (eBioscience) y LAP/TGF- β 1 purificado (TW7-16B4) seguido de la tinción con un anticuerpo frente a ratón IgG-Alexa 488 (Molecular Probes).

Para la tinción de phospho-Smad 2/3, se plaquearon 5.000 células/pocillo de mASCs NT, LV-CTRL, LV#3 o LV#6 en cámaras de 8 pocillos Lab-Tek II (Nalgene, Thermo Fisher Scientific) y se cultivaron en medio MesenCult con 0,2% de FBS durante dos días. Seguidamente, las células se tiñeron para phospho-Smad 2/3 (anti-ratón/humano

phospho-Smad2 [Ser465/467]/ Smad3 [Ser 423/425], Cell Signaling Technologies) seguido por un anticuerpo anti-conejo Alexa555 (Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los portaobjetos se montaron usando el reactivo Slowfade Gold antifade que contiene DAPI (Molecular Probes). Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss). El grado de co-localización (coeficiente de superposición según Mander) se calculó utilizando el software ZEN 2010.

4.19. Tinción con Anexina V

Para analizar la apoptosis se plaquearon 50.000 células/pocillo de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18, LV#19, LV-GARP, LV#19+GARP o LV-CEWP en placas de 12 pocillos, 4 días después de la transducción. Al día siguiente, se trataron las células con 100, 500 o 1.000 ng/ml de tricostatina A (TSA) para inducir apoptosis. Se dejaron células de cada sin tratar para usar como controles. La apoptosis se analizó utilizando un kit específico de detección de Anexina V (PE Annexin V Apoptosis kit I, BD Biosciences) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La frecuencia de células Anexina V positivas fue analizada por citometría de flujo.

4.20. Perfil de expresión génica y análisis de datos

Para llevar a cabo el perfil de expresión génica de las hASCs en ausencia de GARP, se plaquearon 200.000 células NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 en frascos T25, 4 días después de la transducción. A los 2 días de plaquearlas, se levantaron y se mezclaron con RNAlater® (Sigma Aldrich). La purificación y el control de calidad del RNA así como los experimentos de microarray se llevaron a cabo por la Unidad de Genómica y Genotipado de GENYO. Para analizar la expresión de más de 47.000 genes se amplificó el RNA total (500 ng) de 3 réplicas biológicas independientes (NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19) utilizando el kit Illumina TotalPrep RNA Amplification (Ambion), posteriormente, se llevó a cabo la transcripción inversa a la vez que se marcaron las muestras con biotina siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se hibridó durante toda la noche con el chip Human HT-12 V4.0 BeadChip (Illumina). Posteriormente, los chips se lavaron, se tiñeron con estreptavidina marcada con un colorante y se escanearon utilizando el escáner Illumina IScan. Los datos

en crudo se exportaron y se procesaron utilizando controles negativos para la corrección y normalización del fondo. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo por la Unidad de Bioinformática de GENYO. Se seleccionaron los genes con un p-valor <0,05 como genes expresados diferencialmente entre las muestras GARP⁺ y GARP⁻. Los análisis de las funciones biológicas y las vías canónicas afectadas se llevaron a cabo utilizando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems Inc). Se consideraron rutas inducidas aquellas que presentaban un z-score >2 y rutas inhibidas las que presentaban un z-score <2.

4.21. Cuantificación de secuencias de shRNA

Para cuantificar los niveles relativos de secuencias de shRNA en hASCs LV-CTRL, LV#18 y LV#19, se llevó a cabo la poliadenilación de las muestras de RNA utilizadas en el microarray siguiendo las instrucciones del kit Poly(A) Polymerase Tailing (Lucigen). Después, se realizó la reverso transcripción de las muestras poliadeniladas mediante un kit específico (High Capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems) utilizando un primer adaptador de poli (T) (5'-TTTTTTTTTTTTGGATATCACTCAGCATAATTAAGACACGAGCG-3'). Posteriormente, se llevó a cabo una qPCR de los diferentes shRNAs utilizando primers con secuencia sentido específicos para cada shRNA (LV-CTRL FW: 5'-CAACAAGATGAAGAGCACCA-3', LV#18 FW: 5'-GAATCTGGATTTGAGCTACA-3', LV#19 FW: 5'-CTACCTGAACTTGCCAACA-3') frente a un primer con secuencia anti-sentido universal (Universal RV: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'). Los resultados fueron normalizados utilizando U6 como calibrador (U6 FW: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACCA-3', U6 RV: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'). Además, los productos de PCR generados, fueron TA-clonados utilizando el kit de vector PCR 2.1 (Invitrogen) y las colonias fueron seleccionadas en placas de agar con IPGT/X-GAL (Sigma Aldrich). Se aislaron plásmidos de 4 clones por cada línea celular y se secuenciaron utilizando el primer M13 forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (Thermo Fisher) y el secuenciador genético 3130 (Applied

Biosystems), confirmándose de esta forma la identidad de los shRNAs producidos por LV-CTRL-, LV#18- and LV#19.

4.22. Ensayo de incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU)

El ciclo celular de las hASCs se estudió utilizando el kit BD Pharmingen™ BrdU Flow kit (BD Biosciences). Para ello, se trataron hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 con BrdU (10 μ M, durante 3 horas), 24 horas después de la transducción. A los 3 días, las células se marcaron, siguiendo las instrucciones del fabricante, para analizar la incorporación de BrdU. La frecuencia de células BrdU⁺ se analizó por citometría de flujo.

4.23. Medida de la producción de ROS

El contenido total en especies reactivas del oxígeno (ROS) de las hASCs se detectó utilizando un kit específico (DCFDA/H2DCFDA - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit, Abcam). Para ello, se plaquearon 50.000 hASCs NT, CTRL, #18 y #19 en placas de 12 pocillos, 4 días después de la transducción. Al día siguiente, se añadió sobre la placa 20 μ M del reactivo fluorescente DCFDA (diacetato de diclorofluoresceína) y se dejaron incubar las células 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las células se levantaron, se lavaron y se analizó el contenido celular de ROS por citometría de flujo. Para analizar el contenido en ROS específico de mitocondria (mtROS) se utilizó el reactivo específico MitoSOX (Molecular Probes, Invitrogen). Para ello, se plaquearon 50.000 hASCs NT, CTRL, #18 y #19 en placas de 12 pocillos, 4 días después de la transducción. Al día siguiente, se añadió sobre la placa medio de cultivo con 5 μ M del reactivo fluorescente MitoSOX. Las células se dejaron en el incubador 10 minutos a 37°C y seguidamente, se reemplazó el medio por medio fresco y se dejaron 3 horas a 37°C. Finalmente, Las células se levantaron, se lavaron y se analizó el contenido en mtROS por citometría de flujo.

4.24. Análisis de la fosforilación de H2AX

Para la detección de roturas de DNA de cadena doble (DSBs), se midieron los niveles de H2AX fosforilado (γ -H2AX) por citometría de flujo usando un kit específico (FlowCollect® Histone H2AX Phosphorylation Assay Kit, Millipore). Para inducir DSBs, se plaquearon

50.000 hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18, LV#19 and LV-GARP) en placas de 12 pocillos. Al día siguiente, las células se trataron con 25 μM de Etoposido (Sigma Aldrich) o se sometieron a irradiación (10 Gy) usando una dosis de 1,66 Gy min^{-1} en un irradiador gamma L. Shepherd & Associates MARK-I model 30 en la Unidad Experimental de Radiología del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Granada. Las células se tiñeron para $\gamma\text{-H2AX}$ a diferentes tiempos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de $\gamma\text{-H2AX}$ se analizaron por citometría de flujo.

Para estudiar el efecto de la inhibición de TGF- β o de mtROS en la inducción de DSBs, se plaquearon 50.000 hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18, LV#19) en pocillos de 12 a las 5 horas de la transducción. Al día siguiente las células se trataron con SB431542 (10 μM) o Mitotempo (25 μM) para inhibir TGF- β o mtROS, respectivamente. Pasados 3 días del tratamiento, las células se levantaron y se tiñeron para $\gamma\text{-H2AX}$ siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizaron los niveles de $\gamma\text{-H2AX}$ por citometría de flujo.

También se llevó a cabo un análisis de expresión de $\gamma\text{-H2AX}$ por citometría de Imagen. Para ello, se levantaron y se tiñeron hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18, LV#19) para $\gamma\text{-H2AX}$ utilizando el kit anteriormente citado. Posteriormente, los niveles de expresión de $\gamma\text{-H2AX}$ se midieron utilizando el citómetro de Imagen ImageStream X Mark II (Merck Millipore) y se analizaron con el software IDEAS utilizando el programa específico Spot Wizard. Este programa, proporciona el número concreto de focos por núcleo mediante un algoritmo interno.

4.25. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism. Todos los datos se representan como la media (SEM) de 3 experimentos independientes a menos que se indique lo contrario en la leyenda de las figuras. Las comparaciones por pares y las comparaciones múltiples de los datos obtenidos desde la figura 7 hasta la 18 se realizaron utilizando el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. Las comparaciones por pares y las múltiples comparaciones de los datos obtenidos desde

la figura 19 hasta la 31 (sin tener en cuenta las figuras 22-25 que son del microarray) se realizaron utilizando el test T de Student y ANOVA de un factor, seguido por del test de Dunnet o de Bonferoni, respectivamente. P-valores $<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. OBJETIVO 1: Analizar la expresión de CD105 en MSCs derivadas de tejido adiposo de ratón (mASCs) y caracterizar las subpoblaciones CD105⁺ y CD105⁻.

5.1.1. La expresión de CD105-Largo (CD105L) es heterogénea en MSCs de ratón

Para caracterizar el fenotipo temprano de las mASCs, se estudió la expresión de diferentes marcadores de MSCs en suspensiones celulares provenientes de digestiones de tejido adiposo (CD-AT) con colagenasa tipo 1, antes de la adhesión al plástico y a diferentes tiempos después de dicha adhesión (1, 2 y 6 días de cultivo). Antes de la adhesión celular al plástico, el 35% y el 50% de las células expresaban sca-1 y CD29, respectivamente, mientras que fueron casi negativas para CD44 y CD105 (7% y 5% respectivamente) (Figura 7A). Tras el cultivo *in vitro* en condiciones de hipoxia, alrededor del 30-40% de todas las células nucleadas se adhirieron al plástico y casi el 100% de esta fracción adherente fue positiva para CD29, CD44 y sca-1 después de 2 días en cultivo. En contraste, la expresión de CD105 alcanzó un máximo de 30-40% después de 6 días en cultivo. La fracción CD45⁺ disminuyó rápidamente durante la expansión inicial y desapareció casi por completo a día 6. La expresión de CD44 se mostró sensible a la colagenasa tipo 1 y al TrypLE, lo que puede explicar la ausencia de su expresión en CD-AT. Sin embargo, la expresión de CD105 no se vio afectada por la acción de estas enzimas (Figura 7B) y su ausencia en células CD-AT sugiere que su expresión es inducida en una parte de las mASCs tras su cultivo *in vitro*.

Para una caracterización más en detalle de los cultivos de mASCs, se procedió a determinar la expresión en mASCs con los marcadores estándar de MSCs por citometría de flujo. Nuestros estudios mostraron la presencia de dos poblaciones cuando se analizó la expresión de CD105, una población positiva (CD105⁺) y otra negativa (CD105⁻), mientras que el resto de marcadores mostraron una expresión homogénea, positiva para CD29, CD44, CD49f, CD140a y MHC de clase I y negativa para CD11b, CD45, CD49d, CD61, CD73, CD146 y MHC de clase II) (Figura 7C). Con la finalidad de determinar si la aparición de dos

subpoblaciones diferenciadas en cuanto a su expresión de CD105 era una característica común para las MSCs de ratón procedimos a analizar MSCs de diferentes cepas así como de otros tejidos (médula ósea). Como puede observarse en la figura 7D observamos patrones de expresión similares de CD105 en MSCs derivadas de diferentes cepas de ratones o de MSCs de diferente origen (médula ósea).

Existen dos isoformas funcionales de CD105, CD105-largo (CD105L) y CD105-corto (CD105S) que tienen efectos contrarios en la señalización por TGF- β (195). Por PCR cuantitativa (RTqPCR) encontramos que las mASCs expresan la isoforma CD105L mientras que no se detectó la presencia de CD105S (Figura 7E).

Las diferencias observadas en la expresión de CD105L podrían ser una consecuencia de las condiciones de cultivo. Por lo tanto, nos propusimos analizar si la expresión de CD105L en mASCs podría ser modulada por el tiempo de cultivo *in vitro* (número de pases), la confluencia celular, la presión de oxígeno o por diferentes citoquinas. Encontramos una pequeña pero continua reducción de expresión de CD105 durante la expansión de las mASCs. Sin embargo, ni los niveles iniciales de expresión de CD105 ni su regulación negativa durante los pases, se afectó por la presión de oxígeno (Figura 7F). Se sabe que TNF- α e IFN- γ son activadores de las MSCs (240) y se ha visto que son capaces de regular negativamente la expresión de CD105 en células endoteliales vasculares (241). Sin embargo, la estimulación de las mASCs con ambas citoquinas no afectó a la expresión de CD105 mientras que se reguló positivamente la expresión de MHC de clase I y sca-1 (Figura 7G).

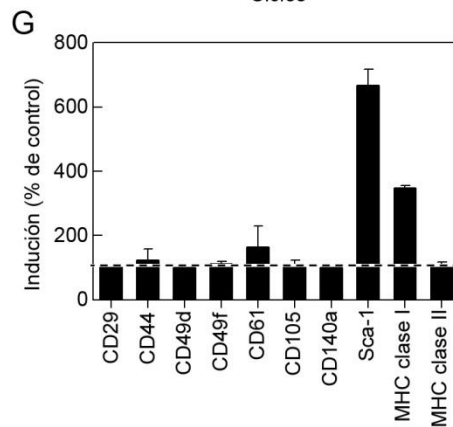
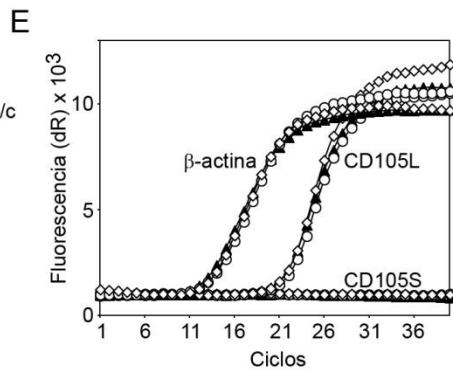
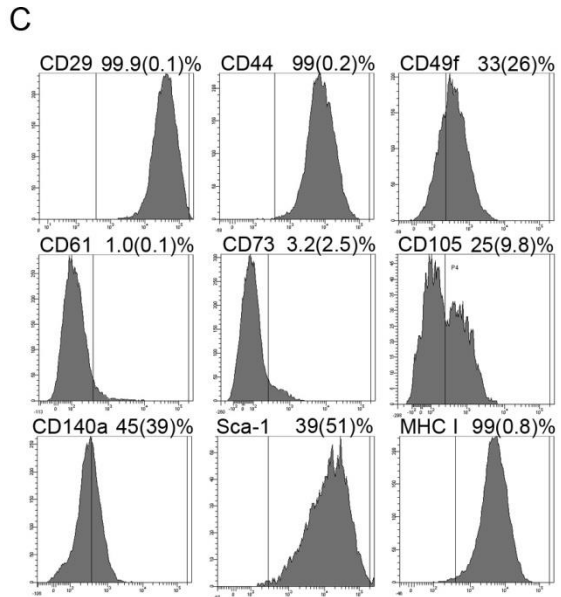
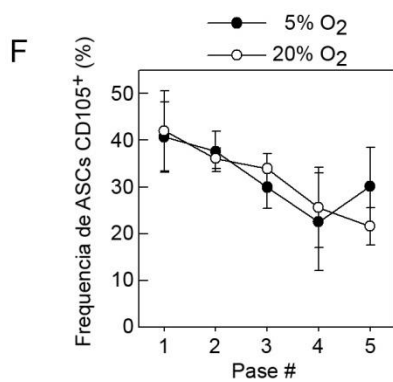
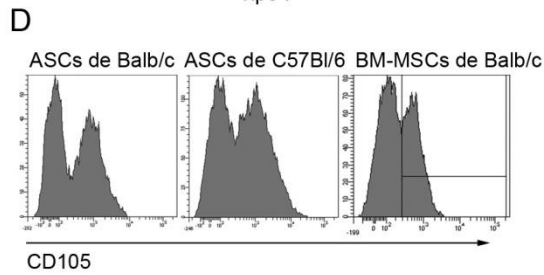
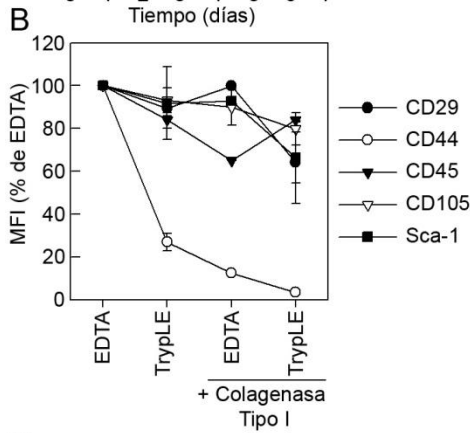
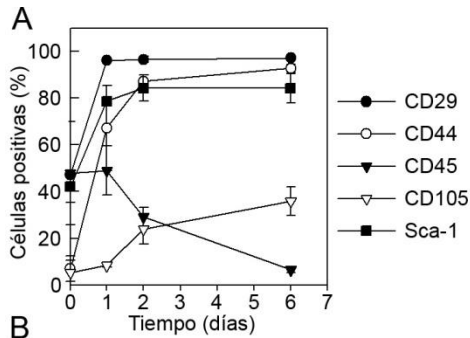


Figura 7: Las MSCs de ratón son heterogéneas en su expresión de CD105L: (A) Se digirió tejido adiposo procedente de ratón con colagenasa tipo I durante 30 minutos y la suspensión celular resultante se caracterizó por citometría de flujo para la expresión de varios marcadores de superficie antes (día 0) y después (día 1, 2 y 6) de añadir las a placas de cultivo. (B) Los cultivos de ASCs se despegaron de las placas utilizando EDTA (2mM en PBS), TrypLE o EDTA seguido de colagenasa I y se analizaron por citometría de flujo. Los niveles de expresión (MFI) de cada marcador se normalizaron con la correspondiente tinción de células levantadas con EDTA. (C) Caracterización por citometría de flujo de mASCs de pase 4 para un panel de antígenos de superficie. Se muestran histogramas representativos y los porcentajes de las células positivas (media (SEM)) de 4 experimentos independientes. (D) Caracterización por citometría de flujo de los niveles de expresión de CD105 en ASCs procentes de ratones Balb/c y C57Bl/6 y de MSCs procedentes de médula ósea. (E) Análisis de expresión de CD105L, CD105S y β -actina por RT-qPCR. (F) Análisis de los niveles de expresión de CD105 en mASCs cultivadas al 5% o 21% de O₂ durante 5 pases. (G) Se cultivaron ASCs con o sin TNF- α (10 ng/ml) e IFN- γ (10 ng/ml) durante 24 horas y se analizaron los niveles de un panel de marcadores de MSCs por citometría de flujo. Los resultados en A, B y F se muestran como la media (SEM) de 3 experimentos independientes; en C y D se muestra un experimento representativo de al menos 4 experimentos independientes; los datos en G se representan como la media (SEM) de 2 experimentos independientes.

Finalmente, se sabe que el grado de confluencia celular afecta a la expresión de marcadores celulares de superficie (242,243). Encontramos que la expresión en superficie de CD105 disminuyó cuando los cultivos de mASCs se volvieron confluentes mientras que los niveles de RNA mensajero (mRNA) aumentaron (Figura 8A y 8B). Se ha visto recientemente que la metaloproteinasa (MMP) de matriz tipo 1 (MT1-MMP/MMP-14), que es una MMP unida a la membrana, puede escindir CD105 de la superficie celular (244). Detectamos un aumento de los niveles de mRNA de MMP-14 cuando los cultivos de mASCs llegaron a confluencia y un aumento de los niveles de CD105 cuando se añadió un inhibidor de MMP (GM6001). Sin embargo, el vehículo control que se utilizó (DMSO), también incrementó la expresión de CD105 hasta el mismo nivel, sugiriéndose de esta forma que MMP-14 no es responsable de la disminución de expresión de CD105 en mASCs (Figura 8B y 8C).

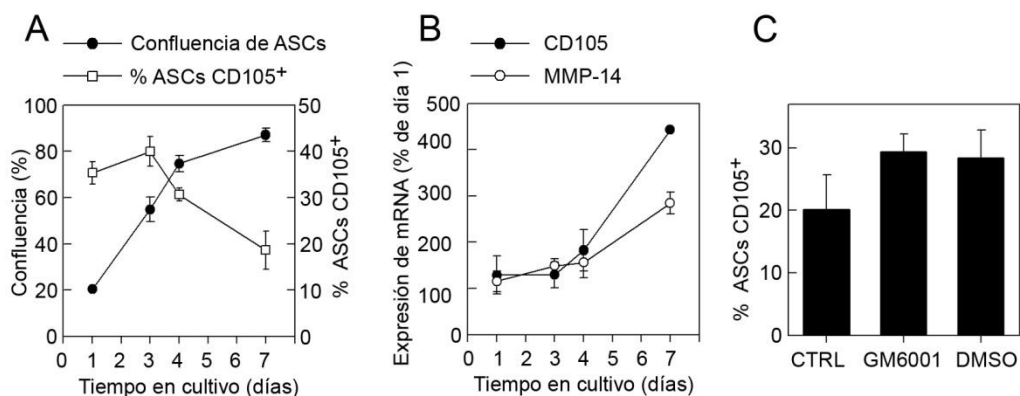


Figura 8: La expresión de CD105 disminuye en cultivos confluentes de mASCs: Se plaquearon mASCs a baja densidad (5.000 células/cm²) y se dejaron en cultivo durante 7 días. Las células se levantaron a día 1, 3, 4 y 7 y (A) Se analizó la expresión de CD105 por citometría de flujo y se evaluó la confluencia utilizando el software ImageJ y (B) se purificó la mRNA total, se llevó a cabo la reverso-transcripción del mismo y se analizaron los niveles de expresión de CD105 y MMP-14 por RTqPCR. (C) Se plaquearon ASCs a 5.000 células/cm² en placas de 6 pocillos y 4 días después se añadió GM6001 (25µM) o su correspondiente vehículo (DMSO). Las células se levantaron después de 72 horas y se analizó la expresión de CD105 por citometría de flujo. Los datos se representan como la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes.

Tomados en conjunto, estos datos muestran que las mMSCs muestran una expresión heterogénea de CD105L y sus niveles pueden ser modificados parcialmente por el número de pases y el grado de confluencia celular.

5.1.2. CD105 define dos poblaciones de MSCs en ratón

Las mASCs CD105⁺ y CD105⁻ podrían representar diferentes estados de activación y/o diferenciación celular pero también podrían representar subpoblaciones multipotentes con diferentes propiedades. Para investigar estas posibilidades, separamos las dos subpoblaciones (CD105⁺ y CD105⁻) utilizando un separador celular magnético (MACS). Cuando se realizaron análisis por citometría de flujo de las poblaciones separadas pudimos observar que ambas poblaciones compartían patrones similares de expresión de los marcadores característicos de MSCs: ambas poblaciones eran negativas para CD45 y positivas para CD29, CD44, CD49f, sca-1 y MHC de clase I (Figura 9A). El cultivo

prolongado de las mASCs CD105⁺ tuvo como resultado una pérdida gradual de expresión en superficie de CD105 (Figura 9B), como se pudo observar previamente en la población total (Figura 7F). Curiosamente, la población CD105⁻ se mantuvo negativa, indicando que estas células no pueden adquirir la expresión de CD105 durante el cultivo (Figura 9B). Las células CD105⁻ también fueron incapaces de expresar CD105 tras la adición de TGF-β1, mientras que la población positiva respondió aumentando ligeramente su expresión de CD105 (Figura 9C).

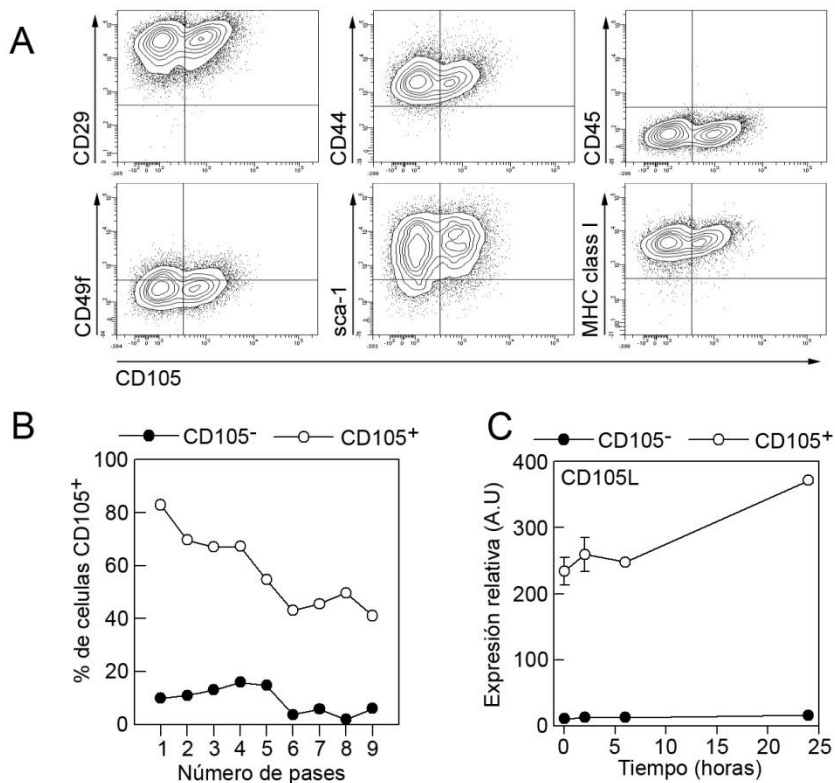


Figura 9: CD105 define dos subpoblaciones diferentes de MSCs en ratón: (A) Plots mostrando los niveles de expresión de CD105 en combinación con CD29, CD44, CD45, CD49f, sca-1 y MHC clase I en ASCs de ratones Balb/c. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. (B) Se cultivaron mASCs CD105⁻ y CD105⁺ purificadas con el AutoMACs durante 9 pases y se analizó la expresión de CD105 en cada pase por citometría de flujo. (C) Se privaron de suero mASCs CD105⁻ y CD105⁺ durante 24 horas y después se estimularon con 10 ng/ml de TGF-β recombinante humano durante 0, 2, 6 y 24 horas. En cada

punto se purificó el RNA total, se sintetizó la cadena complementaria mediante transcripción inversa y se midió la expresión de CD105L por RTqPCR.

Estos resultados sugieren que la población CD105⁻ podría representar una subpoblación de MSCs distinta de la subpoblación CD105⁺.

La regulación negativa de expresión de CD105 está asociada con diferenciación de MSCs (205) y, en humanos, el antígeno CD105 se ha utilizado para seleccionar MSCs multipotentes (245). Por lo tanto, decidimos estudiar la capacidad de proliferación y de formación de clones de las mASCs CD105⁺ y CD105⁻. Si las células CD105⁻ representaran células diferenciadas, estas deberían tener menor capacidad de proliferación y menor potencial clonogénico que la subpoblación CD105⁺. Sin embargo, pudimos observar que no existían diferencias en tamaño celular, capacidad de proliferación y de formación de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) entre la población CD105 negativa y positiva (Figura 10A y Figura 10B). Además de esto, llevamos a cabo análisis por qPCR de diferentes marcadores específicos de pluripotencia y linaje, comparando la población total, CD105⁺ y CD105⁻. No observamos diferencias entre las diferentes poblaciones en la expresión de nanog (marcador de multipotencia), PPAR- γ y LPL (adipogénesis), ALP y osteocalcina (osteogénesis) y Sox-9 (condrogénesis) (Figura 10C).

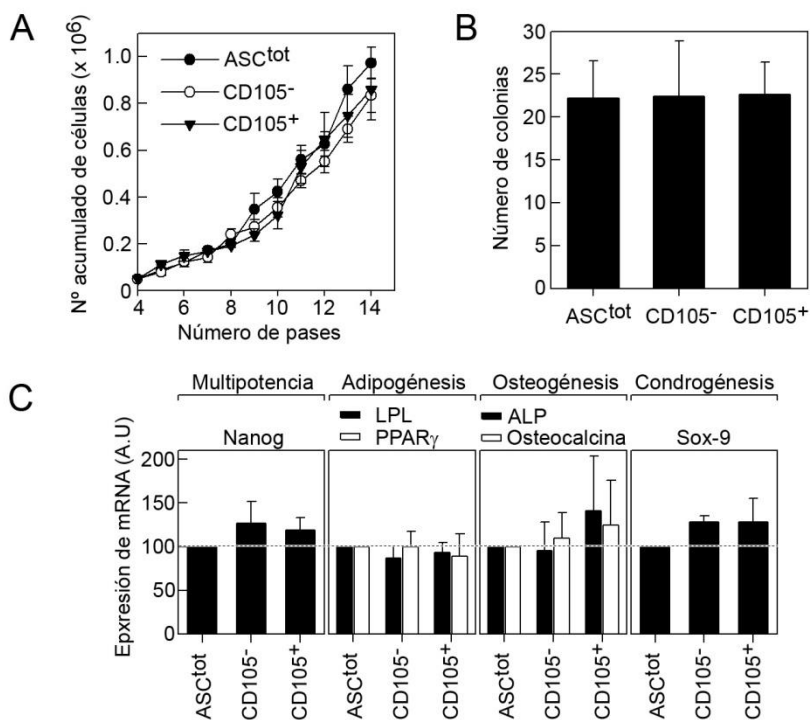


Figura 10: La población CD105⁻ no representa células más diferenciadas que la CD105⁺: (A) Curva de crecimiento de ASCs controles y de ASCs separadas en función de la expresión de CD105 (CD105⁻ y CD105⁺). Se plaquearon 25.000 células/cm² de ASC_{tot}, CD105⁻ y CD105⁺ en frascos de cultivo T25 y se cultivaron en condiciones de hipoxia hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Las células se levantaron, se contaron y se volvieron a plaquear a la misma densidad durante 10 pases. (B) Análisis de la capacidad de formación de colonias de ASC_{tot}, CD105⁻ y CD105⁺. Se cultivaron células ASC_{tot}, CD105⁻ y CD105⁺ en placas de petri de 10 cm (2.000 células/placa) durante 14 días para llevar a cabo un ensayo de CFU-F como se describe en materiales y métodos. Las células se fijaron seguidamente con PFA y se tiñeron con cristal violeta para visualizar CFU-F. (C) Análisis de expresión relativa de genes de multipotencia y diferenciación mediante RTqPCR. La gráfica muestra los niveles de expresión relativos (ASC_{tot}=100%) en mASCs CD105⁻ y CD105⁺ de diferentes genes involucrados en multipotencia de las ASCs (Nanog), adipogénesis (LPL, PPAR- γ), osteogénesis (osteocalcina, ALP) y condrogénesis (Sox-9) en relación con los niveles encontrados en la población sin separar. Los resultados se muestran como la media (SEM) de 3 experimentos independientes.

Estos datos sugieren que la subpoblación CD105⁻ no representa células diferenciadas sino más bien una subpoblación distinta de MSCs.

5.1.3. La subpoblación de mASCs CD105⁻ es más propensa a diferenciarse en adipocitos y osteocitos

Una de las características que define a las MSCs es su habilidad para diferenciarse en adipocitos, osteoblastos y condroblastos. Por lo tanto, nos propusimos investigar la capacidad de diferenciación de las mASCs CD105⁺ y CD105⁻. Encontramos que las células CD105⁻ generaron significativamente más adipocitos y osteoblastos que la población total y las células CD105⁺ (Figura 11A y 11B).

Como se muestra en la figura 10C, la mejor capacidad de inducción de adipocitos y osteoblastos por parte de las mASCs CD105⁻, no se puede atribuir a la presencia de células ya comprometidas a convertirse en adipocitos (preadipocitos) y/o osteocitos (osteoprogenitores), dado que no existe un incremento en la expresión de genes de diferenciación hacia estos linajes (LPL, PARP- γ , ALP y osteocalcina). TGF- β 1 inhibe la adipogénesis y osteogénesis (246) y por lo tanto, una reducción en la señalización de TGF- β 1 podría mejorar la diferenciación hacia estos linajes. Una reducción de CD105 u otros receptores de TGF- β en las ASCs podría favorecer la adipo- y osteogénesis. Para analizar esta posibilidad, primero estudiamos el patrón de expresión de diferentes receptores de TGF- β en las mASCs CD105⁺ y CD105⁻. Encontramos que ambas subpoblaciones expresaban niveles similares de β -glicano, ALK1, ALK5 y el receptor II de TGF- β , mientras que ALK2 no se expresaba en ninguna subpoblación (Figura 11C y Figura 11D). Por lo tanto, en principio, cualquier diferencia entre la subpoblación CD105⁻ y CD105⁺ se podría deber a la presencia o ausencia de CD105. Estos datos concuerdan con trabajos publicados previamente en los que se vio que la regulación negativa de CD105 potenciaba la diferenciación osteogénica (211) y adipogénica (247).

Para analizar más en profundidad el papel de la señalización de TGF- β en la diferenciación de las mASCs, medimos los niveles de expresión de la interleucina 11 (IL-11), conocida previamente como factor inhibidor de adipogénesis (AGIF) (248). IL-11 es un gen inducible por TGF- β 1 que depende de la activación de smad 2/3/4. La estimulación de las diferentes subpoblaciones con TGF- β 1 reveló una inducción mayor y más sostenida de IL-11 en las mASCs CD105⁺ en comparación con las CD105⁻ (Figura 11E). La menor expresión

de IL-11 tras la estimulación con TGF- β 1 podría explicar parcialmente el incremento en la capacidad adipogénica de esta subpoblación.

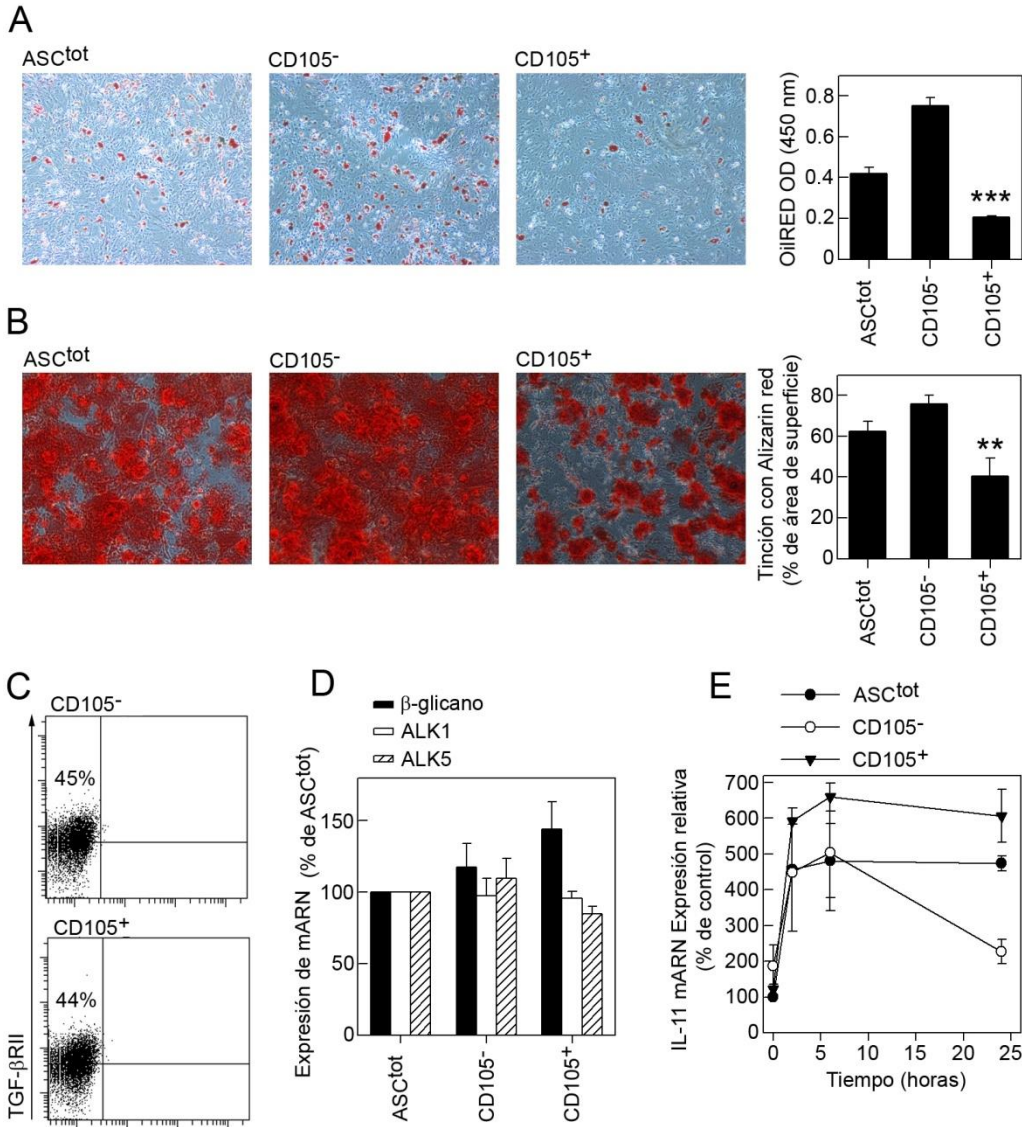


Figura 11: Las ASCs CD105⁻ son más propensas a diferenciarse hacia adipocitos y osteocitos. Se indujeron los procesos de adipogénesis (A) y osteogénesis (B) en poblaciones de ASC_{tot}, CD105⁻ y CD105⁺. Se muestra un experimento representativo de 3-4 experimentos. El grado de diferenciación hacia adipocitos se visualizó utilizando OilRED y la cantidad de OilRED extraída de las diferentes poblaciones de ASCs se midió utilizando un espectrofotómetro (450 nm). Los gráficos de barras muestran la media (SD) de triplicados experimentales. *= $p < 0,05$ vs mASCs CD105⁻. El depósito de calcio de los osteocitos en diferenciación se visualizó utilizando

alizarin red y se cuantificó utilizando el software ImageJ. Los gráficos de barras representan la media (SD) de triplicados experimentales. **= $p < 0,01$ vs mASCs CD105⁻. Se tiñeron células CD105⁻ y CD105⁺ para el receptor II de TGF- β (TGF β RII) y se analizó por citometría de flujo. (D) Se purificó el RNA total de de ASC_{tot}, CD105⁻ y CD105⁺, se llevó a cabo su reverso-transcripción y se evaluaron los niveles de β -glicano, ALK1, ALK2 y ALK5 por RTqPCR. (E) Se privaron de suero mASCs CD105⁻ y CD105⁺ durante 24 horas y después se estimularon con 10 ng/ml de TGF- β 1 recombinante humano durante 0, 2, 6 y 24 horas. En cada punto se purificó el RNA, se reverso-transcribió y se analizó la expresión de IL-11 por RTqPCR. Los resultados se muestran como la media (SEM) de dos experimentos independientes. Los valores de expresión se representan en relación a las ASC_{tot} a tiempo 0h.

5.1.4. La subpoblación de mASCs CD105⁻ presenta mejor capacidad inmunomoduladora *in vitro* que la subpoblación CD105⁺

Se sabe que las células mesenquimales estromales son capaces de inhibir la respuesta inmunitaria *in vitro* e *in vivo* a través de múltiples mecanismos (249). Sin embargo, no se sabe si las mASCs CD105⁺ y CD105⁻ son igual de eficientes inhibiendo la respuesta inmunitaria *in vitro*. Con esta finalidad, primero medimos la producción de algunas moléculas inmunomoduladoras importantes por las 3 subpoblaciones celulares (ASC_{tot}, CD105⁺ y CD105⁻). Encontramos que las mASCs CD105⁻ producían un poco más de TGF- β 1 y menos PGE₂ en comparación con las ASC_{tot} y las CD105⁺, pero esas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 12A). La estimulación de las mASCs con TNF- α e IFN- γ dio como resultado un ligero aumento de mRNA de iNOS (Óxido nítrico sintetasa) e IL-6 en las mASCs CD105⁻ en comparación con las CD105⁺ (Figura 12B). Ambos mediadores, han sido implicados en la capacidad inmunomoduladora de las MSCs (250,251), incluyendo la inhibición de las células T. En consonancia, encontramos que las células CD105⁻ fueron significativamente mejores inhibiendo la proliferación de esplenocitos que las CD105⁺ (Figura 12C) en proporciones bajas de ASCs/esplenocitos. Nosotros, al igual que otros grupos, hemos mostrado que las MSCs pueden inducir estados de activación reguladora en macrófagos, caracterizados por una mayor proporción IL-10/IL-12 después de la re-estimulación (65,252,253).

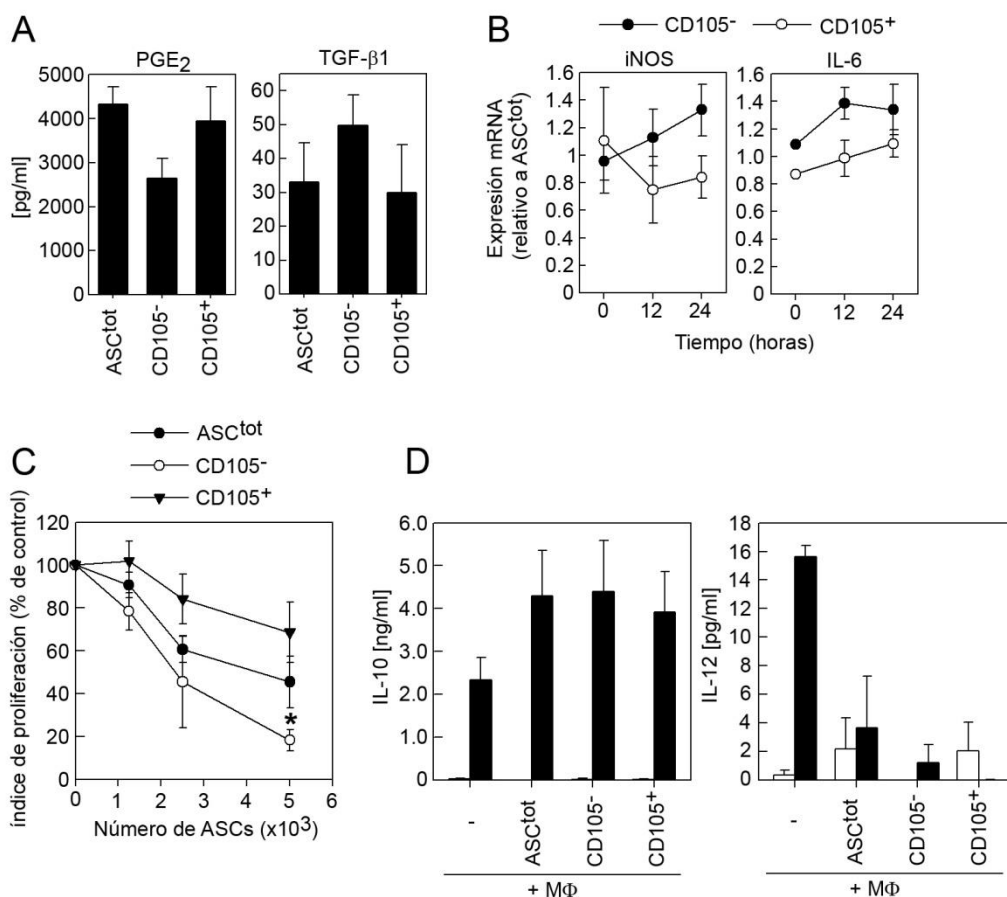


Figura 12: Comparación de la capacidad inmunomoduladora de las mASCs CD105⁻ y CD105⁺. (A) Se midieron los niveles de PGE₂ y TGF-β₁ en sobrenadantes de cultivos de ASC^{tot}, CD105⁻ y CD105⁺ utilizando kits de ELISA específicos (ver materiales y métodos). (B) Se estimularon ASC^{tot}, CD105⁻ y CD105⁺ con TNF-α (10 ng/ml) e IFN-γ (10 ng/ml) durante 12 y 24 horas. Se purificó el RNA en cada punto y se analizó la expresión de iNOS e IL-6 por qPCR. (C) Se cultivó un número creciente de ASC^{tot}, CD105⁻ y CD105⁺ tratadas con mitomicina C junto con esplenocitos marcados con CFSE (200.000 células/pocillo) y se estimularon los co-cultivos con anti-CD3 (1μg/ml) durante 3 días. Las células se levantaron entonces y se adquirieron en el citómetro de flujo. La proliferación de los esplenocitos CD4⁺ se cuantificó utilizando el software FlowJo. (D) Se cultivaron BM-MΦs durante 48 horas con o sin mASCs y se re-estimularon con LPS (1μg/ml) durante 24 horas (barras negras). Se midieron los niveles de IL-10 (gráfica izquierda) e IL-12 (gráfica derecha) en los sobrenadantes de los co-cultivos utilizando kits de ELISA específicos. Los datos se muestran como la media (SEM) de al menos 3 experimentos independientes. *=p<0,05 vs mASCs CD105⁺.

Curiosamente, estos macrófagos reguladores (M Φ regs) participan en la supresión de la proliferación de las células T mediada por MSCs (252). Para analizar la capacidad relativa de las ASC_{tot}, CD105⁺ y CD105⁻ para inducir macrófagos reguladores, cultivamos macrófagos derivados de médula ósea (BM-M Φ s) con o sin las diferentes subpoblaciones de mASCs durante 72 horas en presencia de LPS las últimas 24 horas. Como se había descrito previamente, encontramos que en las mASCs cocultivadas con macrófagos activados se producía un aumento de la proporción IL-10/IL-12 sugiriendo un cambio de macrófagos activados clásicamente hacia un fenotipo regulador. Sin embargo, no pudimos observar ninguna diferencia entre las 3 poblaciones en su capacidad para inducir M Φ regs (Figura 12D).

5.2. OBJETIVO 2: Comprender el papel de GARP en la biología de las MSCs.

5.2.1. Las células mesenquimales estromales expresan GARP y LAP/TGF- β 1 en su superficie

En un estudio publicado por Barbet y colaboradores (219), se describe la presencia de mRNA de GARP en células mesenquimales estromales humanas (hMSCs), sin embargo, no se han publicado más estudios sobre GARP y MSCs. Como TGF- β 1 es un regulador clave de multitud de funciones celulares (proliferación, diferenciación e inmunomodulación) y GARP se une a TGF- β 1, pensamos que GARP podría jugar un papel importante en la biología de las MSCs. Por tanto, estudiamos si la expresión de GARP era una propiedad general de las MSCs (de ratón y humanas) y examinamos su localización superficial. Como se había descrito previamente, existe expresión de mRNA de GARP en hMSCs pero nosotros también lo detectamos en MSCs de ratón extraídas de diferentes tejidos (Figura 13A). Por Western blot, se detectó la proteína de GARP en MSCs derivadas de tejido adiposo (ASCs) de ratón y también de humano (Figura 13B). Además de la banda de 72 kDa correspondiente a GARP que se observó en timocitos, también detectamos una banda adicional más pequeña en ASCs. Esto podría deberse a diferencias en glicosilación y/o en el procesamiento de la proteína (214,254). Por citometría de flujo (FACs),

encontramos que tanto las ASCs de ratón como de humano expresan GARP y LAP/TGF β 1 en su superficie (Figura 13C), lo que podría estar indicando que GARP actúa como receptor de TGF β 1.

Para investigar la expresión de GARP en mASCs recién aisladas, teñimos suspensiones celulares obtenidas de digestiones de tejido adiposo con colagenasa para analizar la expresión de GARP antes y después de que las células se adhieran al plástico. Pudimos observar que GARP no se expresaba en células sca-1 positivas recién aisladas (Figura 13D, día 0) pero su expresión se inducía rápidamente después del cultivo *in vitro* (Figura 13D, día 1), alcanzando una inducción de 20-30 veces después de 1-2 días, respectivamente, aunque en pases posteriores, las células generalmente expresaban mayores niveles de GARP (Figura 13D día 6 y Figura 13C).

Con ASCs humanas observamos una inducción similar, apenas había un 6% de expresión de GARP en células CD34⁺ recién aisladas (Figura 13E, día 0) pero la expresión se inducía rápidamente tras cultivar las células *in vitro*, alcanzando en torno a un 90% de expresión a día 6 (Figura 13E día 1, 2 y 6 y Figura 13C). Estos datos sugieren que GARP no se expresa en la superficie de las ASCs en condiciones fisiológicas pero su expresión se induce tras el cultivo *in vitro*.

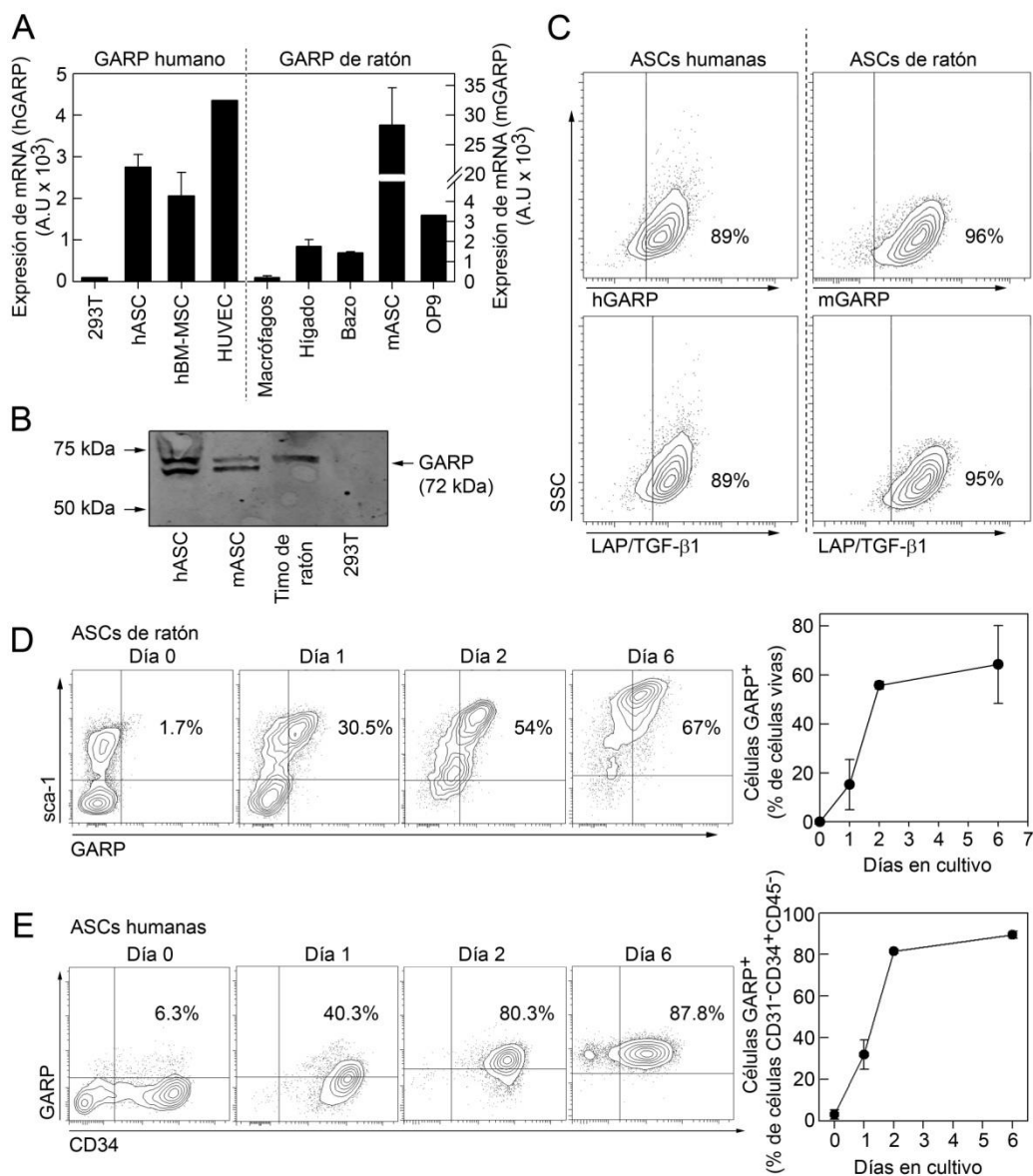


Figura 13: Las MSCs expresan GARP y LAP/TGF- β en su membrana. (A) Análisis por RTqPCR de la expresión de GARP en MSCs humanas (izquierda) y de ratón (derecha). Se analizó la expresión de GARP en hASCs y hBM-MSCs junto con las líneas humanas 293T y HUVEC (células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical). La expresión en células de ratón se analizó en MSCs derivadas de tejido adiposo (mASCs) y en la línea mesenquimal OP9. Como controles de las muestras de ratón usamos macrófagos derivados de médula ósea, hígado y bazo. (B) La proteína total de hASCs, mASCs, timocitos de ratón y células 293 se analizó por

Western blot utilizando un anticuerpo GARP anti-ratón/humano. (C) Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión en superficie de GARP (arriba) y LAP/TGF- β (abajo) de ASCs de ratón y humanas levantadas con EDTA. (D y E) Análisis de la cinética de expresión de GARP tras el aislamiento de ASCs. Se trató el tejido graso de ratones Balb/c (D) y de humano (E) con colagenasa tipo 1 y en la suspensión celular resultante se analizó la expresión de GARP/sca-1 (mASCs) y de GARP/CD34 (hASCs) mediante citometría de flujo antes (día 0) y 1, 2 y 6 días después del cultivo *in vitro*. (A, D y E) muestran la media (SEM) de 3 experimentos independientes; (B y C) muestran un experimento representativo de por lo menos 3.

5.2.2. GARP une LAP/TGF- β 1 a la superficie celular de las mASCs

La principal función descrita para GARP en células T y plaquetas es la unión de LAP/TGF- β 1 a su superficie celular (255). Nosotros observamos que GARP y LAP/TGF- β 1 colocalizan en mASCs mediante microscopía confocal, lo que sugiere una posible interacción entre ambos (Figura 14A). Para estudiar la contribución que tiene GARP en la expresión en superficie de LAP/TGF- β 1 en MSCs, noqueamos GARP en estas células y analizamos los niveles de expresión en superficie de LAP/TGF- β 1 por citometría de flujo. Para ello, se transdujeron mASCs con vectores lentivirales que codifican para un RNA interferente (shRNA) inespecífico (LV-CTRL) o dos shRNAs diferentes y específicos para GARP (LV#3 y LV#6). Pasados de 3 a 5 días de la transducción, la expresión de GARP se redujo más de un 80% en proteína y mRNA, en comparación con las células no transducidas (NT) y las células LV-CTRL (Figura 14B). El silenciamiento de GARP redujo significativamente la expresión de LAP/TGF- β 1 en la superficie de las mASCs (Figura 14C y Figura 14D), lo que indica que GARP está involucrado en la unión de mbTGF- β 1 a la superficie de las mASCs.

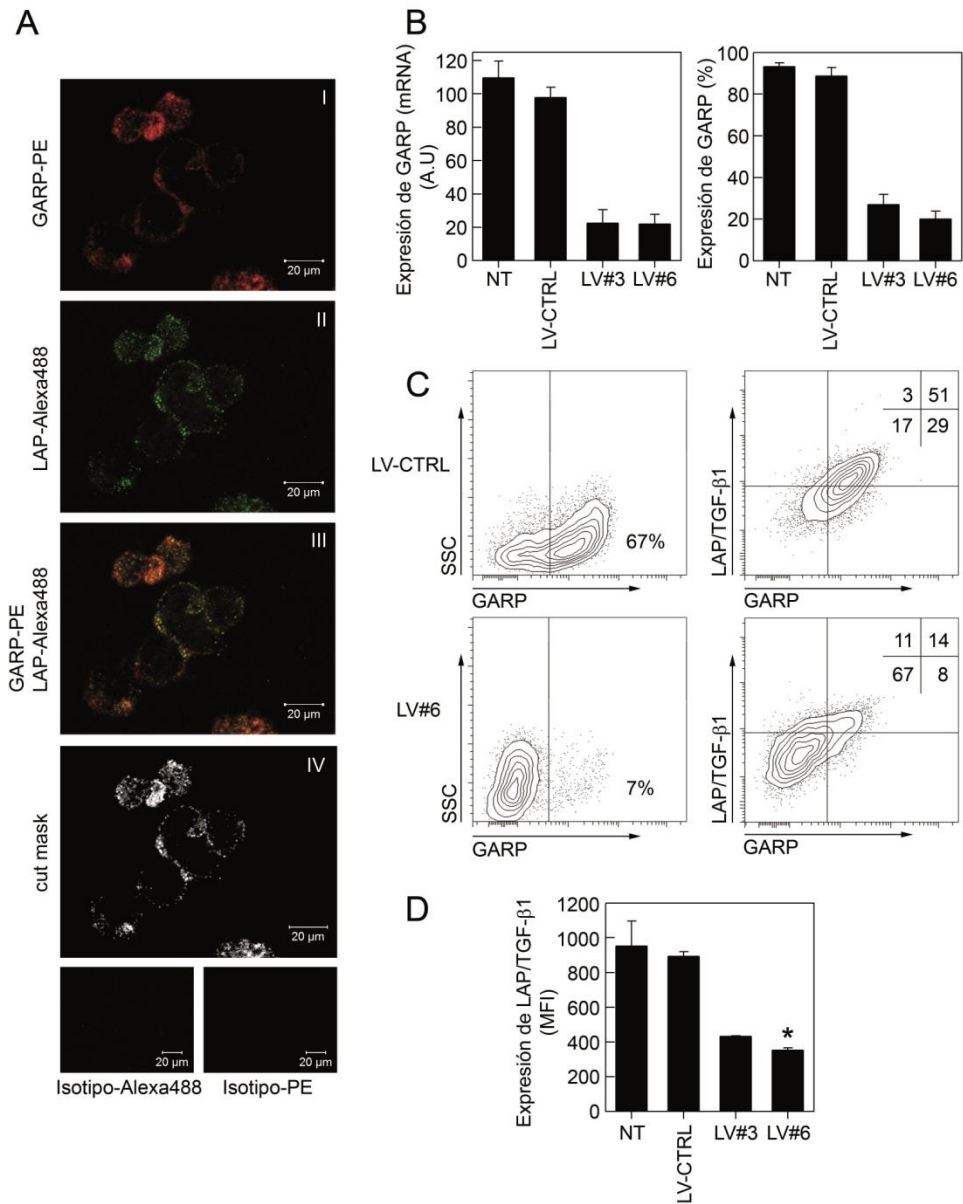


Figura 14: GARP une LAP/TGF-β1 a la superficie de las mASCs: (A) Microscopia confocal mostrando los niveles de colocalización de GARP y LAP. Se realizó una tinción superficial de ASCs de ratón para GARP (PE) y LAP (Alexa488) o para los controles de isotipo (paneles de abajo) como se describe en materiales y métodos. Las tinciones se muestran de forma separada (paneles I y II) y superpuestas (panel III). En el panel IV se muestra la co-localización de GARP/LAP. Las células se fotografiaron utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 710. (B) Silenciamiento de GARP en mASCs. Se transdujeron mASCs con vectores lentivirales que

expresaban un shRNA inespecífico (LV-CTRL) o shRNAs específicos para GARP (LV#3 y LV#6) y se evaluó el silenciamiento de GARP por qPCR (panel izquierdo) y citometría de flujo (panel derecho). El número de copias del vector/mASC de los diferentes LV utilizados fue entre 2-3. (C) El silenciamiento de GARP reduce los niveles de LAP/TGF- β 1 en la superficie de las mASCs. Se llevó a cabo una tinción de GARP (paneles izquierdos) y LAP/TGF- β 1 (paneles derechos) en mASCs LV-CTRL y LV#6. Se muestra un experimento representativo de 3. (D) Cuantificación de la reducción de los niveles de LAP/TGF- β 1 en superficie tras el silenciamiento de GARP. Se midieron los niveles de expresión de LAP/TGF- β 1 (MFI) en mASCs NT, LV-CTRL, LV#3 y LV#6 por citometría de flujo. Los resultados se muestran como la media (SEM) de 3 experimentos independientes. * = $p < 0,5$ vs LV-CTRL.

5.2.3. El silenciamiento de GARP aumenta la secreción y activación de TGF- β 1 por las mASCs

Se sabe que GARP regula la secreción de LAP/TGF- β 1 en células T reguladoras (Gauthy, Cuende et al. 2013; R. Wang et al. 2012). Por tanto, nos propusimos analizar la secreción de TGF- β 1 por las mASCs (NT, CTRL, LV#3 y LV#6). Encontramos que las células silenciadas (GARP⁻) secretaban significativamente más TGF- β 1 en comparación las células NT y las LV-CTRL (Figura 15A). GARP también ha sido implicado en la regulación de la activación de TGF- β 1 proporcionando, en la superficie celular, una plataforma para la presentación de LAP/TGF- β 1 a diferentes integrinas (226). Por tanto, el siguiente paso fue medir los niveles de TGF- β 1 activo en sobrenadantes no activados por ácido de mASCs silenciadas y sin silenciar. Detectamos bajas cantidades de TGF- β 1 activo en los sobrenadantes de las células silenciadas pero no fuimos capaces de detectarlo en células NT y LV-CTRL (Figura 15B). Para corroborar el incremento en la activación de TGF- β 1 por las mASCs GARP⁻, analizamos la expresión de genes inducibles por TGF- β 1 en mASCs NT, LV-CTRL y LV#6. La adición de TGF- β 1 recombinante induce la expresión de interleucina (IL)-11 y, en menor medida, de calponina (cnn)-1 (143,257). De acuerdo con esos datos previos, encontramos que la expresión de ambos genes era mayor en las células silenciadas (Figura 15C y Figura 15D). La adición del inhibidor de TGF- β SB431542 fue capaz de reducir parcialmente los niveles de expresión de ambos genes, sugiriendo que la señal autocrina de TGF- β 1 está involucrada en su inducción (Figura 15C y Figura 15D). Si las mASCs GARP⁻ producen más TGF- β 1 activo, deberíamos ser capaces de observar un incremento en la fosforilación de

Smad 2/3 en esas células. En efecto, observamos un claro incremento en los niveles de fosfo-Smad 2/3 nuclear en las células silenciadas que se bloqueaba con la adición de SB431542 (Figura 15E y Figura 15F).

Estos datos indican que GARP regula la secreción y la activación de TGF- β 1 por las mASCs.

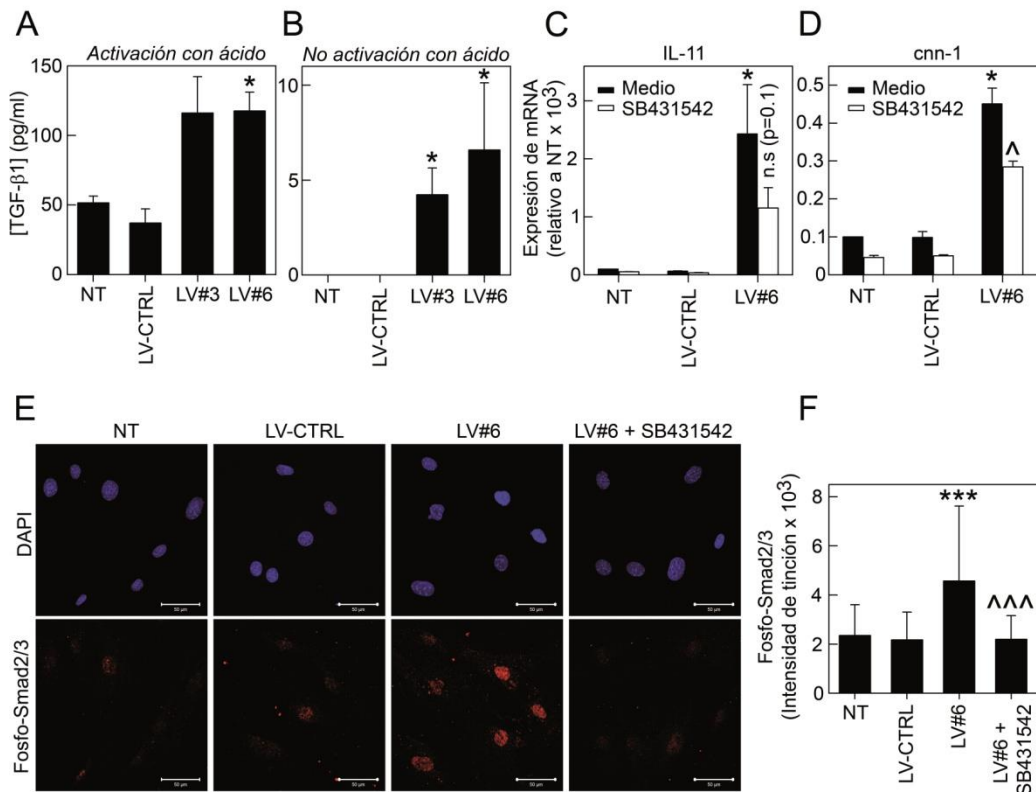


Figura 15: GARP modula la secreción y activación de TGF- β 1. (A, B) El silenciamiento de GAP incrementa los niveles de TGF- β en el medio de cultivo de las mASCs. Se cultivaron mASCs NT, LV-CTRL, LV#3 y LV#6 durante 48 horas y se determinó la concentración de TGF- β en sobrenadantes activados con ácido (A) o sin tratar (B) por ELISA. (C, D) El silenciamiento de GARP incrementa los niveles de mRNA de IL-11 y *cnn-1*. Se cultivaron mASCs NT, LV-CTRL, LV#3 y LV#6 durante 48 horas en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) de SB431542 (10 mM) y se analizaron por RTqPCR los niveles de expresión de IL-11 (C) y *cnn-1* (D) por rtqPCR. Los datos se muestran como la media (SEM) de 4 experimentos independientes. *= $p < 0,5$ vs LV-CTRL. ^= $p < 0,5$ vs LV#6. (E, F) El silenciamiento de GARP aumenta los niveles de fosfo-smad2/3 en mASCs. Se cultivaron mASCs NT, LV-CTRL, y LV#6 en cámaras de 8 pocillos (5.000 células/pocillo) en medio suplementado con 0,2% de FBS, con o sin SB431542 (10 mM) durante 48 horas. Seguidamente, las células se fijaron, se

permeabilizaron, se tiñeron para fosfo-Smad 2/3 y se montaron con el reactivo Slowfade Gold antifade (Life Technologies) con DAPI. Las imágenes (E) se capturaron utilizando el microscopio confocal Zeiss LSM 710. Se muestra un experimento representativo de dos. Los datos fueron cuantificados mediante el software ZEN 2010 (Carl Zeiss) y representados en la grafica (F) mostrando la intensidad de tinción en los diferentes grupos. Los datos se muestran como la media (SD). ***= $p < 0,001$ vs LV-CTRL. ^^= $p < 0,001$ vs LV#6.

5.2.4. GARP también regula la secreción y activación de TGF- β 1 en ASCs humanas.

Con los resultados obtenidos en MSCs de ratón, nos propusimos investigar si GARP lleva a cabo un papel similar en MSCs humanas (hMSCs).

Al igual que en mASCs, el silenciamiento de GARP utilizando vectores lentivirales que codifican shRNAs específicos para GARP humano (LV#18 y LV#19) redujo significativamente la expresión de LAP/TGF- β 1 en la membrana de las hASCs (Figura 16A - Figura 16C). También encontramos que las hASCs GARP⁻ secretaban mayores niveles de TGF- β 1 (Figura 16D) y detectamos un incremento en los niveles de expresión de IL-11 en hASCs GARP⁻ (Figura 16F).

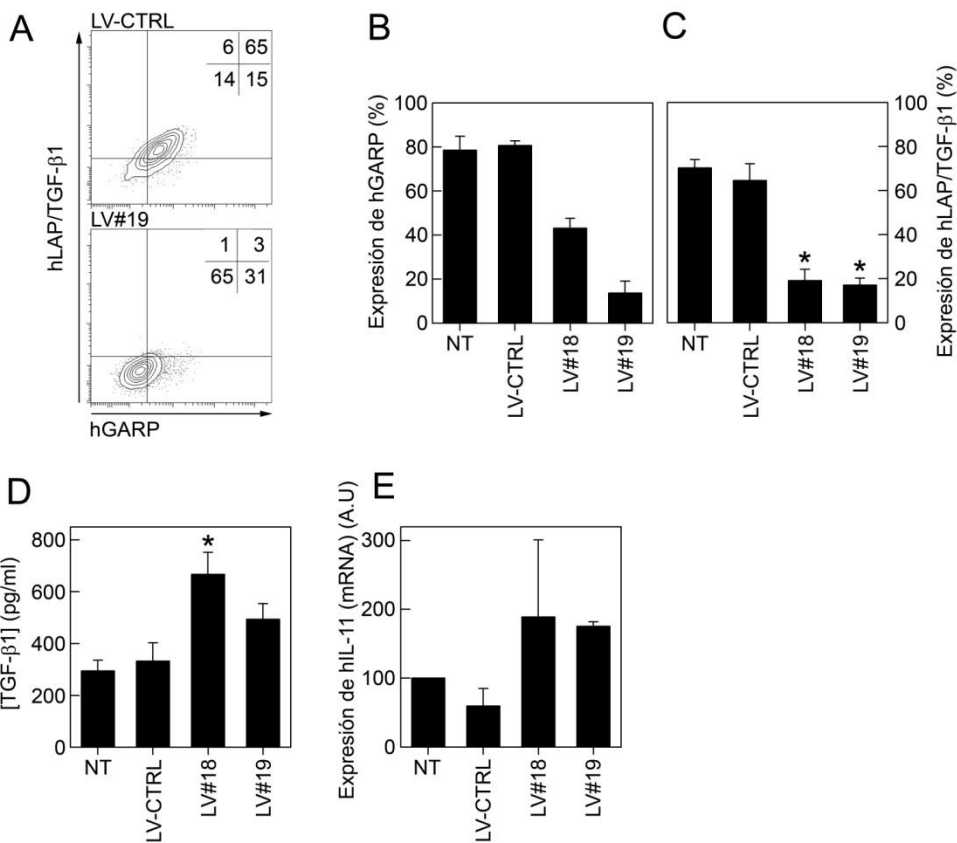


Figura 16: Expresión de GARP en ASCs humanas. (A-C) El silenciamiento de GARP reduce los niveles de LAP/TGF-β1 en la superficie de las hASCs. Se transdujeron hASCs con vectores lentivirales que codifican un shRNA inespecífico (LV-CTRL) o shRNAs específicos para GARP (LV#18 y LV#19). El número de copias de vector utilizado fue de 1-2 por célula. (A) Gráficas representativas de la co-tinción de GARP y LAP/TGF-β1 en hASCs LV-CTRL (arriba) y LV#19 (abajo). (B, C) Cuantificación de los niveles de expresión de GARP (B) y LAP/TGF-β1 (C) en hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19. Los resultados se muestran como la media (SEM) de 3 experimentos independientes. *= $p < 0,5$ vs LV-CTRL. (D, E) El silenciamiento de GARP aumenta los niveles de TGF-β1 en el medio de cultivo y la expresión del mRNA de IL-11. Se cultivaron hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 durante 3 días y se midieron los niveles de TGF-β1 de los sobrenadantes activados por ácido por ELISA (D) y se analizó la expresión de IL-11 por RTqPCR (E). Los resultados se muestran como la media (SEM) de cuatro experimentos independientes. *= $p < 0,5$ vs LV-CTRL.

5.2.5. Efecto del TGF- β 1 de membrana (mbTGF- β 1) en la capacidad inmunomoduladora de las mASCs

Se sabe que el TGF- β de membrana (mbTGF- β) participa en la supresión de la respuesta de las células T, inducción de células T reguladoras y anergia en células NK (228,230,258). Así, nos propusimos evaluar el posible papel de mbTGF- β 1/GARP en la inmunomodulación mediada por MSCs. Encontramos que el silenciamiento de GARP redujo significativamente la capacidad de las mASCs para inhibir la proliferación de las células T *in vitro* (Figura 17A y 17B). También medimos los niveles de NO₂ en los sobrenadantes de estos cocultivos y encontramos que fueron significativamente menores en los cocultivos de esplenocitos con mASCs LV#6 en comparación con los cocultivos de células NT y LV-CTRL con esplenocitos (Figura 17C). En un estudio publicado por Ostroukhova y colaboradores se demostró que mbTGF- β 1 era capaz de inducir la señalización Notch-HES1 en células T respondedoras (168). Sin embargo, la expresión de HES1 no se indujo en células T tras su Cocultivo con mASCs y no pudimos detectar ninguna diferencia en la expresión de HES1 en células T cultivadas con mASCs GARP⁻ o GARP⁺. Además, la adición del componente E (CpE), un inhibidor de la señalización por Notch, a los cocultivos no afectó a la supresión mediada por mASCs. Estos datos sugieren que las mASCs no son capaces de suprimir la respuesta de las células T a través de la ruta Notch1 (Figura 17D y Figura 17E). Estos datos sugieren que GARP es, en parte, necesario para suprimir la respuesta de las células T pero que en este proceso no está involucrada la ruta de Notch.

Sabiendo que las MSCs también pueden inhibir la función de las células NK, analizamos si la expresión de mbTGF- β 1 en mASCs podía jugar algún papel en el control de la activación de las células NK. En contraste con el efecto de la expresión de GARP en la supresión de células T mediada por MSCs, encontramos que las mASCs GARP⁻ eran igual de eficientes inhibiendo la activación de las células NK que las GARP⁺ basándonos en el aumento de expresión del receptor de activación de las células NK (NKG2D) *in vitro* (Figura 17F).

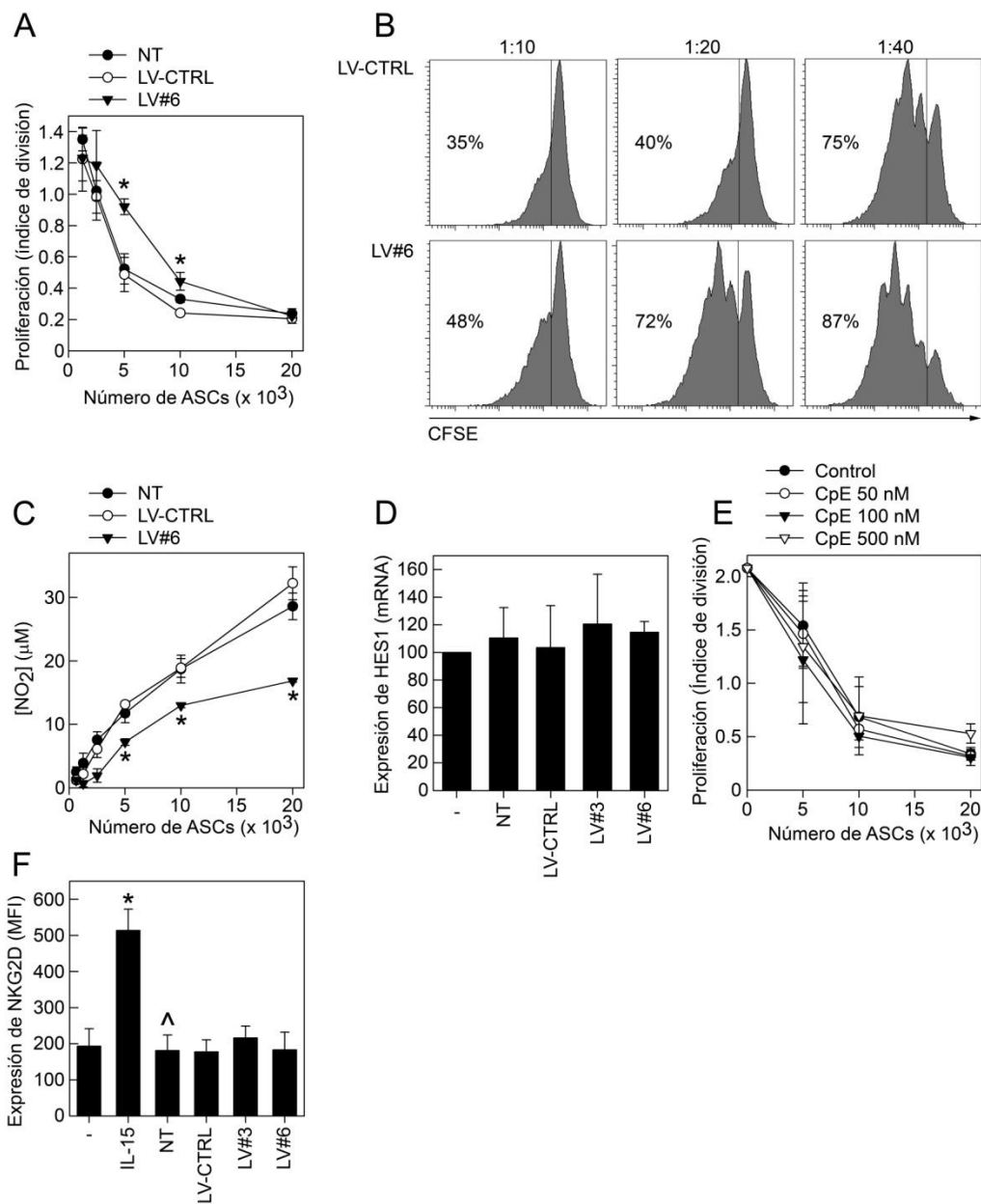


Figura 17: Papel de GARP en la inmunomodulación mediada por ASCs. Se trataron mASCs NT, LV-CTRL y LV#6 con mitomicina C y se sembraron diferentes números en placas de 96 pocillos. Paralelamente se marcaron esplenocitos de ratones Balb/c con CFSE, se añadieron (200.000 células/pocillo) sobre los cultivos de ASCs y se activaron utilizando anti-CD3 (1mg/ml). Después de 72 horas, las células se levantaron y se

analizó la dilución de CFSE en células T CD4⁺ por citometría de flujo utilizando el software FlowJo. Los resultados se muestran como (A) índice de división celular y (B) histogramas representativos de la dilución de CFSE en células T CD4⁺. * $p < 0,5$ vs LV-CTRL. (C) El silenciamiento de GARP reduce los niveles de NO₂ de las mASCs. Se analizó el contenido de NO₂ en sobrenadantes de co-cultivos de ASCs y esplenocitos utilizando el ensayo de Griess. Los resultados se muestran como la media (SEM) de 3 experimentos independientes. * $p < 0,5$ vs LV-CTRL. (D) El silenciamiento de GARP no afecta los niveles de HES1. Se cultivaron esplenocitos solos o con mASCs (NT, LV-CTRL, LV#3 y LV#6) tratadas con mitomicina C durante 24 horas en presencia de anti-CD3 (1mg/ml). Seguidamente se midió la expresión de HES1 en los esplenocitos por RTqPCR. (E) La inhibición de la respuesta de las células T por parte de las mASCs no está mediada por la ruta de Notch. Se co-cultivaron diferentes números de mASCs tratadas con mitomicina C con esplenocitos marcados con CFSE en presencia o ausencia de varias concentraciones de Componente E (CpE), un inhibidor de la ruta Notch. Después de 72 horas, se analizó la dilución de CFSE de las células T CD4⁺ por citometría de flujo utilizando el software FlowJo. (F) El silenciamiento de GARP no afecta la capacidad de las mASCs para inhibir la actividad de las células NK. Se trataron mASCs NT, LV-CTRL, LV#3 y LV#6 con mitomicina C y se sembraron en placas de 24 pocillos (60.000 células/pocillo) junto pocillos controles sin tratar. Posteriormente se añadieron sobre los diferentes pocillos células Natural Killer (NKs) que se dejaron intactas (-) o se activaron utilizando IL-15 durante 5 días. Se analizó la expresión de NKG2D en células NK CD49⁺ por citometría de flujo. Los resultados se muestran como la media (SEM) de 3 experimentos independientes. * $p < 0,5$ vs células NK solas. $\wedge p < 0,5$ vs células NK solas estimuladas con IL-15.

5.3. OBJETIVO 3: Estudiar en profundidad las implicaciones de GARP sobre la regulación de la proliferación de las MSCs.

5.3.1 El silenciamiento de GARP reduce la proliferación de las MSCs

En estudios recientes se ha mostrado que GARP influye en la proliferación de las células T y en líneas celulares con expresión ectópica de GARP (224,259). Por tanto, nos propusimos analizar en detalle el efecto de la presencia o ausencia de GARP en la proliferación de las ASCs de ratón *in vitro*. Mientras la proliferación de las ASCs transducidas con el vector lentiviral LV-CTRL fue similar a las células NT, las mASCs transducidas con los vectores LV#3 o LV#6 redujeron significativamente su capacidad de proliferación (Figura 18A y Figura 18B). Como se sabe que TGF- β 1 es capaz de modular la proliferación de las MSCs, investigamos si el incremento en la producción de TGF- β 1 activo por parte de las mASCs GARP⁻ podría ser el responsable de la disminución en la

proliferación. Sin embargo, la adición de un anticuerpo neutralizante de TGF- β 1/2/3 o de un inhibidor de TGF- β (SB431542) 4 días después del silenciamiento, no solo no promovió sino que fue capaz de inhibir la proliferación de las mASCs de manera general (Figura 18C y Figura 18D). Estos datos sugerían que el incremento en la activación de TGF- β 1 al silenciar GARP en mASCs, parecía no ser el responsable de la inhibición en la proliferación de estas células. Sin embargo, esto parece no ser así puesto que, tal y como pudimos observar más adelante en ASCs humanas (ver apartado 5.3.6), parece que en estos experimentos estábamos añadiendo los inhibidores y el anticuerpo demasiado tarde para poder revertir el bloqueo en proliferación.

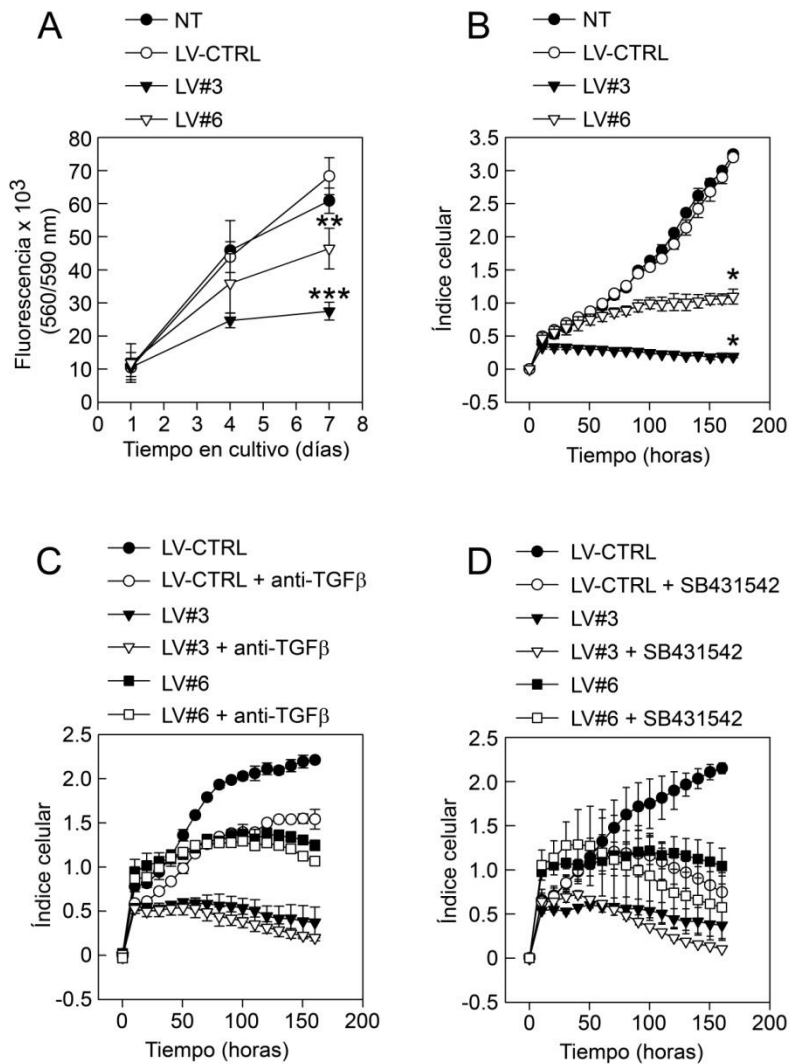


Figura 18: El silenciamiento de GARP afecta a la proliferación de las mASCs. (A, B) Se añadieron 800 mASCs (1000 células/pocillo) NT (círculos negros), LV-CTRL (círculos blancos), LV#3 (triángulos negros) y LV#6 (triángulos blancos) a (A) placas de 96 pocillos y tras 1, 4 y 7 días se añadió el reactivo CellTiter-Blue sobre los cultivos y se midió la fluorescencia a 560 nm o (B) a placas de 16 pocillos (E-plates) y se midió la proliferación utilizando el sistema analizador de células en tiempo real xCelligence. Los resultados se muestran como la media (SEM) de 3 experimentos independientes. *= $p < 0,5$ vs LV-CTRL. **= $p < 0,1$ vs LV-CTRL. ***= $p < 0,01$ vs LV-CTRL. (C, D) Se evaluó la proliferación de mASCs LV-CTRL, LV#3 y LV#6 con (círculos, triángulos y cuadrados blancos, respectivamente) o sin (círculos, triángulos y cuadrados negros, respectivamente) el anticuerpo anti-

TGF- β 1/2/3 (C) y SB431542 (D) añadidos 4 días después del silenciamiento utilizando el sistema xCelligence. Los resultados se presentan como la media (SEM) de dos experimentos independientes.

Dado que el efecto observado en proliferación era muy dramático y esto podía ser de especial importancia para la biología de las MSCs, procedimos a investigar si estos resultados se podían extender a MSCs humanas derivadas de tejido adiposo y de otros tejidos como médula ósea (BM), colon y gelatina de Wharton (WJ). Para ello, primero comprobamos que GARP se expresaba en la superficie así como intracelularmente en los 4 tipos celulares (Figuras 19A - Figura 19C).

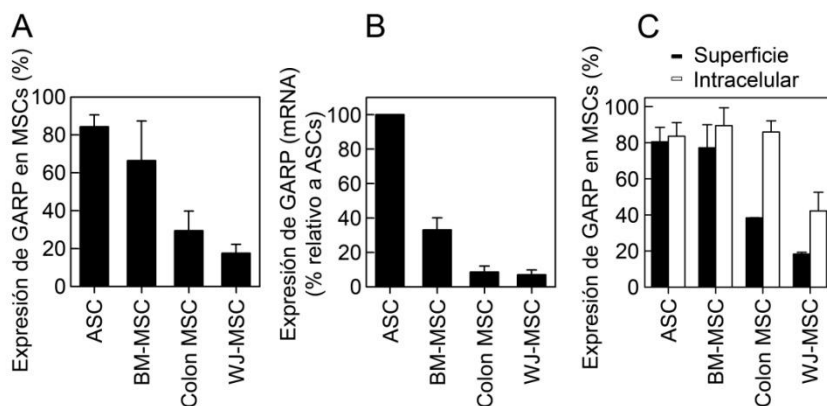


Figura 19: Expresión de GARP en superficie e intracelularmente en MSCs humanas derivadas de varios tejidos. (A) Frecuencia de células GARP⁺ en MSCs de diferente origen (tejido adiposo (ASC), médula ósea (BM-MSC), colon (colon-MSC) y gelatina de Wharton (WJ-MSC)) analizada por citometría de flujo. La expresión es relativa a la tinción con control de isotipo. Los datos muestran la media (SD) de 4 experimentos independientes. (B) Expresión relativa (frente a hASCs) de mRNA de GARP en MSCs de diferente origen. Los datos muestran la media (SD) de 2 experimentos independientes. (C) Tinción en superficie (barras negras) e intracelular (barras blancas) de GARP en MSCs de diferente origen. Se muestra la media (SD) de 2 experimentos independientes.

Una vez comprobamos que todas las MSCs analizadas expresaban GARP, aunque a diferentes niveles, procedimos a determinar si el silenciamiento de GARP en las diferentes MSCs también bloqueaba su capacidad de proliferación *in vitro*. Efectivamente, tal y como habíamos observado previamente en ASCs de ratón, el silenciamiento de GARP

en hMSC derivadas de tejido adiposo, de médula ósea y de gelatina de Wharton disminuyó su capacidad proliferativa (Figura 20A). Para un análisis más en profundidad de estos efectos en proliferación, nos centramos en las hMSCs derivadas de tejido adiposo debido a que presentan los mayores niveles de expresión de GARP y a su relevancia en clínica. Primero, comprobamos que los niveles de silenciamiento de GARP en estas células se correlacionaban con el grado de inhibición de la proliferación (Figura 20B). También estudiamos la proliferación de estas células mediante un ensayo de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) y observamos un menor número de células en fase S del ciclo celular (células BrdU⁺) tras el silenciamiento de GARP, lo cual confirma el resultado obtenido en el Xcelligence (Figura 20C). También pudimos observar mayores niveles de apoptosis en las hASCs GARP⁻ (#LV18 y LV#19) en comparación con las células GARP⁺ (NT y LV-CTRL) tanto 5 como 11 días después del silenciamiento (Figura 20D).

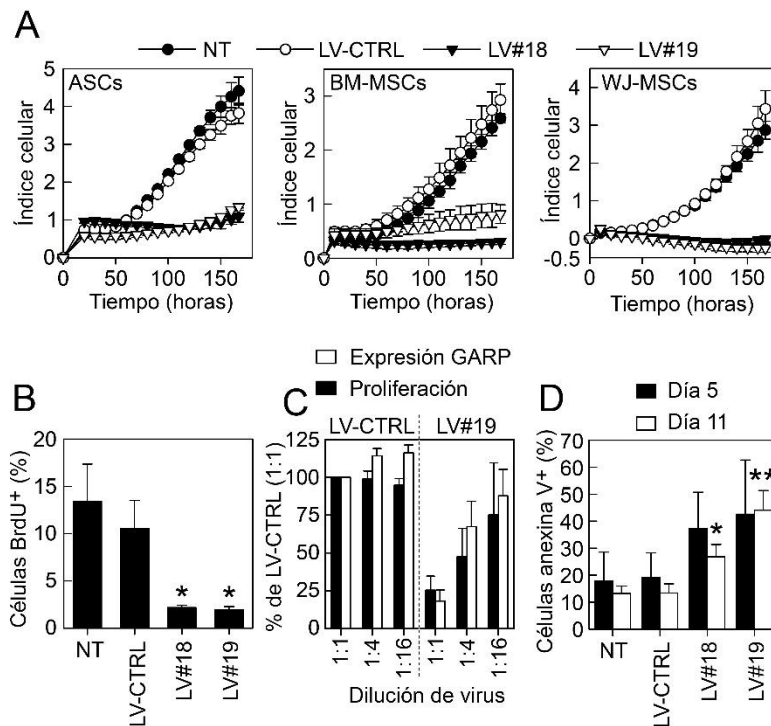


Figura 20: El silenciamiento de GARP inhibe la expansión de las hMSCs *in vitro* e induce apoptosis. (A) Plots obtenidos mediante xCelligence mostrando el bloqueo producido por el silenciamiento de GARP en diferentes MSCs. Se transdujeron hMSCs de distintas fuentes (hASCs, hBM-MSCs y hWJ-MSCs) con dos vectores lentivirales que codifican shRNAs específicos para GARP (LV#18 y LV#19). Como controles se usaron células sin transducir (NT) y transducidas con un vector lentiviral que codifica un shRNA inespecífico (LV-CTRL). Se analizó la proliferación de estas células utilizando el xCelligence. La proliferación se representa por el índice celular y los se muestra un experimento representativo de al menos tres. (B) Grafica mostrando los niveles de incorporación de BrdU en hASC tras silenciamiento de GARP. Se añadió BrdU durante 3 horas sobre hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19) y seguidamente se tiñeron para analizar la incorporación de BrdU por citometría de flujo. Los datos muestran la media (SD) de 3 experimentos independientes. $*=p<0,05$ vs LV-CTRL (C) El grado de bloqueo en proliferación es proporcional al grado de silenciamiento de GARP. Se transdujeron hASCs con diluciones crecientes de LV-CTRL y LV#19. La expresión de GARP (barras blancas) se analizó por citometría de flujo y se normalizó con las ASCs transducidas con el LV-CTRL (1:1). La proliferación (barras negras) se analizó utilizando el xCelligence. La proliferación se representa como el índice celular a las 160 horas y normalizada con las ASCs transducidas con el LV-CTRL (1:1). Los resultados se muestran como la media (SD) de dos experimentos independientes. (D) El silenciamiento de GARP induce apoptosis en hASCs. Se analizó la apoptosis de las hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19) mediante su tinción con anexina V, 5 días (barras negras) y 11 días (barras blancas) después de la transducción y su adquisición por el citómetro de flujo. Los datos muestran la media (SD) de cuatro experimentos independientes. $*=p<0,05$ vs LV-CTRL día 5. $^{\wedge}=p<0,05$ vs LV-CTRL día 11. $^{\wedge\wedge}=p<0,01$ vs LV-CTRL día 11.

Con la finalidad de demostrar que el bloqueo en proliferación era exclusivamente debido a la ausencia de GARP y no a efectos secundarios de la transducción con vectores lentivirales y/o shRNAs, procedimos a sobreexpresar GARP en células silenciadas y a estudiar si eramos capaces de rescatar su capacidad de proliferación. Para ello, transdujimos simultáneamente con el vector LV#19 y con un vector que codifica GARP, pero optimizado para el uso de codones en células humanas (LV-GARP). Una fracción sustancial de las células silenciadas (LV#19) que fueron transducidas con LV-GARP, expresó altos niveles de GARP a pesar de la co-expresión de shRNAs específicos para GARP (Figura 21A). Es probable que esto se deba al desajuste de 3 nucleótidos (en posición 1 y 10-11) entre el mRNA del shRNA y su diana en GARP optimizado. Como se podía esperar, si el bloque en proliferación era debido a la ausencia de GARP, la sobreexpresión de GARP

en las hASCs silenciadas recuperó significativamente la proliferación de estas células y previno su muerte por apoptosis (Figura 21B y Figura 21C, respectivamente).

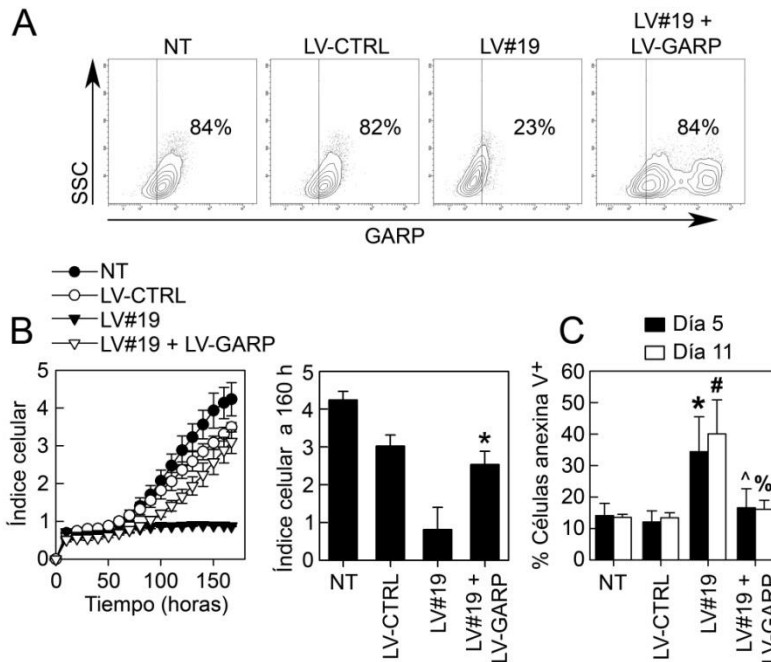


Figura 21: La sobreexpresión de GARP en hASCs transducidas con LV#19 rescata su bloqueo en proliferación y previene la apoptosis. (A) Sobreexpresión de GARP en hASCs silenciadas. Se transdujeron hASCs con LV-CTRL, LV#19 y LV#19 en combinación con LV-GARP y 4 días después se analizaron los niveles de expresión en superficie de GARP por citometría de flujo 4 días después de la transducción. Los porcentajes representan células expresando GARP en relación con el control de isotipo. Se muestra un experimento representativo de al menos cuatro. (B) La sobreexpresión de GARP recupera la proliferación de las hASCs silenciadas. Se analizó la capacidad de proliferación de las hASCs NT, LV-CTRL, LV#19 y LV#19+LV-GARP utilizando el xCelligence y se representó como índice celular a diferentes tiempos (panel izquierdo) o mediante una gráfica donde se compara el índice celular de las diferentes hASCs a las 160 horas (panel derecho). Los resultados muestran la media (SD) de 4 experimentos independientes. $*=p<0,05$ vs LV#19. (C) La sobreexpresión de GARP reduce la inducción de apoptosis de las hASCs silenciadas. Se analizó el porcentaje de hASCs (NT, LV-CTRL, LV#19 y LV#19+LV-GARP) apoptóticas (Anexina V⁺) 5 días (barras negras) y 11 días (barras blancas) después de la transducción por citometría de flujo. Los resultados muestran la media (SD) de 4 experimentos independientes. $*=p<0,05$ vs LV-CTRL día 5. $^{\wedge}=p<0,05$ vs LV#19. $\# =p<0,05$ vs LV-CTRL día 11. $\% =p<0,05$ vs LV#19 día 11.

5.3.2. El silenciamiento de GARP afecta el programa transcripcional de las hASCs, modulando genes involucrados en supervivencia y regulación del ciclo celular

Para analizar el impacto de GARP en el programa transcripcional de las MSCs e identificar mecanismos potenciales que pudieran explicar el fenotipo observado, llevamos a cabo un análisis de microarray en hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19. Para el microarray, utilizamos hASCs de 3 donantes no relacionados y llevamos a cabo el silenciamiento utilizando 3 producciones diferentes de vectores lentivirales. El mRNA se aisló 6 días después de la transducción, un punto de tiempo en el que el bloqueo en proliferación de las hASCs GARP⁻ era evidente (ver Figura 20A y Figura 20B). Para asegurarnos de que los niveles de shRNA expresados por las células transducidas con los shRNA inespecíficos (LV-CTRL) y específicos para GARP (LV#18 y LV#19) eran similares, cuantificamos sus cantidades relativas por qPCR y encontramos niveles parecidos de shRNAs entre las células transducidas (Figura 22A y Figura 22B).

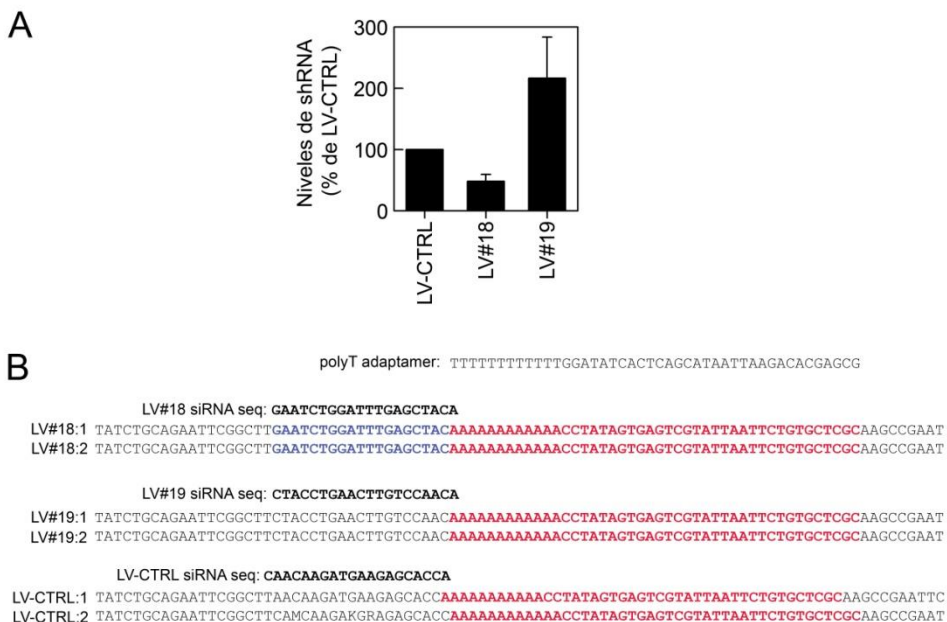


Figura 22: Las hASCs transducidas expresan niveles similares de transcritos de shRNAs inespecíficos y específicos para GARP: (A) El RNA total de NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 utilizado para el análisis de microarray (E19, E23 y E27) se poliadeniló y se reverso-transcribió utilizando un primer adaptador de poli (T)

como se describe en materiales y métodos. Se llevó a cabo una qPCR para los diferentes shRNAs utilizando primers con secuencia sentido específicos para cada shRNA (LV-CTRL FW, LV#18 FW y LV#19 FW) contra el primer anti-sentido universal y normalizando frente a U6. Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. (B) Los productos de PCR de la cuantificación de shRNAs fueron TA-clonados seguidamente y se eligieron 4 colonias por cada shRNA. Los plásmidos fueron purificados y se secuenciaron los insertos.

El dendrograma generado con los datos del microarray agrupó claramente a las células GARP⁺ (NT y LV-CTRL) juntas pero también destacó diferencias en el perfil genético entre hASCs LV#18 y LV#19, mostrando un número bajo de genes cuya expresión se ve alterada en las hASCs LV#18 y las LV#19 (170 genes inducidos y 299 inhibidos) en comparación con los genes alterados en LV#18 y LV#19 por separado. Esto podría deberse al menor grado de silenciamiento en las células transducidas con el vector LV#18 y a diferentes efectos de los shRNA actuando fuera de su diana (Figura 23A y Figura 23B).

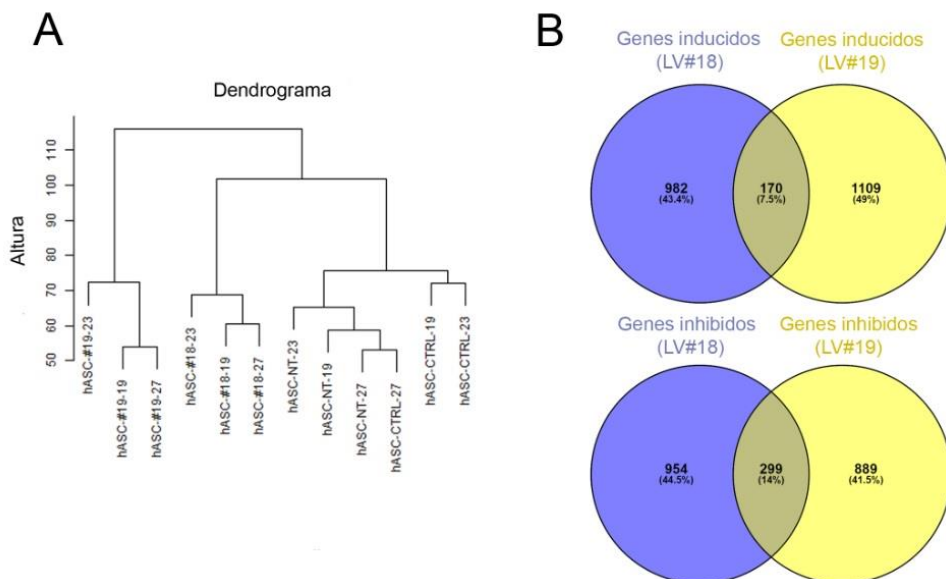


Figura 23: Dendrograma de grupo de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 y diagramas de Venn de las hASCs LV#18 y LV#19. (A) Análisis de agrupamiento de las muestras. (B) Diagramas de Venn mostrando el número de genes inducidos o inhibidos que comparten las hASCs GARP⁺ (LV#18 y LV#19).

Utilizando modelos lineales, identificamos genes expresados diferencialmente en hASCs LV#18 y LV#19 en comparación con hASCs NT y LV-CTRL y obtuvimos una lista de 378 genes que se encontraban activados y 556 reprimidos en las células GARP⁻ en comparación con las GARP⁺.

Como se podía esperar por el bloqueo en proliferación observado en las hASCs GARP⁻, el software IPA identificó varias biofunciones inhibidas en la categoría “Ciclo Celular” requeridas para la progresión del ciclo celular (Figura 24A) y varias biofunciones activadas relacionadas con apoptosis y muerte celular en la categoría “Muerte y Supervivencia celular” (Figura 24B). Curiosamente, se encontraron inhibidas varias biofunciones en la categoría “Replicación, Recombinación y Reparación de DNA” en las células GARP⁻ (Figura 24C).

Una vista detallada de los genes afectados en la biofunción Reparación de DNA muestra una inhibición de varios genes involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genómica (BRCA1, TOP2A, TYMS) y la reparación de roturas de DNA de cadena doble (DSBs) (Exo1, PCNA, BRCA1) (Figura 24D). La inhibición de esos genes podría llevar a un daño excesivo en el DNA y a un bloqueo en proliferación tras el silenciamiento de GARP.

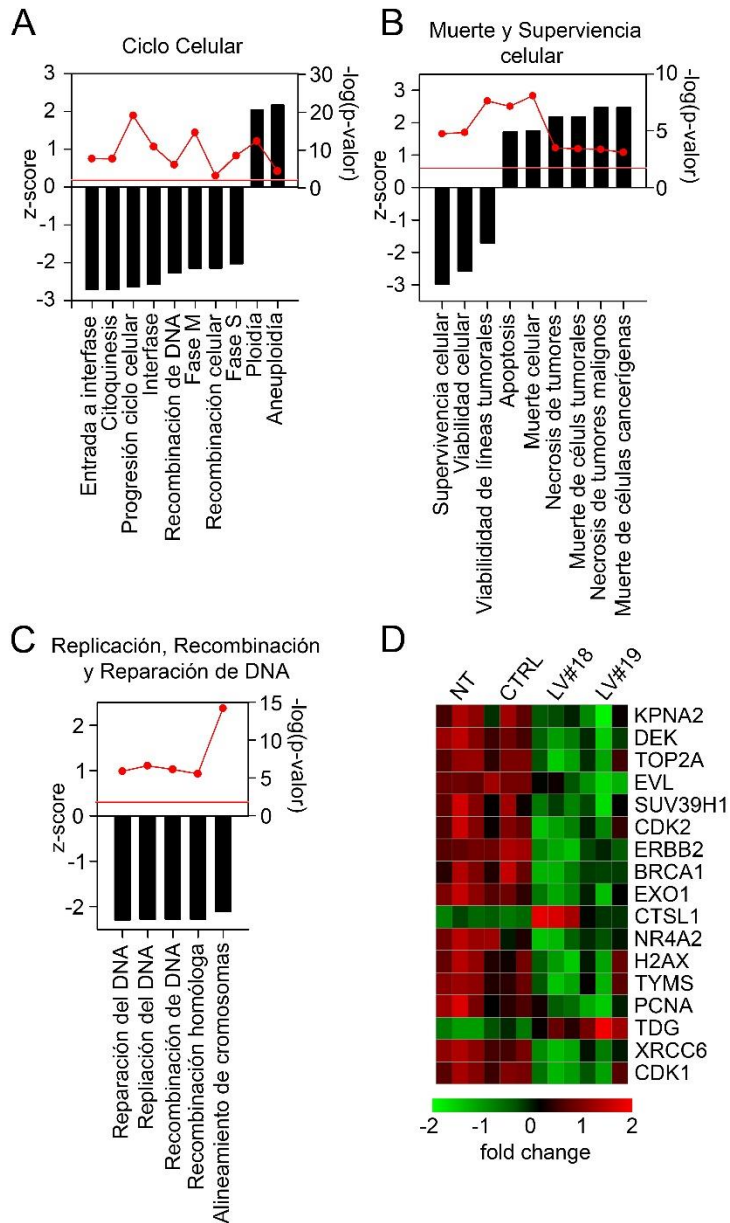


Figura 24: El silenciamiento de GARP afecta al programa transcripcional de las hASCs, modulando genes involucrados en regulación del ciclo celular, apoptosis y reparación de DNA. Se extrajo el RNA total de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 6 después de la transducción y se analizó la expresión de genes utilizando el chip HumanHT-12v4 Expression BeadChip. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de los genes modulados utilizando el software IPA (Ingenuity pathway analysis) y se observaron varias categorías biológicas y

biofunciones significativamente afectadas en las hASCs GARP⁻. Análisis más en profundidad de las categorías biológicas Ciclo Celular (A), Muerta y Supervivencia celular (B) y Replicación, Recombinación y Reparación de ADN (C), muestran las biofunciones más prominentes (barras negras) y su activación (z-score positivo) o inhibición (z-score negativo) predicha. Los círculos rojos muestran la significancia estadística de cada biofunción y la línea roja representa $p=0,01$. (D) Mapa de calor que muestra los principales genes donde se han producido cambios significativos (LV#18/LV#19 vs NT/LV-CTRL) en la biofunción “Replicación, Recombinación y Reparación de DNA”

Además, investigando los efectos del silenciamiento de GARP en la activación/inhibición de rutas canónicas en las hASCs, IPA destacó la activación de la ruta “Regulación del Punto de Control de daño en ADN en G2/M” (z-score = 2.0) y la inhibición de la ruta “Roles Mitóticos de las Quinasas tipo-Polo” (z-score = -2.84) (Figura 25A). La alteración en esas dos rutas sugiere un bloqueo en la fase G2/M del ciclo debido a daño en DNA o a defectos en la replicación en las células GARP⁻.

Finalmente, IPA también identificó a la proteína tumoral (TP) 53 como uno de los principales reguladores aguas arriba que se encuentra sobre-activado en las células GARP⁻ (Figura 25B). TP53 contribuye al mantenimiento del punto de control de G2/M a través de la regulación transcripcional de CD25C, ciclina B y CDK1 (260). Todos estos análisis sugieren que el silenciamiento de GARP podría tener como resultado un bloqueo en proliferación y daño en DNA en la fase G2/M del ciclo a través de la activación de p53.

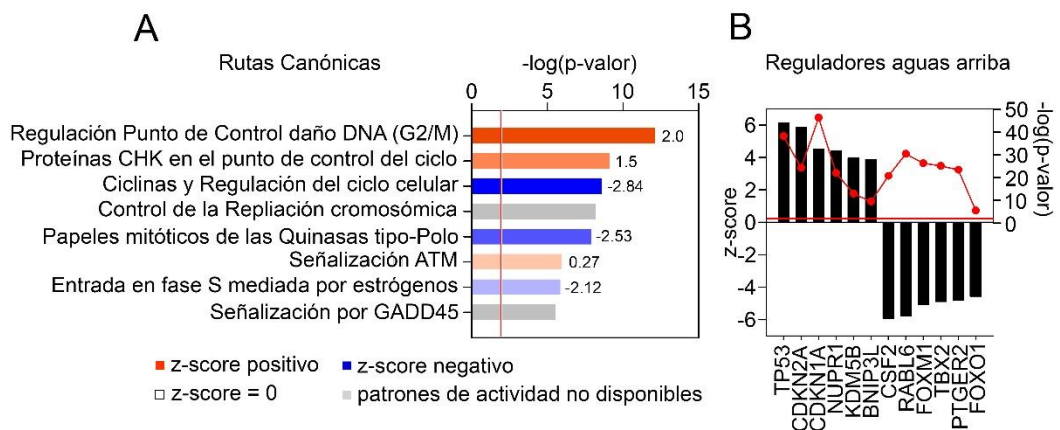


Figura 25: IPA revela un bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular: (A) Predicción de IPA de las vías canónicas activadas/inhibidas que se encontraban sobre-representadas en las hASCs GARP⁻ en comparación con las NT y las LV-CTRL. El color de las barras representa la activación (rojas) o inhibición (azules) predichas de acuerdo al valor de z-score. Las barras sin color muestran las vías con un z-score=0 y las barras grises muestran las vías donde no hay disponibles patrones de actividad. Los valores al lado de las barras representan el valor de z-score cuando está disponible. La línea roja muestra p=0,01. (B) Predicción de IPA de los reguladores aguas arriba activados (z-score positivo) o inhibidos (z-score negativo) responsables del perfil de expresión génica observado en las hASCs GARP⁻. Los círculos rojos muestran la significancia estadística de cada biofunción y la línea roja muestra un p=0,01.

5.3.3. Las hASC GARP⁻ se bloquean en la fase G2/M y exhiben una mayor sensibilidad al daño de ADN

Para verificar el bloqueo en G2/M que predijo el software IPA, analizamos la cinética del ciclo celular en hASC GARP⁻ utilizando BrdU y 7AAD (7-Aminoactinomicina D). Como el silenciamiento de GARP provoca una rápida inhibición de la proliferación, marcamos hASCs control (NT y LV-CTRL) y GARP⁻ (LV#18 y LV#19) con BrdU poco después del silenciamiento (24 horas) para aumentar los niveles de células marcadas con BrdU en nuestros análisis. Analizamos la distribución en el ciclo celular de las células marcadas 3 días después y encontramos que, como esperábamos por los análisis con IPA, hubo un mayor porcentaje de células BrdU⁺ en la fase G2/M en las células GARP⁻ en comparación las células NT y LV-CTRL (Figura 26A y Figura 26B).

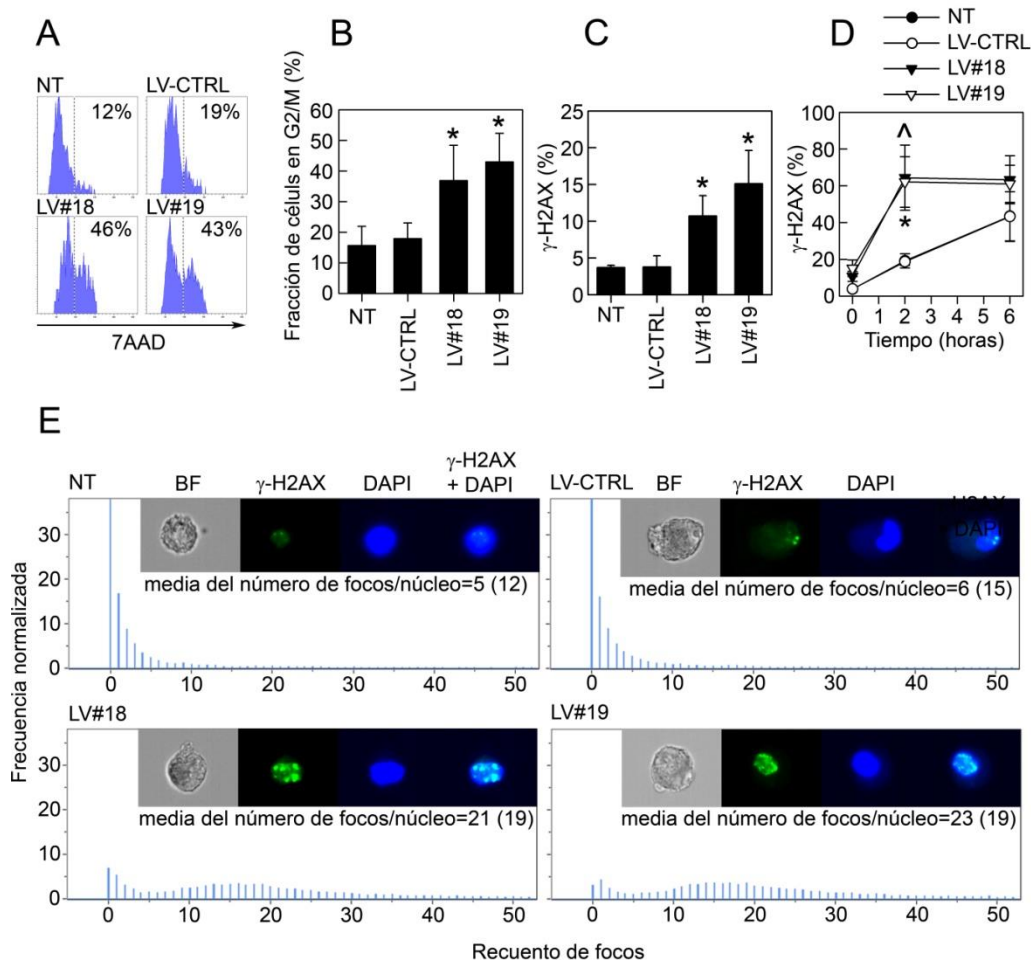


Figura 26: Las hASCs GARP⁻ se encuentran bloqueadas en la fase G2/M y exhiben un incremento en la sensibilidad al en ADN. (A, B) Análisis mediante citometría de flujo del efecto del silenciamiento de GARP en el ciclo celular. (A) Se transdujeron hASCs con LV-CTRL, LV#18 y LV#19 y al día siguiente se añadió BrdU durante 3 horas. Después de 3 días, las células se levantaron, se tiñeron para BrdU y 7AAD y se analizaron por citometría de flujo. Los histogramas muestran el porcentaje de células BrdU⁺ en las distintas fases del ciclo visualizadas con el 7AAD. Se muestra un experimento representativo. (B) Gráfica mostrando la fracción de células BrdU⁺ en la fase G2/M del ciclo celular. Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. (C) El silenciamiento de GARP produce un aumento de roturas de DNA de cadena doble. Se analizó la fosforilación de H2AX (γ -H2AX) en hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 por citometría de flujo 5 días después del silenciamiento de GARP. Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. *= $p < 0,05$ vs LV-CTRL. (D) El silenciamiento de GARP induce un aumento de la sensibilidad de

las hASCs frente al daño producido por etopósido. Se estimularon hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19) con etoposido (25 μ M) durante diferentes tiempos y posteriormente se tiñeron para γ -H2AX y se analizaron por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. *= p <0,05 vs LV-CTRL (2h). (E) Se tiñeron hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 para γ -H2AX, 5 días después del silenciamiento de GARP y se analizaron en el citómetro de flujo ImageStream X Mark II Imaging (Milipore). Se cuantificó el número de focos de γ -H2AX/núcleo utilizando el software IDEAS (Spot Wizard).

Como IPA también sugirió un papel de GARP en la reparación del ADN, nos propusimos estudiar el grado de daño en ADN en hASCs GARP⁻ y compararlo con las GARP⁺. H2AX es un factor clave en el proceso de reparación de daño en ADN y su forma fosforilada (γ -H2AX) sirve como un biomarcador de roturas de DNA de cadena doble (DSBs) (260). Estos datos sugieren que las células GARP⁻ son más susceptibles/propensas al daño en el ADN. Finalmente, cuantificamos el número de focos de γ -H2AX en el núcleo de hASCs GARP⁺ y GARP⁻ utilizando un citómetro de imagen para corroborar que los datos ofrecidos por citometría de flujo indicaban realmente la formación de focis de reparación y no era debido a una tinción difusa sin que se hayan formado verdaderos focis. Como podríamos esperar, observamos un aumento de 4 veces en el número de DSBs en las células silenciadas para GARP en comparación con las no silenciadas (Figura 26E).

5.3.4. Las hASC GARP- muestran mayores niveles de mtROS

Se sabe que las especies reactivas del oxígeno (ROS) son inductores de roturas tanto de una como de ambas cadenas de ADN (261) y de procesos apoptóticos (262,263). Basándonos en esos datos, nos propusimos analizar si el silenciamiento de GARP podría afectar los niveles de ROS utilizando DCFDA. Observamos niveles de ROS significativamente mayores en las hASCs GARP⁻ en comparación con las GARP⁺ (Figura 27A y Figura 27B). En MSCs, las ROS son producidas principalmente por los complejos mitocondriales I y III y, en menor medida, por la NADPH oxidasa (NOX) 4 (264). Encontramos que las hASCs GARP⁻ expresaban niveles significativamente mayores de ROS mitocondrial (mtROS) que las células NT y CTRL y que la adición de mitoTEMPO, un antioxidante dirigido a mitocondria, reducía los niveles de mtROS en las células

silenciadas para GARP, mostrándose de esta forma la especificidad de la tinción (Figura 27C y Figura 27D).

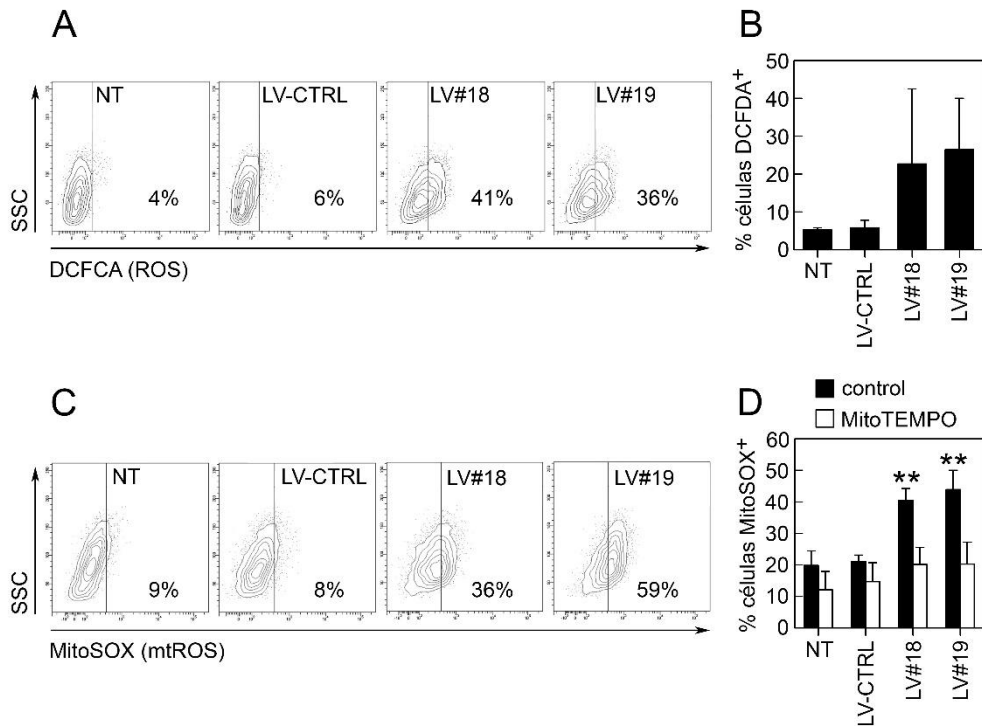


Figura 27: Las hASCs GARP⁻ muestran niveles más altos de mtROS: (A, B) El silenciamiento de GARP aumenta los niveles de ROS en las hASCs. Se incubaron hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19) con DCFDA (20µM) durante 30 minutos a 37°C y se analizaron por citometría de flujo. (A) Plots representativos del porcentaje de células DCFDA⁺ en relación con células no teñidas. (B) Gráfica mostrando el porcentaje de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 DCFDA⁺. Los datos muestran la media (SD) de 3 experimentos independientes. (C, D) El silenciamiento de GARP aumenta los niveles de ROS mitocondrial. Para medir ROS mitocondrial (mtROS) de hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19), se cultivaron estas células en presencia o ausencia de MitoTEMPO (25µM), se tiñeron con MitoSOX (20µM) y se analizaron por citometría de flujo. (C) Plots representativos del porcentaje de células MitoSOX⁺ en hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19) en relación con células no teñidas. (D) Gráfica mostrando el porcentaje de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 MitoSOX⁺ en presencia o ausencia de MitoTEMPO. Los datos muestran la media (SD) de 3 experimentos independientes. *= $p < 0,05$ vs LV-CTRL. ^= $p < 0,05$ vs LV#18. #= $p < 0,05$ vs LV#19.

5.3.5. La inhibición de mtROS reduce el número de DBS y revierte el bloqueo en proliferación de las hASCs GARP⁻

Lo siguiente que quisimos hacer fue analizar si el incremento en ROS observado en las células GARP⁻ juega un papel importante en el bloqueo en proliferación observado en las mismas. Para ello, añadimos N-acetil-cisteína (NAC), mitoTEMPO y apocinina (inhibidor de ROS) a las hASCs GARP⁻ y a las células control un día después del silenciamiento y seguimos su proliferación.

Encontramos que tanto NAC (Figura 28A y Figura 28B) como mitoTEMPO, pero no la apocinina, aumentaban significativamente la proliferación de las hASCs GARP⁻ (Figura 28C y Figura 28D). Seguidamente, analizamos si la inhibición de los mtROS tenía algún efecto en los altos niveles de DSBs observados en las células GARP⁻. Como se puede observar en la figura 28E, la adición de mitoTEMPO reduce los niveles de γ -H2AX en estas células. En resumen, estos datos sugieren que la pérdida de GARP tiene como resultado un incremento en los niveles de mtROS que causa daño en el ADN, lo que resulta en una inhibición de la proliferación celular.

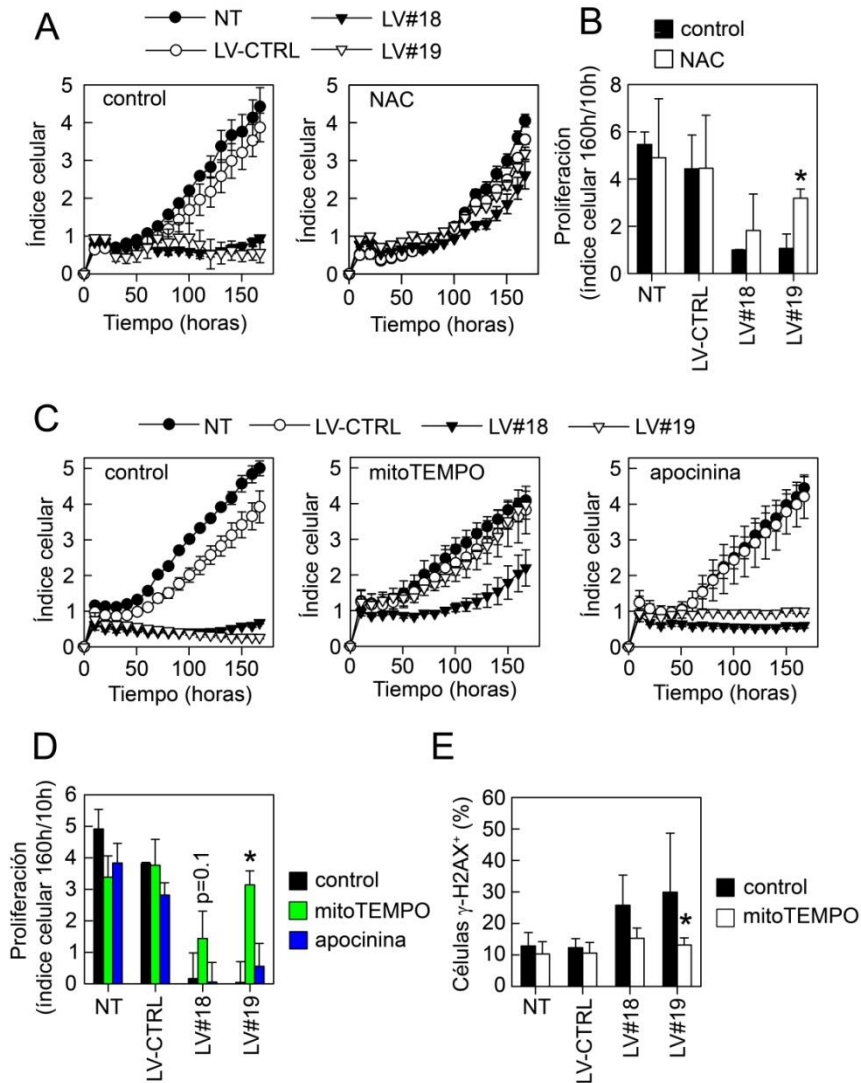


Figura 28: La inhibición de mtROS reduce las DBS y revierte el bloqueo en proliferación de las hASCs GARP⁺:

(A, B) Las hASCs GARP⁺ recuperan la capacidad de proliferar tras la inhibición de ROS. Se cultivaron hASCs (NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19) en presencia o ausencia de 1mM de NAC y se analizó la proliferación utilizando el xCelligence. (A) Gráficas representativas mostrando la proliferación de las hASCs cultivadas sin (gráfica izquierda) o con (gráfica derecha) NAC. Se muestra un experimento de 3 replicas independientes. (B) Gráficas mostrando la proliferación relativa de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 cultivadas sin (barras negras) o con (barras blancas) NAC. La proliferación se calculó como el índice celular a las 160h dividido por el índice celular

a las 10 horas. Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. $*=p<0,05$ vs LV#19 control. (C) La inhibición de ROS mitocondrial (mtROS) revierte el bloqueo en proliferación de las hASCs GARP⁺. Se cultivaron hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 sin nada (control), con MitoTEMPO o apocinina y se analizó su proliferación utilizando el xCelligence. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes. (D) Gráficas mostrando la proliferación relativa de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 cultivadas sin nada (barras negras), con MitoTEMPO (barras verdes) o con apocinina (barras azules). La proliferación se calculó como el índice celular a las 160h dividido por el índice celular a las 10 horas. Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. $*=p<0,05$ vs LV#19 control. (E) La inhibición de mtROS reduce los niveles de DSBs en hASCs GARP⁺. Se cultivaron hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 sin (control, barras negras) o con MitoTEMPO (barras blancas) y se analizaron los niveles de γ -H2AX por citometría de flujo, 4 días después de la transducción. Los datos se muestran como la media (SD) de 4 experimentos independientes. $*=p<0,05$ vs LV#19 control.

5.3.6. La inhibición de la señalización de TGF- β en hASCs GARP⁺, reduce los niveles de ROS, de daño en ADN y revierte parcialmente el bloqueo en proliferación

Previamente hemos mostrado que el silenciamiento de GARP en ASCs de ratón y humanas aumenta su secreción y activación de TGF- β 1. Estudios recientes han demostrado que TGF- β 1 puede inducir la producción de mtROS en MSCs. Esta inducción tiene efectos en la proliferación y supervivencia de estas células (265,266). Por tanto, nos propusimos analizar el papel de TGF- β 1 en la proliferación de las hASCs GARP⁺. Como hemos mostrado anteriormente, la adición de un inhibidor de la señalización de TGF- β (SB431542) a las células GARP⁺ 4 días después del silenciamiento, no tuvo ningún efecto sobre su capacidad de proliferación, sin embargo, la adición de este inhibidor un día después del silenciamiento reduce los niveles de mtROS (Figura 29A), la fosforilación de H2AX (Figura 29B) y también produce un aumento significativo de la capacidad de proliferación de estas células (Figura 29C y Figura 29D). Estos datos sugieren que, en ausencia de GARP, TGF- β 1 produce un rápido aumento de los niveles de mtROS, lo que induce DSBs y un bloqueo de la proliferación.

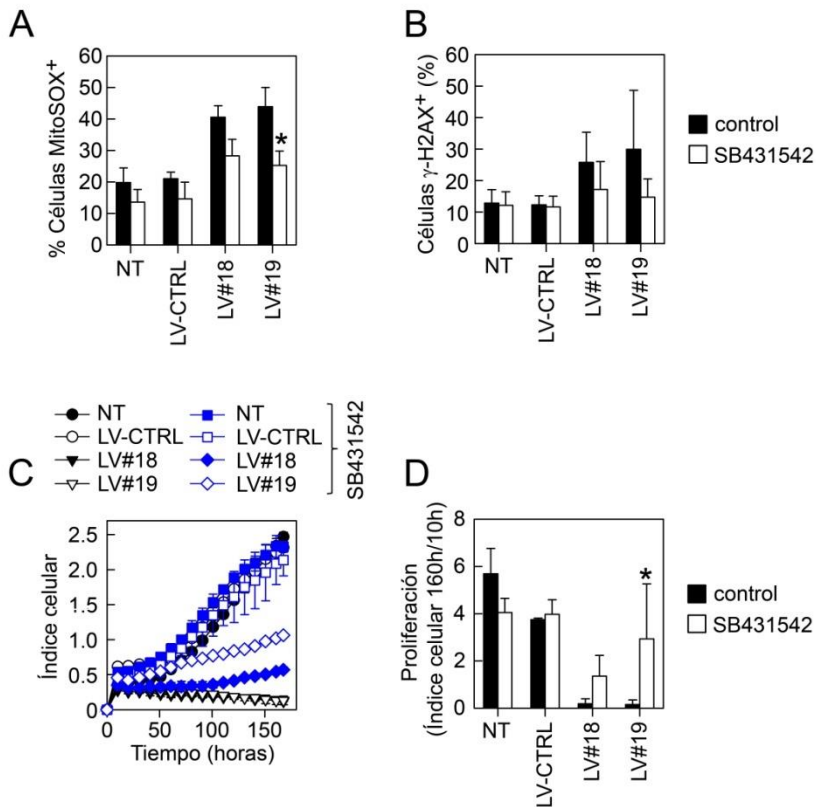


Figura 29: La inhibición de la señalización por TGF- β en hASCs GARP⁻ reduce ROS, daño en ADN y revierte parcialmente el bloqueo en proliferación: (A, B) Gráficas mostrando el porcentaje de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 positivas para mtROS (MitoSOX⁺) (A) y γ -H2AX (B) en ausencia (barras negras) y presencia de SB431542 (barras blancas). Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. *=p<0,05 vs LV#19 control. (C) Gráfico representativo de la proliferación (xCelligence) de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 cultivadas sin (símbolos negros) o con (símbolos azules) SB431542. (D) Proliferación de hASCs NT, LV-CTRL, LV#18 y LV#19 cultivadas sin (barras negras) o con SB431542 (barras blancas). La proliferación se calculó como el índice celular a las 160h dividido por el índice celular a las 10 horas. Los datos se muestran como la media (SD) de 3 experimentos independientes. *=p<0,05 vs LV#19 control.

5.3.7. La sobreexpresión de GARP en hASCs resulta en una ventaja selectiva de crecimiento en cultivos a largo plazo y aumenta la resistencia a la apoptosis

Como el silenciamiento de GARP producía un incremento de apoptosis y una parada de la proliferación, nos preguntamos si la sobreexpresión de GARP tendría el efecto contrario, y podría mejorar la supervivencia y el crecimiento de las hASCs. Para ello, llevamos a cabo

la transducción de hASCs con el vector lentiviral LV-GARP, obteniendo en torno a un 25-30% de células sobreexpresando GARP. La sobreexpresión de GARP no produjo un incremento en la capacidad de adhesión de estas células en comparación con las NT (Figura 30A). Sin embargo, observamos que la proporción de células que sobreexpresan GARP aumentaba en cultivo con el paso del tiempo, mientras que no ocurría lo mismo con la proporción de células expresando GFP o dsRED que utilizamos como controles, lo que sugiere un ventaja selectiva de estas células sobre las células no transducidas (Figura 30B).

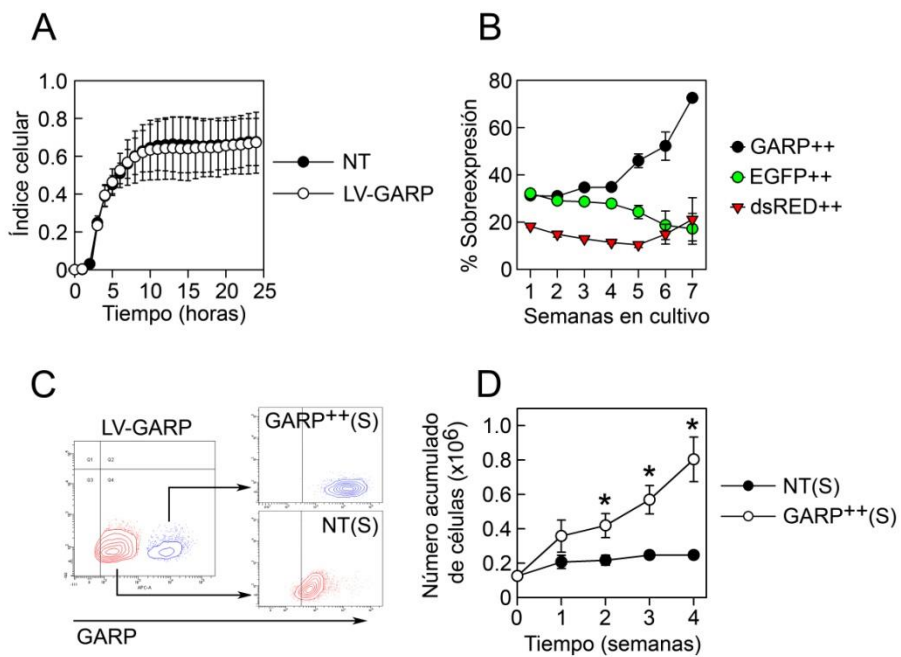


Figura 30: Las hASCs que sobreexpresan GARP muestran una ventaja selectiva de crecimiento: (A) La sobreexpresión de GARP no afecta la capacidad de adhesión de las hASCs. Se analizó la adhesión celular de hASCs sin transducir (NT) o transducidas con LV-GARP utilizando el xCelligence. Los datos muestran la media (SD) de 3 experimentos independientes. (B) El porcentaje de células sobreexpresando GARP se incrementa durante el proceso de expansión. Se transdujeron hASCs con LV-GARP, LV-GFP y LV-dsRED. Se siguió el porcentaje de población de hASCs que sobreexpresa GARP, GFP y dsRED durante el tiempo por citometría de flujo. Los datos muestran la media de 3 réplicas experimentales. (C, D) Células purificadas sobreexpresando GARP proliferan mejor que las hASCs controles. (C) Partiendo de hASCs transducidas con LV-GARP (plot izquierdo), se aislaron hASCs que sobreexpresan GARP (GARP⁺⁺(S), gráfico de arriba a la derecha) y hASCs NT

(NT(S) gráfico de abajo a la derecha) y (D) se analizó su proliferación por contaje celular. Los datos muestran la media (SD) de 3 réplicas experimentales. $*=p<0,05$ vs NT (S) en cada punto de tiempo

Por otro lado, al separar las células NT (NT(S)) de las que sobreexpresan GARP (GARP⁺⁺(S)) (Figura 30C) y seguir su crecimiento *in vitro* durante varias semanas, encontramos que las células GARP⁺⁺(S) tenían una mayor capacidad de proliferación en comparación con las NT(S) (Figura 30D). Esto indica que la sobreexpresión de GARP está teniendo un efecto positivo en la capacidad de expansión de las hASCs.

A continuación analizamos si la sobreexpresión de GARP podía hacer a las hASCs más resistentes a apoptosis bajo diferentes condiciones. En primer lugar analizamos los niveles de apoptosis en cultivo sin ningún otro tratamiento. Efectivamente, detectamos menos hASCs LV-GARP entrando en apoptosis en comparación con las hASCs NT, tanto a día 5 como a día 11 tras la transducción (Figura 31A). Seguidamente, quisimos comprobar si estas células eran más resistentes a la muerte celular inducida por daño en ADN. Para ello, utilizamos tricostatina A (TSA) que es capaz de inducir muerte celular debido parcialmente a la inducción de daño en ADN (267). Encontramos que las hASCs LV-GARP (Figura 31B) o las hASCs GARP⁺⁺(S) (Figura 31C) eran significativamente más resistentes a la apoptosis inducida por TSA que las hASCs NT. Por el contrario, las hASCs expresando GFP no solo no se mostraron más resistentes a la apoptosis sino que se mostraron más sensibles (Figura 31D). Finalmente, dado que las hASCs GARP⁻ exhibían mayores niveles de daño en DNA (medido por γ -H2AX), también quisimos comprobar si al igual que con la apoptosis, este efecto se revertía en las células GARP⁺⁺. Pudimos comprobar que, en efecto, las hASCs GARP⁺⁺ mostraban niveles menores de daño en DNA que las células NT (Figura 31E). Para descartar que las diferencias observadas en el daño en DNA se debieran a diferencias en la captación del etopósido por las células, decidimos utilizar irradiación y como otra forma de inducir DSBs. Como habíamos observado previamente con el etopósido, tras la irradiación de las hASCs NT y GARP⁺⁺ el nivel de daño en DNA continuó siendo menor en las células que sobreexpresan GARP que en las células sin transducir (Figura 31F).

Estos datos sugieren que GARP proporciona una ventaja selectiva de proliferación y que su sobreexpresión protege a las células contra el daño en ADN.

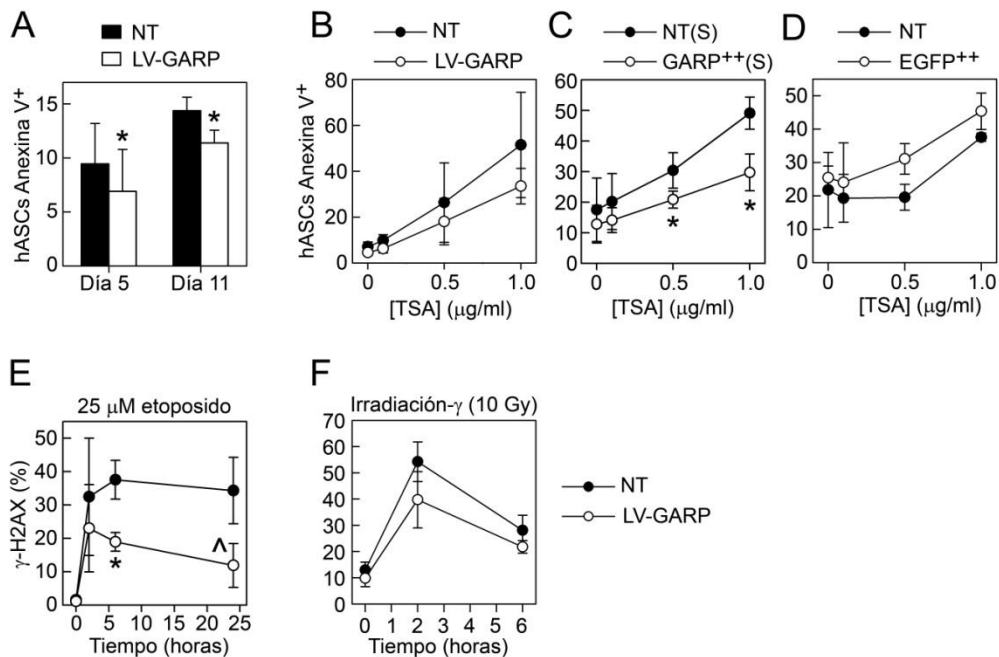


Figura 31: Las hASCs que sobreexpresan GARP son más resistentes a la apoptosis y al daño en ADN: (A) La sobreexpresión de GARP reduce la apoptosis *in vitro*. Se tiñeron hASCs NT (barras negras) y LV-GARP (barras blancas) con anexina V a día 5 y 11 después de la transducción. Se analizó la cantidad de células apoptóticas (Anexina V⁺) por citometría de flujo. Los datos muestran la media (SD) de 4 experimentos independientes. *= $p < 0,05$ vs NT. (B, C, D) La sobreexpresión de GARP protege a las hASCs de la apoptosis inducida por etopósido. Se sometieron hASCs NT (círculos negros), y hASCs transducidas (círculos blancos) con LV-GARP (A), con LV-GARP y purificadas (C) y con LV-eGFP (D) a dosis crecientes de tricostatina A (TSA) durante 2 días. Seguidamente, las células se tiñeron para anexina V y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados muestran la media (SD) de 3 experimentos independientes. (E y F) La sobreexpresión de GARP protege de la inducción de DSBs inducida por etopósido. Se estimularon hASCs LV-GARP y NT con etopósido (E) o se sometieron a irradiación (F) y seguidamente se tiñeron para γ -H2AX y se analizaron por citometría de flujo. Los datos muestran la media (SD) de 3 experimentos independientes. *= $p < 0,05$ vs NT (6h), ^= $p < 0,05$ vs NT (24h).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Como se ha citado en la introducción, las propiedades de las MSCs hacen de ellas una herramienta prometedora para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Si bien, aunque se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos utilizando MSCs, algunos de ellos no han sido capaces de mostrar beneficios clínicos significativos, lo cual evidencia que se necesita una mejor caracterización de las preparaciones de MSCs, así como una mejor comprensión de la biología de las mismas para mejorar su eficacia terapéutica. La habilidad de las MSCs para producir y responder a TGF- β es fundamental para su biología y capacidad terapéutica, por lo que una mejor comprensión del papel de TGF- β en estas células será una gran ventaja a la hora de diseñar terapias utilizando MSCs. En este trabajo nos hemos centrado en estudiar la función que llevan a cabo CD105 y GARP sobre las MSCs. Ambas moléculas son capaces de interactuar con TGF- β desencadenando diferentes respuestas celulares capaces de afectar los procesos de diferenciación, inmunomodulación o proliferación.

6.1. CD105

En la primera parte del presente trabajo nos propusimos mejorar la caracterización de las preparaciones de ASCs de ratón basándonos en la expresión de CD105 y analizando las características de las dos subpoblaciones identificables. El descubrimiento de subpoblaciones de MSCs en las que aparezca aumentada la capacidad de auto-renovación, de diferenciación y/o de inmunomodulación, permitiría diseñar terapias más especializadas y, además, la utilización de preparaciones de MSCs mejor definidas haría que las comparaciones entre estudios fueran más sencillas. En ese sentido, nosotros encontramos que las células CD105⁻ mostraron una mejor capacidad de diferenciación y de inmunomodulación que las CD105⁺ mientras que compartían todas las demás propiedades fenotípicas, proliferativas y clonogénicas. CD105 es fundamental en procesos de angiogénesis(268) ya que es capaz de regular la migración (269), la supervivencia y la organización del citoesqueleto en células endoteliales (270). Esta molécula se ha usado generalmente para seleccionar MSCs humanas multipotentes y la desaparición de CD105

se ha relacionado, de manera general, con la entrada en diferenciación de estas células (205,206). El impacto de la expresión de CD105 por las MSCs sobre su efecto terapéutico se ha descrito en algunos estudios. En primer lugar, se ha demostrado que las MSCs CD105⁺ humanas, son más eficientes en los procesos de reparación del tejido cardiaco cuando se produce un infarto (202). En segundo lugar, la subpoblación CD105⁺ de MSCs humanas derivadas de tejido adiposo se ha mostrado más propensa a diferenciarse hacia condrocitos que la subpoblación CD105⁻ (203,209) mientras que en el caso de diferenciación osteogénica se ha visto el efecto contrario, es la fracción CD105⁻ la que presenta mejor capacidad de diferenciación hacia osteoblastos (211).

Como CD105 es un componente del receptor de TGF- β , su presencia o ausencia en las ASCs debe tener un efecto en su respuesta a TGF- β . En primer lugar, las MSCs secretan constitutivamente TGF- β 1 cuando se cultivan *in vitro* y el suero bovino fetal contiene altos niveles de TGF- β 1 latente (271) y, en segundo lugar, TGF- β ejerce un efecto importante en la diferenciación de las MSCs (272,273) y en su capacidad de inmunomodulación (274). Por tanto, la capacidad de las MSCs de responder a TGF- β tendrá un impacto importante sobre su fisiología y sus aplicaciones terapéuticas. Como modulador de la señalización de TGF- β , CD105 puede tanto aumentar como disminuir la capacidad de las ASCs de responder a TGF- β 1/3. Como se ha citado previamente, existen dos isoformas de CD105, CD105L y CD105S, que juegan papeles opuestos en la modulación de la señalización inducida por TGF- β 1/3 (195). Nosotros hemos encontrado que las mASCs expresan solo la isoforma CD105L, que inhibe la activación de ALK5/Smad3, mientras que promueve la activación de ALK5/Smad1 y ALK5/Smad2 (211,275,276). La activación de Smad2 mediada por TGF- β es capaz de inhibir tanto el proceso de adipogénesis (277) como de osteogénesis (211). De acuerdo con esos datos, hemos visto que las mASCs CD105⁻ exhiben un potencial adipo y osteogénico incrementado, posiblemente debido a una reducción de la señalización TGF- β /Smad2. Además, la adipogénesis puede promoverse adicionalmente en las mASCs CD105⁻ por la menor producción de IL-11 tras la estimulación con TGF- β 1. Sería interesante analizar la

fosforilación de smad2/3 y utilizar líneas celulares sensibles a TGF- β para poder comparar más profundamente la señalización por TGF- β en células CD105⁺ y CD105⁻. Estudios previos sobre el efecto de CD105 en adipogénesis y osteogénesis utilizando ASCs humanas, han mostrado resultados contradictorios. Levi y colaboradores mostraron que las hASCs con baja expresión de CD105 exhibían una mayor capacidad de diferenciación osteogénica, pero un potencial de diferenciación adipogénica reducido (211). La discrepancia observada entre nuestros datos y los obtenidos en el estudio anteriormente citado con respecto a el potencial adipogénico de las ASCs CD105⁻ podría deberse a la especie de la que se obtuvieron las ASCs o a que la subpoblación CD105⁻ de hASCs representa a osteoprogenitores con un reducido potencial adipogénico.

TGF- β también puede actuar en las MSCs modulando su capacidad inmunosupresora. Nosotros hemos encontrado que las mASCs CD105⁻ son más efectivas inhibiendo la proliferación de las células T CD4⁺ en comparación con la fracción CD105⁺. Como no se conocen muy bien los mecanismos que hay detrás de esta diferencia, nosotros mostramos que, tras ser estimuladas, las mASCs CD105⁻ producen ligeramente más iNOS e IL-6 que las CD105⁺. De acuerdo con nuestros datos en MSCs, en otros estudios se ha visto que TGF- β 1 inhibe la producción de iNOS/NO e IL-6 por macrófagos y músculo liso cuando se induce esta producción con LPS, IL-1, TNF- α e INF- γ (278,279). Por lo tanto, en un co-cultivo de MSCs y esplenocitos, TGF- β 1 podría actuar de manera más pronunciada en MSCs CD105⁺, reduciendo la producción de iNOS e IL-6 y disminuyendo, de esta forma, su actividad inmunosupresora. Los macrófagos juegan un papel importante en la supresión de células T mediada por MSCs (252). Sin embargo, a pesar de que la producción de PGE₂ es más baja por parte las ASCs CD105⁻, estas células se mostraron igual de eficientes que las ASCs totales y la fracción CD105⁺ a la hora de inducir macrófagos reguladores.

Además de la población multipotente de mASCs CD105⁻ descrita en nuestro estudio, los cultivos de MSCs pueden contener otras células CD105⁻ o con baja expresión del mismo, que se originan a partir de las mASCs CD105⁺. La pérdida progresiva de expresión de

CD105 durante su cultivo *in vitro* se ha demostrado utilizando MSCs tanto humanas como de ratón (202,280) y de acuerdo con esas publicaciones, nosotros hemos observado una disminución progresiva de su expresión en ASCs totales y en la subpoblación CD105⁺ que no se ve afectada por las condiciones de cultivo. Curiosamente, también encontramos que los niveles de expresión de CD105 en superficie fluctúan durante cada pase dependiendo de la confluencia del cultivo. De hecho, el nivel de CD105 disminuye cuando los cultivos de ASCs empiezan a alcanzar altos niveles de confluencia. Estos resultados van en concordancia con un estudio hecho por Fonsatti y colaboradores donde ellos muestran que CD105 es un marcador de células endoteliales dependiente de la densidad celular y la proliferación (243). Así, una disminución de la proliferación de las MSCs, debido a la confluencia del cultivo, a la inducción de senescencia o a una diferenciación espontánea, podría explicar parcialmente la pérdida de expresión de CD105 en estas células. Independientemente de los mecanismos, en base a nuestros datos y a los de otros estudios, una baja expresión de CD105 en ASCs debido a heterogeneidad de las poblaciones o a las condiciones de cultivo podría disminuir la diferenciación condrogénica, incrementar la adipogénesis y osteogénesis y afectar la capacidad inmunomoduladora de estas células. De esta forma, cuando la expresión de CD105 sea importante para la eficacia terapéutica de las MSC, la confluencia celular y el tiempo de cultivo deben controlarse cuidadosamente. Por el contrario, en el caso de la inmunomodulación, una expresión baja de CD105 podría ser favorable.

Aunque este estudio se ha hecho utilizando ASCs de ratón, hemos obtenido varios resultados que se comparten con las ASCs humanas como por ejemplo la regulación negativa de la expresión de CD105 tras un cultivo *in vitro* prolongado y los efectos inhibitorios de CD105 en osteogénesis. Esto sugiere que nuestro sistema en ratón es válido para la identificación de características generales de ASCs que pueden ser importantes para su eficacia terapéutica cuando se tratan enfermedades humanas.

Como conclusión de esta primera parte, hemos identificado una nueva subpoblación de ASCs de ratón (CD105⁻) que presenta un fenotipo, una capacidad de proliferación y un

potencial de formación de CFU-F similar a la subpoblación CD105⁺. Sin embargo, estas células también presentan una mayor capacidad de diferenciación hacia adipocitos y osteocitos que la fracción CD105⁺ y son mejores a la hora de inhibir la proliferación de las células T *in vitro*. Aunque el aislamiento de la subpoblación CD105⁺ en MSCs humanas es más complicado debido a la desaparición de estas células poco después del inicio del cultivo *in vitro*, podría ser interesante estudiar si, cambiando las condiciones de cultivo y/o el tejido de origen, se podría obtener una subpoblación CD105⁺ de hMSCs que presentase características similares a las observadas en mASCs.

6.2. GARP

En la segunda parte, nos centramos en estudiar el papel GARP sobre la biología de las MSCs. Nos centramos en su estudio ya que, por un lado, se había descrito previamente la presencia de RNA mensajero de GARP en MSCs humanas (281) y, por otro lado, se sabe que GARP es una molécula que está involucrada en la modulación de la localización y actividad de TGF- β (226).

6.2.1. Expresión de GARP y papel en la secreción y activación de TGF- β

Las células Tregs en reposo no expresan GARP en su superficie pero contienen altos niveles de GARP intracelular que, tras su activación, se traslada hasta la membrana celular (230,259). De manera similar, en células recién aisladas de tejido adiposo de ratón y humano, apenas encontramos expresión de GARP pero estos niveles aumentaron rápidamente en aquellas células adherentes que presentaban fenotipo mesenquimal tras su cultivo *in vitro*. De manera que, hemos demostrado por primera vez que tanto las MSCs de ratón como humanas expresan GARP en su membrana tras su cultivo *in vitro*. Sin embargo, las circunstancias que hacen que se active la expresión de GARP en la membrana de las MSCs son desconocidas. Se podría especular que, al igual que en Tregs, la localización de GARP en superficie podría ser un indicador de activación de MSCs. Sin embargo, para comprobar esto se necesitaría estudiar la inducción del mRNA de GARP en MSCs durante la expansión temprana de estas células *in vitro*. Esto es complicado debido

a la heterogeneidad de las preparaciones celulares recién aisladas, que además de MSCs, pueden contener células endoteliales, epiteliales e inmunológicas.

TGF- β 1 está involucrado en multitud de funciones de las MSCs como proliferación, diferenciación e inmunomodulación, por ello, es importante comprender la regulación de su producción y activación por parte de las MSCs. Clásicamente, TGF- β 1 se ha considerado como una molécula secretada en forma latente que, a través de su asociación con LTBP, se une a la matriz extracelular. Cuando se producen perturbaciones en la integridad de dicha matriz (en respuesta a daño o inflamación), se produce la activación de TGF- β 1 (103,282). Sin embargo, el descubrimiento de que GARP presenta TGF- β 1 en la superficie de las MSCs abre nuevas posibilidades. Varios estudios han mostrado que la respuesta celular a TGF- β 1 difiere dependiendo de si éste se encuentra secretado o anclado a la membrana (168,178,283). No se conoce muy bien la razón de estas diferencias pero se piensa que el mbTGF- β podría producir una alta concentración local de TGF- β 1 activo, una señalización sostenida TGF- β 1 y también podría permitir que ocurran otras interacciones que modulan la respuesta a TGF- β 1 de una manera que la forma secretada no es capaz de imitar (168,284). Nosotros hemos encontrado que GARP y LAP/TGF- β 1 presentan un alto grado de colocalización en la superficie de las MSCs. Aunque hay otras moléculas de superficie que pueden unirse a LAP/TGF- β 1, nuestros estudios de interferencia sugieren que GARP es la principal molécula involucrada en la presentación de mbTGF- β 1 en las MSCs. Hay varios estudios que muestran que GARP puede modular la secreción de LAP/TGF- β 1 (223,226). Nuestros datos demuestran que el silenciamiento de la expresión de GARP incrementa la secreción de LAP/TGF- β 1 por las MSCs. Curiosamente, encontramos que las mASCs GARP⁻ producen niveles mayores de TGF- β 1 activo en comparación con las mASCs NT y LV-CTRL, lo que sugiere que GARP puede modular tanto la secreción como la activación de TGF- β 1 por las MSCs. La forma en la que la falta de GARP produce un incremento de la activación de TGF- β 1, bajo condiciones normales de cultivo, no se conoce. Sin embargo, se ha visto que las LTBPs (Proteínas de unión a TGF- β latente) son importantes para la activación de TGF- β 1 tanto

in vitro como *in vivo* (285,286) y también se sabe que GARP compete con LTBP1 para unirse a LAP/TGF- β 1 (226). Nosotros proponemos que en ausencia de GARP, hay más complejos LTBP/LAP/TGF- β 1 que son secretados por las MSCs, lo que da lugar a un aumento en su localización en la matriz extracelular y al subsecuente incremento en la activación de TGF- β 1. Por el contrario, en estudios recientes se ha comprobado que la expresión de GARP en células B y Tregs tiene como resultado un incremento en la activación de TGF- β (104).

El silenciamiento de GARP en Tregs disminuye de forma significativa su capacidad inmunosupresora *in vitro* mientras que su sobreexpresión produce el efecto opuesto (229,234). Como se ha citado en la introducción, se sabe que las MSCs son capaces de modular la actividad tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Aunque las mASCs GARP⁻ se mostraron igual de eficientes que las NT en la inhibición de la activación de las células NK, hemos encontrado que la expresión de GARP contribuye a la habilidad de las mASCs para inhibir la respuesta de las células T *in vitro*. Las mASCs GARP⁺ fueron el doble de efectivas que las GARP⁻ a la hora de inhibir la proliferación de las células T CD4⁺. Este es un hallazgo interesante teniendo en cuenta la multitud de moléculas inmunorreguladoras que expresan las MSCs y que son capaces de inhibir las respuestas producidas por las células T, como iNOS, PGE₂ y factores de crecimiento (287). Un mecanismo que podría explicar el aumento en la actividad supresora por parte de las MSCs GARP⁺ podría involucrar la inducción de la ruta Notch1/HES1 a través del mbTGF- β . Sin embargo, nuestros datos mostraron que las MSCs no inhiben la respuesta de las células T a través de esta ruta. Lo que si fuimos capaces de observar es que las mASCs GARP⁻ producían menos niveles de NO₂ lo que podría sugerir que el incremento en la secreción de TGF- β 1 por estas células podría estar inhibiendo la inducción de iNOS de forma autocrina como ya se había descrito (156). De esta forma, nosotros creemos que GARP podría participar en la inhibición de la proliferación de células T mediada por MSCs mediante el control de la secreción y activación de TGF- β 1 en lugar de interactuando

directamente con las células T a través del mbTGF- β 1 en una manera dependiente de contacto celular.

Como resumen de esta parte, proponemos un modelo donde las MSCs quiescentes no expresan GARP. Cuando se activan estas células al producirse un daño, adquieren expresión superficial de GARP. GARP es capaz de anclar TGF- β 1 a la membrana de las MSCs lo que aumenta su habilidad para suprimir la respuesta de las células T. De manera que se puede proponer GARP como un marcador para identificar MSCs activadas o semi-activadas.

6.2.2. Papel de GARP en la proliferación y supervivencia de las MSCs

Para el uso de las MSCs en terapia, es fundamental una investigación más profunda sobre como mejorar su expansión manteniendo su estabilidad genómica y su capacidad terapéutica, ya que este paso es fundamental para poder trasladar satisfactoriamente estas células a clínica. Nosotros hemos demostrado que el silenciamiento de GARP en MSCs tanto de ratón como humanas inhibe su capacidad de proliferación, mientras que aquellas MSCs que sobreexpresan GARP parecen tener una ventaja selectiva de crecimiento frente a las que presentan niveles fisiológicos del mismo. Por tanto, nos hemos propuesto estudiar los posibles mecanismos que podría haber detrás de estas observaciones.

Hasta ahora, la investigación en GARP se ha centrado mayoritariamente en su capacidad de regular la activación/secreción de TGF- β y su papel en la capacidad inmunosupresora de las células Tregs (226,255). Sin embargo, algunos estudios han indicado que GARP está involucrado en la proliferación de las células T (234,235). Recientemente, en otro estudio se ha demostrado que la expresión de GARP en células HeLa se correlaciona positivamente con su capacidad de proliferación (259). En concordancia con estos estudios, nosotros hemos visto que al silenciar GARP en MSCs, uno de los fenómenos más

evidentes que hemos observado es una disminución casi total del crecimiento de las mismas.

Para entender el efecto de GARP en la proliferación de las MSCs, llevamos a cabo un microarray para conocer el perfil de expresión génica de las MSCs humanas derivadas de tejido adiposo (hASCs) tras el silenciamiento de GARP. El software que utilizamos para analizar dicho perfil (IPA) indentificó varias biofunciones inhibidas, que son necesarias para la progresión del ciclo celular, así como varias biofunciones activadas relacionadas con apoptosis y muerte celular, lo que confirmó el fenotipo que habíamos observado. IPA también detectó una activación del punto de control de daño en DNA en la fase G2/M del ciclo y una inhibición de la ruta de las quinasas tipo-polo (PLK). El punto de control en G2/M es fundamental para asegurar que la replicación se ha completado correctamente, bloqueando la división celular hasta que se resuelvan todos los problemas encontrados, incluyéndose daño en el DNA y errores en la replicación. Contrariamente, la ruta de las quinasas tipo-polo se requiere para entrar en mitosis, para la formación del polo fusiforme, la separación de los cromosomas y la salida de la mitosis. La activación del punto de control en G2/M y la inhibición de la ruta de las quinasas tipo-polo debería dar lugar a un mayor porcentaje de células bloqueadas en G2/M, que es exactamente lo que observamos en las hASCs GARP⁻. Además, también observamos una inhibición de genes involucrados en el mantenimiento de la estabilidad genómica y la reparación de roturas de DNA de cadena doble (DSBs). De acuerdo con estas predicciones, encontramos que las hASCs GARP⁻ exhibieron mayores niveles basales de DSBs y también fueron más susceptibles al daño inducido por etoposido. Mientras que las hASCs que sobreexpresan GARP, se mostraron parcialmente protegidas frente al daño en DNA producido por etoposido y por irradiación- γ . Finalmente, IPA también identificó TP53 como uno de los principales reguladores aguas arriba que aparecía sobre-activado en las células GARP⁻, lo que sugiere que el silenciamiento de GARP podría llevar a daño en DNA y a un bloqueo en proliferación en la fase G2/M a través de la activación de p53.

Teniendo en cuenta los posibles vínculos entre GARP, daño en DNA y bloqueo en G2/M, se puede evidenciar la participación de TGF- β y de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en estos procesos. En primer lugar, recientemente se ha demostrado que TGF- β 1 puede incrementar la producción de ROS en BM-MSCs de ratón, lo que da lugar a senescencia (265) y apoptosis (266). En segundo lugar, se sabe que tanto TGF- β como ROS son capaces de provocar un arresto celular en la fase G2/M del ciclo (288–290). Y en tercer lugar, nosotros hemos visto que el silenciamiento de GARP en mASCs tiene como resultado un incremento en la secreción de TGF- β 1 activo, un aumento de la fosforilación de SMAD2/3 y la inducción de genes sensibles a TGF- β . Estos datos presentan la posibilidad de que TGF- β 1 y ROS puedan estar involucrados en el daño en el DNA y el bloqueo en proliferación observado en las hASCs GARP⁻.

En MSCs, la respiración mitocondrial y, en menor grado, NOX-4 son los principales contribuyentes al conjunto fisiológico de ROS en la célula (291,292). Para la proliferación de las MSCs y su capacidad de diferenciación adipo y condrogénica es necesario que existan niveles fisiológicos de ROS (293–296). Sin embargo, se sabe que altos niveles de ROS endógeno pueden tener efectos perjudiciales en las MSCs como la inducción de daño en el DNA y la senescencia prematura (297). ROS induce principalmente roturas de cadena simple (SSBs) en el DNA (298) pero cuando se producen fallos en la reparación de esas SSBs se pueden convertir en DSBs durante la fase S del ciclo celular (299). En concordancia, hemos encontrado que el silenciamiento de GARP resulta en un aumento de los niveles de ROS mitocondrial (mtROS). La adición de NAC o mitoTEMPO reduce los niveles de mtROS, disminuye la cantidad de DSBs y revierte de manera significativa el bloqueo en proliferación de las hASCs GARP⁻.

TGF- β parece ejercer un efecto bifásico en la proliferación de las MSCs, donde bajas concentraciones son capaces de incrementar la proliferación mientras que concentraciones elevadas llevan a cabo el efecto contrario (132,300). En nuestros análisis de proliferación en ASCs de ratón, inhibimos la señalización de TGF- β en las mASCs GARP⁻ añadiendo un inhibidor (SB431542) o anticuerpos neutralizantes 4 días

después del silenciamiento, pero no pudimos ver ningún efecto en el bloqueo en proliferación de estas células. Sin embargo, ya que nuestros resultados apuntan de manera clara a que los niveles elevados de TGF- β /ROS son los responsables de la generación de DSBs, decidimos re-analizar el papel de TGF- β en la proliferación de las hASCs GARP⁻. Estos nuevos análisis mostraron que la inhibición de la señalización por TGF- β justo después del silenciamiento de GARP (1 día después de la transducción) era capaz de reducir los niveles de mtROS y de DSBs y de revertir el bloqueo en proliferación de las células GARP⁻. Estos datos sugieren que el silenciamiento de GARP aumenta la señalización por TGF- β 1 en las MSCs, dando lugar al aumento de los niveles de mtROS que generan DSBs en el DNA, arresto en el ciclo y muerte celular.

El parólogo de GARP, NRROS/LRRC33, se ha identificado recientemente como un regulador negativo de ROS en fagocitos. NRROS se localiza en el retículo endoplasmático donde promueve la degradación de NOX-2 (301). Sin embargo, el papel de GARP en MSCs parece no estar relacionado con NOX-2, dado que la apocinina (un inhibidor de NOX) no es capaz de rescatar el bloqueo en proliferación de las hASCs GARP⁻. Por otro lado, GARP se ha identificado como un modulador potencial del daño en DNA (302) y de proliferación celular (303) en estudios de iRNAs de genoma completo, aunque los autores de estos estudios no se centraron particularmente en GARP. Como GARP contiene el dominio de interacción proteína-proteína más frecuente en la naturaleza, el dominio LRR (Repeticiones Ricas en Leucina), existen grandes posibilidades de que GARP interactúe con otras proteínas. Hasta ahora, se sabe que GARP interactúa con LAP/TGF- β (228), con la proteína transmembrana asociada a lisosomas 4B (LAPTMP4B) (304) y con las proteínas HSP90A y HSP90B1 (GP96) (305), ambas proteínas forman parte de la familia de chaperonas HSP90 (del inglés *heat shock protein*). Sería interesante investigar el papel que juegan estas interacciones en la biología de las MSCs, ya que la maquinaria de esta chaperona juega un papel clave en la regulación de la respuesta al estrés así como de la actividad de proteínas involucradas en el ciclo celular y en la respuesta al daño en DNA como BRCA1, BRCA2, RAD51, p53 y CHK1 (306).

Tras los antecedentes presentados y con los resultados obtenidos, proponemos un modelo en el cual, en condiciones fisiológicas, GARP es capaz de mantener TGF- β anclado a la membrana en forma latente. Los niveles de mtROS citoplasmáticos son normales de manera que el DNA nuclear permanece intacto, generándose una progresión normal del ciclo celular (Figura 32A). Sin embargo, tras el silenciamiento de GARP en la superficie de las MSCs, se produce un aumento de la secreción y activación de TGF- β , que desencadena un aumento de los niveles de mtROS citoplasmáticos. Estos elevados niveles de mtROS son capaces de generar DSBs en el DNA, provocando la activación de p53, que es capaz de inhibir la actividad de algunas ciclinas (CDK1, CCNB1) y de producir, de esta forma, un arresto en G2/M y la subsecuente muerte de estas células (Figura 32B).

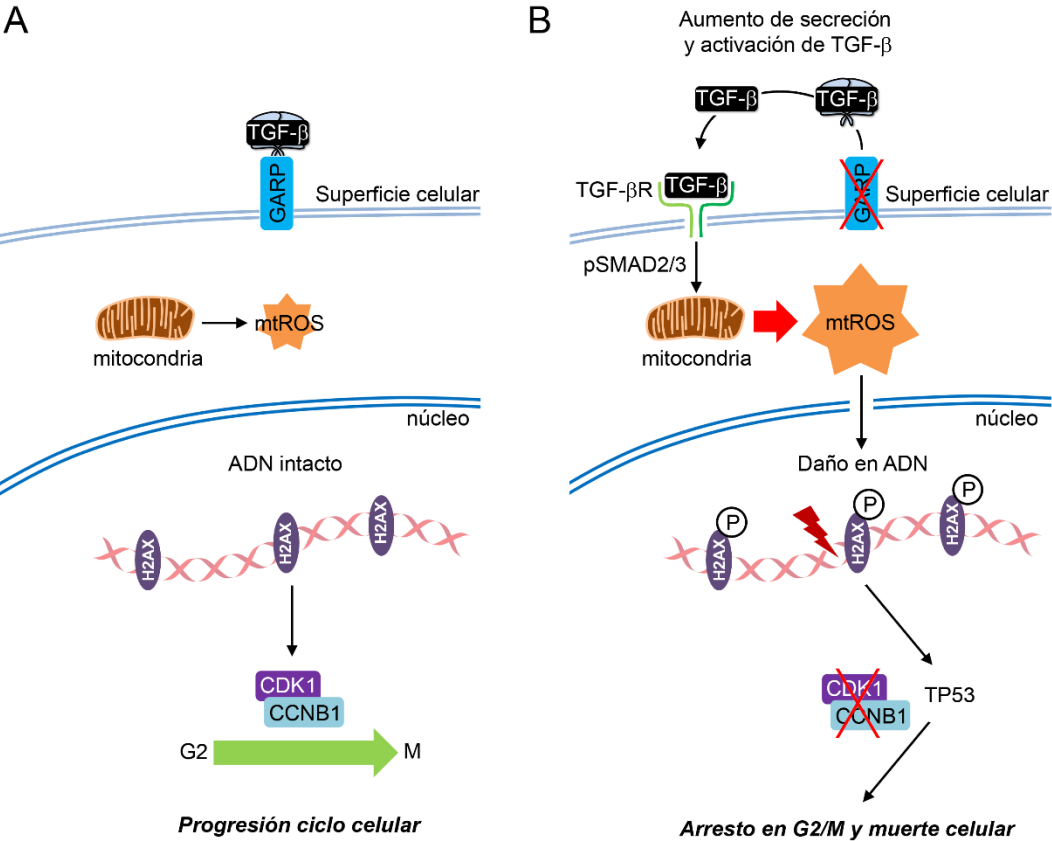


Figura 32: Modelo propuesto del papel de GARP en la supervivencia de las MSCs: (A) Esquema representativo de la progresión del ciclo celular bajo niveles fisiológicos de GARP. (B) Esquema representativo de la progresión del ciclo celular tras el silenciamiento de GARP.

Desde un punto de vista práctico, el descubrimiento de que GARP puede proteger las MSCs frente al daño en DNA mediado por ROS y frente a apoptosis, ya sea a través de la inhibición de la activación de TGF- β o a través de vías alternativas toma una gran importancia cuando se expanden MSCs *in vitro* para fines terapéuticos. Los cultivos de MSCs están sometidos a altos niveles de estrés oxidativo debido a cantidades de O₂ mayores que las fisiológicas, a altos niveles de glucosa y a la presencia de factores de crecimiento y de iones metálicos (307). En ese sentido, una conclusión evidente es que concentraciones altas de TGF- β activo en los medios de cultivo son deletéreas para el crecimiento de las MSCs *in vitro* y que GARP puede controlar estos niveles. Además, como se ha citado anteriormente, altos niveles de ROS pueden ejercer efectos perjudiciales en la función de las MSCs, como la inducción de daño en DNA y la senescencia prematura (297) así como desencadenar un deterioro en la migración de las MSCs (308), la inhibición de la adhesión celular (309) y una reducción en la capacidad inmunomoduladora de las mismas (310). Nuestros datos muestran que la sobreexpresión de GARP tiene un efecto claramente positivo en el crecimiento de las MSCs evitando la muerte por daño en DNA. Queda por investigar si estos efectos son únicamente debidos a la capacidad de GARP para controlar los niveles de TGF- β activo en el medio o si podría estar también involucrado en protección del daño en DNA de una forma independiente de TGF- β .

En resumen, nuestros resultados muestran que GARP es fundamental para la proliferación y supervivencia de las MSCs *in vitro*, a través de la regulación de la producción de mtROS mediada por TGF- β 1. Se necesitan investigaciones adicionales para saber si la expresión de GARP también se requiere para la proliferación *in vivo* de estas células así como para averiguar si el papel protector de GARP frente al daño en DNA es específico para MSCs o si estos resultados son reproducibles en otras células que también expresan esta molécula, como algunas líneas celulares tumorales (233). En ese sentido, GARP podría emerger como una diana terapéutica para determinados tipos de cáncer que

se sabe que exhiben una expresión anormal de GARP, como el cáncer de mama y ciertos tipos de sarcomas y linfomas.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Tanto CD105 como GARP son proteínas de membrana que se inducen en las primeras fases de cultivo de las MSCs, por lo que ambas se pueden considerar marcadores de activación.
2. Las MSCs CD105⁻Sca1⁺CD44⁺CD29⁺ identifican una subpoblación con mejores características para su utilización en terapia celular para patologías autoinmunes/inflamatorias y en regeneración ósea que las clásicas MSCs CD105⁺Sca1⁺CD44⁺CD29⁺.
3. GARP es un nuevo marcador de superficie de las MSCs que tiene un papel importante en su capacidad inmunomoduladora y que es fundamental para su proliferación.
4. Se ha identificado un nuevo papel para GARP uniendo TGF- β 1 latente en la superficie de las MSCs, controlando su activación y evitando la señalización excesiva.
5. GARP es imprescindible para la viabilidad de las MSCs al evitar la elevación de los niveles de mtROS que se generan por la señalización de TGF- β 1.
6. La sobreexpresión de GARP en MSCs es una alternativa para la generación de MSCs con mejores características terapéuticas al mejorar su capacidad proliferativa e incrementar su resistencia a apoptosis.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* [Internet]. 1966 Dec [cited 2017 Nov 18];16(3):381–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5336210>
2. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* [Internet]. 1968 Jul 5 [cited 2017 Nov 18];161(3836):54–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4871792>
3. OWEN M. CELL POPULATION KINETICS OF AN OSTEOGENIC TISSUE. I. *J Cell Biol* [Internet]. 1963 Oct [cited 2017 Nov 18];19:19–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14069793>
4. OWEN M, MACPHERSON S. CELL POPULATION KINETICS OF AN OSTEOGENIC TISSUE. II. *J Cell Biol* [Internet]. 1963 Oct [cited 2017 Nov 18];19(1):33–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14069800>
5. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* [Internet]. 1988 [cited 2017 Nov 18];136:42–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3068016>
6. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* [Internet]. 1988 [cited 2017 Nov 18];10:63–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3077943>
7. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* [Internet]. 1976 [cited 2017 Nov 18];47:327–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11195>
8. Chailakhyan RK, Gerasimov Y V., Fridenshtein AY. Transfer of bone-marrow microenvironment by clones of stromal mechanocytes. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 1978 [cited 2017 Nov 18];86(6):1633–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00801824?LI=true>
9. Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematol Blood Transfus* [Internet]. 1980 [cited 2017 Nov 18];25:19–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7021339>
10. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* [Internet]. 1991 Sep [cited 2017 Nov 18];9(5):641–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1870029>

11. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2005 [cited 2017 Nov 18];7(5):393–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236628>
12. García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, García Castro J, et al. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2010 Oct 12 [cited 2017 Nov 20];10(10):1453–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20831449>
13. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F., Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006 [cited 2017 Nov 20];8(4):315–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
14. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* [Internet]. 1997 Feb [cited 2017 Nov 20];64(2):278–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027588>
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* [Internet]. 1999 Apr 2 [cited 2017 Nov 20];284(5411):143–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814>
16. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* [Internet]. 2004 Mar 1 [cited 2017 Nov 20];103(5):1662–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592819>
17. Lin C-S, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy* [Internet]. 2012 Sep [cited 2017 Dec 6];14(10):1159–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066784>
18. Boxall SA, Jones E. Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2012 [cited 2017 Nov 20];2012:1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666272>
19. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol* [Internet]. 2009 Jul 15 [cited 2017 Nov 20];183(2):993–1004. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561093>

20. Jo CH, Ahn HJ, Kim HJ, Seong SC, Lee MC. Surface characterization and chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells derived from synovium. *Cytotherapy* [Internet]. 2007 [cited 2017 Nov 20];9(4):316–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573607>
21. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* [Internet]. 2009 Oct 26 [cited 2017 Nov 20];206(11):2483–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841085>
22. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301–13.
23. Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, et al. No Identical "Mesenchymal Stem Cells" at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as Adventitial Cells in Microvessels. *Stem cell reports* [Internet]. 2016 [cited 2017 Dec 25];6(6):897–913. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27304917>
24. Kaltz N, Funari A, Hippauf S, Delorme B, Noël D, Riminucci M, et al. In Vivo Osteoprogenitor Potency of Human Stromal Cells from Different Tissues Does Not Correlate with Expression of POU5F1 or Its Pseudogenes. *Stem Cells* [Internet]. 2008 Sep [cited 2017 Dec 25];26(9):2419–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18617685>
25. Reinisch A, Etchart N, Thomas D, Hofmann NA, Fruehwirth M, Sinha S, et al. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. *Blood* [Internet]. 2015 Jan 8 [cited 2017 Dec 25];125(2):249–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25406351>
26. Corselli M, Chen C-W, Sun B, Yap S, Rubin JP, Péault B. The Tunica Adventitia of Human Arteries and Veins As a Source of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2012 May 20 [cited 2017 Dec 25];21(8):1299–308. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21861688>
27. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* [Internet]. 2000 [cited 2017 Nov 20];2(6):477. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11056678>

28. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2017 Nov 20];109(1):235–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10848804>
29. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells* [Internet]. 2005 Feb [cited 2017 Nov 20];23(2):220–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671145>
30. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2017 Nov 20];13(12):4279–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475952>
31. Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* [Internet]. 2003 Apr 24 [cited 2017 Nov 20];102(4):1548–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900350>
32. Guo Z, Li H, Li X, Yu X, Wang H, Tang P, et al. In Vitro Characteristics and In Vivo Immunosuppressive Activity of Compact Bone-Derived Murine Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2006 Apr [cited 2017 Nov 20];24(4):992–1000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644925>
33. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res* [Internet]. 1991 Aug [cited 2017 Nov 20];195(2):492–503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2070830>
34. De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2001 Aug [cited 2017 Nov 20];44(8):1928–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11508446>
35. Douthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJR, et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* [Internet]. 2004 Feb 22 [cited 2017 Nov 20];117(6):889–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762107>
36. MIAO Z, JIN J, CHEN L, ZHU J, HUANG W, ZHAO J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* [Internet]. 2006 Sep [cited 2017 Nov 20];30(9):681–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16870478>

37. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* [Internet]. 2001 Oct 15 [cited 2017 Nov 20];98(8):2396–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11588036>
38. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *Stem Cells* [Internet]. 2007 Jun [cited 2017 Nov 22];25(6):1384–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332507>
39. Via AG, Frizziero A, Oliva F. Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles Ligaments Tendons J* [Internet]. 2012 Jul [cited 2017 Nov 22];2(3):154–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738292>
40. Phinney DG, Prockop DJ. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair-Current Views. *Stem Cells* [Internet]. 2007 Nov [cited 2017 Nov 22];25(11):2896–902. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901396>
41. Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* [Internet]. 1992 [cited 2017 Nov 22];3(3):269–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1571474>
42. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* [Internet]. 1998 Mar 1 [cited 2017 Nov 22];16(3):247–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9528003>
43. Valenti MT, Garbin U, Pasini A, Zanatta M, Stranieri C, Manfro S, et al. Role of Ox-PAPCs in the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Runx2 and PPAR γ 2 Expression in MSCs-Like of Osteoporotic Patients. Rota M, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Jun 3 [cited 2017 Nov 22];6(6):e20363. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674037>
44. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2009 Jan 16 [cited 2017 Nov 22];66(2):236–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854943>
45. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* [Internet]. 2000 Jun 1 [cited 2017 Nov 22];14(11):1293–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837022>

46. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Apr 2 [cited 2017 Nov 22];99(7):4397–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11917104>
47. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2017 Nov 24];97(1):33–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16215986>
48. Pogue R, Lyons K. BMP Signaling in the Cartilage Growth Plate. In: *Current topics in developmental biology* [Internet]. 2006 [cited 2017 Nov 24]. p. 1–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118262>
49. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* [Internet]. 1995 Dec [cited 2017 Nov 24];18(12):1417–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477065>
50. Hoffmann A, Pelled G, Turgeman G, Eberle P, Zilberman Y, Shinar H, et al. Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Mar 23 [cited 2017 Nov 24];116(4):940–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16585960>
51. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Feb 19 [cited 2017 Nov 24];99(4):2199–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854516>
52. Weiss L. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: An ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec* [Internet]. 1976 Oct [cited 2017 Nov 18];186(2):161–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/984472>
53. Méndez-Ferrer S, Michurina T V., Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* [Internet]. 2010 Aug 12 [cited 2017 Dec 6];466(7308):829–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703299>
54. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell* [Internet]. 2007 Oct 19 [cited 2017 Dec 6];131(2):324–36. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956733>
55. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Express Hematopoietic Cytokines and Support Long-Term Hematopoiesis When Differentiated Toward Stromal and Osteogenic Lineages. *J Hematother Stem Cell Res* [Internet]. 2000 Dec [cited 2017 Nov 25];9(6):841–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11177595>
 56. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2017 Nov 25];12(2):126–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21253000>
 57. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *Stem Cells* [Internet]. 2009 Oct [cited 2018 Jan 4];27(10):2614–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19650040>
 58. Gao F, Chiu SM, Motan DAL, Zhang Z, Chen L, Ji H-L, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* [Internet]. 2016 Jan 21 [cited 2018 Jan 4];7(1):e2062. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26794657>
 59. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2017 Nov 25];107(1):367–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141348>
 60. Li Y-P, Paczesny S, Lauret E, Poirault S, Bordigoni P, Mekhloufi F, et al. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol* [Internet]. 2008 Feb 1 [cited 2017 Nov 25];180(3):1598–608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209056>
 61. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells* [Internet]. 2007 Aug [cited 2017 Nov 25];25(8):2025–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510220>
 62. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 Nov 25];37(12):1445–53. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19772890>
63. Anderson P, Gonzalez-Rey E, O'Valle F, Martin F, Oliver FJ, Delgado M. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating Self-Reactive T Cell Responses and Dendritic Cell Function. *Stem Cells Int* [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 4];2017:2389753. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28250776>
 64. Bassi EJ, Moraes-Vieira PMM, Moreira-Sa CSR, Almeida DC, Vieira LM, Cunha CS, et al. Immune Regulatory Properties of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Experimental Autoimmune Diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2018 Jan 4];61(10):2534–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688334>
 65. Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* [Internet]. 2013 Aug [cited 2017 Nov 12];62(8):1131–41. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2012-302152>
 66. Mathias LJ, Khong SML, Spyroglou L, Payne NL, Siatskas C, Thorburn AN, et al. Alveolar Macrophages Are Critical for the Inhibition of Allergic Asthma by Mesenchymal Stromal Cells. *J Immunol* [Internet]. 2013 Dec 15 [cited 2018 Jan 4];191(12):5914–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24249728>
 67. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2007 Apr [cited 2018 Jan 4];56(4):1175–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17393437>
 68. Lim J-Y, Ryu D-B, Lee S-E, Park G, Min C-K. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Attenuate Cutaneous Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease (Scl-GVHD) through Inhibition of Immune Cell Infiltration in a Mouse Model. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2018 Jan 4];137(9):1895–904. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X1731535X>
 69. Caplan AI, Correa D. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2011 Jul 8 [cited 2017 Nov 25];9(1):11–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726829>
 70. Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, et al. Origins of the Tumor Microenvironment: Quantitative Assessment of Adipose-Derived and Bone

- Marrow–Derived Stroma. Rameshwar P, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Feb 20 [cited 2017 Nov 25];7(2):e30563. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363446>
71. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 May 6 [cited 2017 Nov 25];127(10):2323–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473928>
 72. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, et al. Carcinoma-Associated Fibroblast-Like Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2017 Nov 25];68(11):4331–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519693>
 73. Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2014 Feb 6 [cited 2016 Nov 4];7:14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24502410>
 74. Tang Y-M, Bao W-M, Yang J-H, Ma L-K, Yang J, Xu Y, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells inhibit growth and promote apoptosis of HepG2 cells. *Mol Med Rep* [Internet]. 2016 Sep [cited 2017 Nov 25];14(3):2717–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27485485>
 75. Bu S, Wang Q, Zhang Q, Sun J, He B, Xiang C, et al. Human endometrial mesenchymal stem cells exhibit intrinsic anti-tumor properties on human epithelial ovarian cancer cells. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Dec 15 [cited 2017 Nov 25];6(1):37019. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27845405>
 76. Zhu P, Chen M, Wang L, Ning Y, Liang J, Zhang H, et al. Systemic mesenchymal stem cells reduce growth rate of cisplatin-resistant ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2013 [cited 2017 Nov 25];6(11):2506–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24228113>
 77. Atsuta I, Liu S, Miura Y, Akiyama K, Chen C, An Y, et al. Mesenchymal stem cells inhibit multiple myeloma cells via the Fas/Fas ligand pathway. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2013 [cited 2017 Nov 25];4(5):111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24025590>
 78. Ahn J-O, Coh Y-R, Lee H-W, Shin I-S, Kang S-K, Youn H-Y. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells inhibit melanoma growth in vitro and in vivo. *Anticancer Res* [Internet]. 2015 Jan [cited 2017 Nov 25];35(1):159–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550547>
 79. Farias V de A, O’Valle F, Lerma BA, Almodóvar CR de, López-Peñalver JJ, Nieto A, et

- al. Human mesenchymal stem cells enhance the systemic effects of radiotherapy. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Oct 13 [cited 2017 Nov 25];6(31):31164–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26378036>
80. Kim N, Cho S-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med* [Internet]. 2013 Jul [cited 2017 Nov 26];28(4):387–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23864795>
 81. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* [Internet]. 2014 May [cited 2018 Jan 4];54(5):1418–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24898458>
 82. Bustos ML, Huleihel L, Kapetanaki MG, Lino-Cardenas CL, Mroz L, Ellis BM, et al. Aging Mesenchymal Stem Cells Fail to Protect Because of Impaired Migration and Antiinflammatory Response. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2018 Jan 4];189(7):787–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24559482>
 83. Wall ME, Bernacki SH, Lobo EG. Effects of Serial Passaging on the Adipogenic and Osteogenic Differentiation Potential of Adipose-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng* [Internet]. 2007 Jun [cited 2018 Jan 4];13(6):1291–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17518709>
 84. Jiang T, Xu G, Wang Q, Yang L, Zheng L, Zhao J, et al. In vitro expansion impaired the stemness of early passage mesenchymal stem cells for treatment of cartilage defects. *Cell Death Dis* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2018 Jan 4];8(6):e2851. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28569773>
 85. Bochkov NP, Voronina ES, Kosyakova N V, Liehr T, Rzhabinova AA, Katosova LD, et al. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2007 Jan [cited 2018 Jan 4];143(1):122–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18019028>
 86. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* [Internet]. 2007 Aug 13 [cited 2017 Dec 30];6(6):745–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17925003>
 87. Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, et al. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010 Jan 15 [cited 2018 Jan 4];391(3):1471–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20034468>

88. Kashino G, Kodama S, Nakayama Y, Suzuki K, Fukase K, Goto M, et al. Relief of oxidative stress by ascorbic acid delays cellular senescence of normal human and Werner syndrome fibroblast cells. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2003 Aug 15 [cited 2018 Jan 4];35(4):438–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12899945>
89. Lin T-M, Tsai J-L, Lin S-D, Lai C-S, Chang C-C. Accelerated Growth and Prolonged Lifespan of Adipose Tissue-derived Human Mesenchymal Stem Cells in a Medium Using Reduced Calcium and Antioxidants. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2005 Feb [cited 2018 Jan 4];14(1):92–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15725748>
90. Gharibi B, Hughes FJ. Effects of Medium Supplements on Proliferation, Differentiation Potential, and In Vitro Expansion of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2012 Nov [cited 2018 Jan 4];1(11):771–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197689>
91. Aguilar E, Bagó JR, Soler-Botija C, Alieva M, Rigola MA, Fuster C, et al. Fast-proliferating adipose tissue mesenchymal-stromal-like cells for therapy. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2018 Jan 4];23(23):2908–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25019281>
92. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2018 Jan 4];363(9419):1439–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121408>
93. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* [Internet]. 2006 May 27 [cited 2018 Jan 4];81(10):1390–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16732175>
94. Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Ishii M, Morita Y, Kubota R, et al. The Impact of the Capability of Circulating Progenitor Cell to Differentiate on Myocardial Salvage in Patients With Primary Acute Myocardial Infarction. *Circulation* [Internet]. 2006 Jul 4 [cited 2018 Jan 4];114(1_suppl):I-114-I-119. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16820559>
95. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, et al. Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch Neurol* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2018 Jan 4];67(10):1187–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937945>

96. Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet* [Internet]. 2016 Sep 24 [cited 2018 Jan 4];388(10051):1281–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27477896>
97. Massague J. The Transforming Growth Factor-beta Family. *Annu Rev Cell Biol* [Internet]. 1990 Nov [cited 2017 Nov 26];6(1):597–641. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2177343>
98. Wan YY, Flavell RA. "Yin–Yang" functions of transforming growth factor- β and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev* [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Nov 26];220(1):199–213. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979848>
99. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. Epstein FH, editor. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 May 4 [cited 2017 Nov 26];342(18):1350–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793168>
100. Kulkarni AB, Karlsson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol* [Internet]. 1993 Jul [cited 2017 Nov 26];143(1):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8317552>
101. Taylor AW. Review of the activation of TGF- in immunity. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008 Oct 23 [cited 2017 Nov 26];85(1):29–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818372>
102. Khalil N. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* [Internet]. 1999 Dec [cited 2017 Nov 26];1(15):1255–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611753>
103. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 Jan 15 [cited 2017 Nov 26];116(Pt 2):217–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482908>
104. Stockis J, Dedobbeleer O, Lucas S. Role of GARP in the activation of latent TGF- β 1. *Mol Biosyst* [Internet]. 2017 Sep 26 [cited 2017 Dec 1];13(10):1925–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28795730>
105. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2017 Nov 26];149(2):353–63.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17521318>

106. Zhou C, Yang B, Tian Y, Jiao H, Zheng W, Wang J, et al. Immunomodulatory effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on lymphocytes. *Cell Immunol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Nov 26];272(1):33–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004796>
107. HEO JS, CHOI Y, KIM H-S, KIM HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med* [Internet]. 2016 Jan [cited 2017 Nov 26];37(1):115–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26719857>
108. Wu Y, Peng Y, Gao D, Feng C, Yuan X, Li H, et al. Mesenchymal Stem Cells Suppress Fibroblast Proliferation and Reduce Skin Fibrosis Through a TGF- β 3-Dependent Activation. *Int J Low Extrem Wounds* [Internet]. 2015 Mar 8 [cited 2017 Nov 26];14(1):50–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25858630>
109. Amable P, Teixeira MV, Carias RB, Granjeiro J, Borojevic R. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2014 Apr 16 [cited 2017 Nov 26];5(2):53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739658>
110. Tomic S, Djokic J, Vasilijic S, Vucevic D, Todorovic V, Supic G, et al. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp and Dental Follicle are Susceptible to Activation by Toll-Like Receptor Agonists. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Nov 26];20(4):695–708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731536>
111. Yang Y-H, Hsieh T-L, Ji AT-Q, Hsu W-T, Liu C-Y, Lee OK-S, et al. Stromal Tissue Rigidity Promotes Mesenchymal Stem Cell-Mediated Corneal Wound Healing Through the Transforming Growth Factor β Signaling Pathway. *Stem Cells* [Internet]. 2016 Oct [cited 2017 Nov 26];34(10):2525–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27250866>
112. De Oliveira GL V., De Lima KWA, Colombini AM, Pinheiro DG, Panepucci RA, Palma PVB, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Multiple Sclerosis Patients have Distinct Gene Expression Profile and Decreased Suppressive Function Compared with Healthy Counterparts. *Cell Transplant* [Internet]. 2015 Feb [cited 2017 Nov 26];24(2):151–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24256874>
113. Razmkhah M, Jaberipour M, Erfani N, Habibagahi M, Talei A, Ghaderi A. Adipose derived stem cells (ASCs) isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- β 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: Do they

- protect breast cancer cells from the immune response? *Cell Immunol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Nov 26];266(2):116–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20970781>
114. Serena C, Keiran N, Madeira A, Maymó-Masip E, Ejarque M, Terrón-Puig M, et al. Crohn's Disease Disturbs the Immune Properties of Human Adipose-Derived Stem Cells Related to Inflammasome Activation. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2017 Oct 10 [cited 2018 Jan 4];9(4):1109–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28966116>
 115. Massagué J. TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 1998 Jun [cited 2017 Nov 26];67(1):753–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759503>
 116. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* [Internet]. 2003 Jun 13 [cited 2017 Nov 26];113(6):685–700. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809600>
 117. Lebrin F, Goumans M-J, Jonker L, Carvalho RLC, Valdimarsdottir G, Thorikay M, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *EMBO J* [Internet]. 2004 Oct 13 [cited 2017 Nov 30];23(20):4018–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15385967>
 118. Churchman SM, Ponchel F, Boxall SA, Cuthbert R, Kouroupis D, Roshdy T, et al. Transcriptional profile of native CD271+ multipotential stromal cells: Evidence for multiple fates, with prominent osteogenic and Wnt pathway signaling activity. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2012 Aug [cited 2017 Nov 26];64(8):2632–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22378497>
 119. Levi B, Wan DC, Glotzbach JP, Hyun J, Januszyk M, Montoro D, et al. CD105 Protein Depletion Enhances Human Adipose-derived Stromal Cell Osteogenesis through Reduction of Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) Signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Nov 11 [cited 2017 Nov 26];286(45):39497–509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949130>
 120. Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bühring H-J. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* [Internet]. 2003 Feb [cited 2017 Nov 26];88(2):126–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12604402>
 121. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985 Jan [cited 2017 Nov 26];82(1):119–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3871521>

122. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* [Internet]. 2000 Oct 13 [cited 2017 Nov 26];103(2):295–309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057902>
123. Chase LG, Lakshmipathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2010 Apr 2 [cited 2017 Nov 26];1(1):8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20504289>
124. Walenda G, Abnaof K, Jousen S, Meurer S, Smeets H, Rath B, et al. TGF-beta1 Does Not Induce Senescence of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and Has Similar Effects in Early and Late Passages. Pesce M, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Oct 17 [cited 2017 Nov 26];8(10):e77656. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24147049>
125. Kim Y Il, Ryu J-S, Yeo JE, Choi YJ, Kim YS, Ko K, et al. Overexpression of TGF-β1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014 Aug 8 [cited 2017 Nov 26];450(4):1593–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035928>
126. Tapp H, Deepe R, Ingram JA, Kuremsky M, Hanley EN, Gruber HE. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: transforming growth factor beta and 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2008 [cited 2017 Nov 26];10(4):R89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691412>
127. Yuntao W, Qixin Z, Xiaodong G, Yongchao W, Jie H. Influence of exogenous TGFβ1 on the expression of Smad2 and Smad3 in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Huazhong Univ Sci Technol [Medical Sci]* [Internet]. 2005 Feb [cited 2017 Nov 26];25(1):68–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02831390>
128. Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, Gadelorge M, Sensébé L, Bourin P. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2014 Jan [cited 2017 Nov 26];18(1):104–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188055>
129. Im G-I, Jung N-H, Tae S-K. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Patients in Late Adulthood: The Optimal Conditions of Growth Factors. *Tissue Eng* [Internet]. 2006 Mar [cited 2017 Nov 26];12(3):527–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16579686>
130. Kale VP, Vaidya AA. Molecular Mechanisms Behind the Dose-Dependent

- Differential Activation of MAPK Pathways Induced by Transforming Growth Factor- β 1 in Hematopoietic Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2004 Oct [cited 2017 Nov 26];13(5):536–47. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588511>
131. Pepper M, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. Biphasic Effect of Transforming Growth Factor- β 1 on in Vitro Angiogenesis. *Exp Cell Res* [Internet]. 1993 Feb [cited 2017 Nov 26];204(2):356–63. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679998>
 132. Zhou W, Park I, Pins M, Kozlowski JM, Jovanovic B, Zhang J, et al. Dual regulation of proliferation and growth arrest in prostatic stromal cells by transforming growth factor-beta1. *Endocrinology* [Internet]. 2003 Oct [cited 2017 Nov 26];144(10):4280–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959966>
 133. Bhi R. EFFECTS OF TGF- β 1 ON BONE MARROW STEM CELLS PROLIFERATION, OSTEOGENIC DIFFERENTIATION AND MATURATION. *Regen Res* [Internet]. 2012 [cited 2017 Nov 26];1(2):20–6. Available from:
[http://regres.tesma.org.my/pdf/RR-101012-005\(4\).pdf](http://regres.tesma.org.my/pdf/RR-101012-005(4).pdf)
 134. Puetzer JL, Petitte JN, Lobo EG. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2010 Aug [cited 2017 Nov 26];16(4):435–44. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196646>
 135. Ahn J, Park E, Kim BJ, Kim J-S, Choi B, Lee S-H, et al. Transplantation of human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells highly expressing TGF β receptors in a rabbit model of disc degeneration. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015 Dec 2 [cited 2017 Nov 26];6(1):190. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26432097>
 136. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Exp Cell Res* [Internet]. 2001 Aug 15 [cited 2017 Nov 26];268(2):189–200. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478845>
 137. Kang S-W, Do H-J, Han I-B, Shin D-A, Kim HO, Kim J-H, et al. Increase of chondrogenic potentials in adipose-derived stromal cells by co-delivery of type I and type II TGF β receptors encoding bicistronic vector system. *J Control Release* [Internet]. 2012 Jun 28 [cited 2017 Nov 26];160(3):577–82. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522074>

138. Frisch J, Venkatesan JK, Rey-Rico A, Schmitt G, Madry H, Cucchiari M. Determination of the Chondrogenic Differentiation Processes in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Genetically Modified to Overexpress Transforming Growth Factor- β via Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Nov 26];25(12):1050–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25333854>
139. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF- β 1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* [Internet]. 2009 Jul 5 [cited 2017 Nov 26];15(7):757–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584867>
140. Zhou S. TGF- β regulates β -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* [Internet]. 2011 Jun [cited 2017 Nov 26];112(6):1651–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21344492>
141. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. miR-21 Regulates Adipogenic Differentiation Through the Modulation of TGF- β Signaling in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. *Stem Cells* [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 Nov 26];27(12):N/A-N/A. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816956>
142. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmi pathy U, et al. PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and oste. *Blood* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2017 Nov 26];112(2):295–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18332228>
143. Kurpinski K, Lam H, Chu J, Wang A, Kim A, Tsay E, et al. Transforming Growth Factor- β and Notch Signaling Mediate Stem Cell Differentiation into Smooth Muscle Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2010 Feb 9 [cited 2017 Nov 15];28(4):734–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20146266>
144. Song HY, Kim MY, Kim KH, Lee IH, Shin SH, Lee JS, et al. Synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis induces α -smooth muscle actin in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through a TGF- β 1-dependent mechanism. *Exp Mol Med* [Internet]. 2010 Aug 31 [cited 2017 Dec 10];42(8):565. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628268>
145. Liu H, Zhang C, Zhu S, Lu P, Zhu T, Gong X, et al. Mohawk Promotes the Tenogenesis of Mesenchymal Stem Cells Through Activation of the TGF β Signaling Pathway. *Stem Cells* [Internet]. 2015 Feb [cited 2017 Dec 10];33(2):443–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25332192>

146. Yin Z, Guo J, Wu T, Chen X, Xu L, Lin S, et al. Stepwise Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Augments Tendon-Like Tissue Formation and Defect Repair In Vivo. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2016 Aug [cited 2017 Dec 10];5(8):1106–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27280798>
147. Zhao W, Wang C, Liu R, Wei C, Duan J, Liu K, et al. Effect of TGF- β 1 on the Migration and Recruitment of Mesenchymal Stem Cells after Vascular Balloon Injury: Involvement of Matrix Metalloproteinase-14. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 16 [cited 2017 Nov 26];6(1):21176. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep21176>
148. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2017 Nov 26];21(2):216–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24185619>
149. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for Interferon- γ in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2006 Feb [cited 2017 Nov 26];24(2):386–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123384>
150. Travis MA, Sheppard D. TGF- β Activation and Function in Immunity. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2014 Mar 21 [cited 2017 Nov 26];32(1):51–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24313777>
151. Liu Y, Mu R, Wang S, Long L, Liu X, Li R, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2010 [cited 2017 Nov 26];12(6):R210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080925>
152. Zhao Z-G, Li W-M, Chen Z-C, You Y, Zou P. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow of Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Immunol Invest* [Internet]. 2008 Jan 7 [cited 2017 Nov 26];37(7):726–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821219>
153. Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, et al. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes. *Scand J Immunol* [Internet]. 2004 Sep [cited 2017 Nov 26];60(3):307–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15320889>
154. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, et al. Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*

- [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 Nov 26];27(8):1954–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544427>
155. English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett* [Internet]. 2008 Jan 15 [cited 2017 Nov 26];115(1):50–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022251>
 156. Xu C, Yu P, Han X, Du L, Gan J, Wang Y, et al. TGF- Promotes Immune Responses in the Presence of Mesenchymal Stem Cells. *J Immunol* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2017 Dec 28];192(1):103–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24293629>
 157. Yuan W, Collado-Hidalgo A, Yufit T, Taylor M, Varga J. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor- β : Selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J Cell Physiol* [Internet]. 1998 Oct [cited 2018 Jan 4];177(1):174–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9731757>
 158. Lerrer S, Liubomirski Y, Bott A, Abnaof K, Oren N, Yousaf A, et al. Co-Inflammatory Roles of TGF β 1 in the Presence of TNF α Drive a Pro-inflammatory Fate in Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 4];8:479. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28553282>
 159. Fujio K, Komai T, Inoue M, Morita K, Okamura T, Yamamoto K. Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2016 Sep [cited 2017 Nov 26];15(9):917–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27392504>
 160. Engela AU, Hoogduijn MJ, Boer K, Litjens NHR, Betjes MGH, Weimar W, et al. Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional *de-novo* regulatory T cells with methylated *FOXP3* gene DNA. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2017 Nov 26];173(2):343–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607314>
 161. Zhao W, Wang Y, Wang D, Sun B, Wang G, Wang J, et al. TGF- β expression by allogeneic bone marrow stromal cells ameliorates diabetes in NOD mice through modulating the distribution of CD4+ T cell subsets. *Cell Immunol* [Internet]. 2008 [cited 2017 Nov 26];253(1–2):23–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18675407>
 162. Kong Q, Sun B, Bai S, Zhai D, Wang G, Liu Y, et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF- β . *J Neuroimmunol* [Internet]. 2009 Feb 15 [cited 2017 Nov 26];207(1–2):83–91.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174310>

163. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* [Internet]. 2014 Jul 17 [cited 2017 Nov 27];41(1):14–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035950>
164. Noh MY, Lim SM, Oh K-W, Cho K-A, Park J, Kim K-S, et al. Mesenchymal Stem Cells Modulate the Functional Properties of Microglia via TGF- β Secretion. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2016 Nov [cited 2017 Nov 27];5(11):1538–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27400795>
165. Song X, Xie S, Lu K, Wang C. Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Asthma by Inducing Polarization of Alveolar Macrophages. *Inflammation* [Internet]. 2015 Apr 24 [cited 2017 Nov 27];38(2):485–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958014>
166. Garland JM, Quesenberry PJ, Hilton DJ (Douglas J. Colony-stimulating factors : molecular and cellular biology. [Internet]. M. Dekker; 1997 [cited 2017 Nov 27]. 566 p. Available from: <https://www.crcpress.com/Colony-Stimulating-Factors-Molecular--Cellular-Biology-Second-Edition/John-M-Garland/p/book/9780824794927>
167. Oida T, Xu L, Weiner HL, Kitani A, Strober W. TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *J Immunol* [Internet]. 2006 Aug 15 [cited 2017 Nov 27];177(4):2331–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887994>
168. Ostroukhova M, Qi Z, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Ray P, Ray A. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Apr 23 [cited 2017 Nov 15];116(4):996–1004. Available from: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI26490>
169. Fonseka M, Ramasamy R, Tan BC, Seow HF. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSC) inhibit the proliferation of K562 (human erythromyeloblastoid leukaemic cell line). *Cell Biol Int* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2017 Nov 28];36(9):793–801. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22335239>
170. Mele V, Muraro MG, Calabrese D, Pfaff D, Amatruda N, Amicarella F, et al. Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF- β . *Int J Cancer* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2017 Nov 28];134(11):2583–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24214914>

171. Mokarizadeh A, Delirezh N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid A-A, Mardani K. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett* [Internet]. 2012 Sep [cited 2017 Nov 28];147(1–2):47–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705267>
172. Favaro E, Carpanetto A, Lamorte S, Fusco A, Caorsi C, Deregibus MC, et al. Human mesenchymal stem cell-derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* [Internet]. 2014 Aug 17 [cited 2017 Nov 28];57(8):1664–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24838680>
173. Yang Z-Z, Grote DM, Ziesmer SC, Xiu B, Yates NR, Secreto FJ, et al. Soluble and Membrane-Bound TGF- β -Mediated Regulation of Intratumoral T Cell Differentiation and Function in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. Unutmaz D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Mar 15 [cited 2017 Nov 28];8(3):e59456. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555036>
174. Webber J, Steadman R, Mason MD, Tabi Z, Clayton A. Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2017 Nov 28];70(23):9621–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098712>
175. Glinka Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor -1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008 Apr 3 [cited 2017 Nov 28];84(1):302–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436584>
176. Oida T, Weiner HL. Overexpression of TGF- 1 Gene Induces Cell Surface Localized Glucose-Regulated Protein 78-Associated Latency-Associated Peptide/TGF-. *J Immunol* [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2017 Nov 12];185(6):3529–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720212>
177. Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, et al. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr* [Internet]. 2007 [cited 2017 Nov 28];13(4–5):217–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17605296>
178. Zhang M, Xu S, Han Y, Cao X. Apoptotic cells attenuate fulminant hepatitis by priming Kupffer cells to produce interleukin-10 through membrane-bound TGF- β . *Hepatology* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 Nov 28];53(1):306–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21140375>
179. Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with

- monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* [Internet]. 1988 Sep 15 [cited 2017 Nov 30];141(6):1925–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3262644>
180. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1990 May 25 [cited 2017 Nov 30];265(15):8361–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692830>
 181. St-Jacques S, Forte M, Lye SJ, Letarte M. Localization of endoglin, a transforming growth factor-beta binding protein, and of CD44 and integrins in placenta during the first trimester of pregnancy. *Biol Reprod* [Internet]. 1994 Sep [cited 2017 Nov 30];51(3):405–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528549>
 182. Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, et al. Endoglin Structure and Function. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Sep 1 [cited 2017 Nov 30];281(35):25110–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785228>
 183. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, Amlot P, Gazdar AF, King SW, et al. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1995 Dec [cited 2017 Nov 30];1(12):1623–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815965>
 184. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, et al. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int J cancer* [Internet]. 1999 May 17 [cited 2017 Nov 30];81(4):568–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225446>
 185. Graulich W, Nettelbeck DM, Fischer D, Kissel T, Müller R. Cell type specificity of the human endoglin promoter. *Gene* [Internet]. 1999 Feb 4 [cited 2017 Nov 30];227(1):55–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931433>
 186. Wang JM, Kumar S, Pye D, van Agthoven AJ, Krupinski J, Hunter RD. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. *Int J cancer* [Internet]. 1993 May 28 [cited 2017 Nov 30];54(3):363–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8509210>
 187. Jarocha D, Lukasiewicz E, Majka M. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells. *Folia Histochem Cytobiol* [Internet]. 2008 Dec 6 [cited 2018 Jan 4];46(3):307–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056534>

188. Lv F-J, Tuan RS, Cheung KMC, Leung VYL. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2018 Jan 4];32(6):1408–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.1681>
189. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2004 Jun 11 [cited 2017 Nov 30];2(1):18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193152>
190. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1992 Sep 25 [cited 2017 Nov 30];267(27):19027–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326540>
191. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* [Internet]. 2000 Apr 17 [cited 2017 Nov 30];19(8):1745–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775259>
192. Goumans M-J, Liu Z, ten Dijke P. TGF- β signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* [Internet]. 2009 Jan [cited 2017 Nov 30];19(1):116–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114994>
193. Ray BN, Lee NY, How T, Blobe GC. ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration. *Carcinogenesis* [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 Nov 30];31(3):435–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042635>
194. Bellón T, Corbi A, Lastres P, Calés C, Cebrián M, Vera S, et al. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- β -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* [Internet]. 1993 Sep [cited 2017 Nov 30];23(9):2340–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8370410>
195. Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodríguez-Barbero A, et al. S-Endoglin Expression Is Induced in Senescent Endothelial Cells and Contributes to Vascular Pathology. *Circ Res* [Internet]. 2008 Dec 5 [cited 2017 Nov 12];103(12):1383–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18974388>
196. Lastres P, Martín-Perez J, Langa C, Bernabéu C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J* [Internet]. 1994 Aug 1 [cited 2017 Nov 30];301 (Pt 3)(Pt 3):765–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8053900>

197. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* [Internet]. 2000 Jan [cited 2017 Nov 30];14(1):55–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10627280>
198. Lastres P, Letamendía A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, et al. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol* [Internet]. 1996 Jun [cited 2017 Nov 30];133(5):1109–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8655583>
199. Letamendía A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Dec 4 [cited 2017 Nov 30];273(49):33011–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830054>
200. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The Monoclonal Antibody SH-2, Raised against Human Mesenchymal Stem Cells, Recognizes an Epitope on Endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 Nov [cited 2017 Nov 30];265(1):134–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X99916200>
201. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2017 Nov 30];24(5):1294–301. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2005-0342>
202. Gaebel R, Furlani D, Sorg H, Polchow B, Frank J, Bieback K, et al. Cell Origin of Human Mesenchymal Stem Cells Determines a Different Healing Performance in Cardiac Regeneration. Emanueli C, editor. *PLoS One* [Internet]. 2011 Feb 10 [cited 2017 Nov 30];6(2):e15652. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015652>
203. Jiang T, Liu W, Lv X, Sun H, Zhang L, Liu Y, et al. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* [Internet]. 2010 May [cited 2017 Nov 30];31(13):3564–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210000669>
204. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers. *Stem Cells* [Internet]. 2006 Feb [cited 2017 Nov 30];24(2):376–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322640>
205. Jin HJ, Park SK, Oh W, Yang YS, Kim SW, Choi SJ. Down-regulation of CD105 is

- associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009 Apr 17 [cited 2017 Nov 12];381(4):676–81. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X09003969>
206. Rosu-Myles M, Fair J, Pearce N, Mehic J. Non-multipotent stroma inhibit the proliferation and differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Cytotherapy* [Internet]. 2010 Oct [cited 2017 Nov 30];12(6):818–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324910704473>
 207. Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* [Internet]. 2000 Oct [cited 2017 Nov 30];185(1):98–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942523>
 208. Arufe MC, De la Fuente A, Fuentes-Boquete I, De Toro FJ, Blanco FJ. Differentiation of synovial CD-105 + human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J Cell Biochem* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2017 Nov 30];108(1):145–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544399>
 209. Ishimura D, Yamamoto N, Tajima K, Ohno A, Yamamoto Y, Washimi O, et al. Differentiation of adipose-derived stromal vascular fraction culture cells into chondrocytes using the method of cell sorting with a mesenchymal stem cell marker. *Tohoku J Exp Med* [Internet]. 2008 Oct [cited 2017 Nov 30];216(2):149–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832797>
 210. Jiang T, Liu W, Lv X, Sun H, Zhang L, Liu Y, et al. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* [Internet]. 2010 May [cited 2017 Oct 28];31(13):3564–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210000669>
 211. Levi B, Wan DC, Glotzbach JP, Hyun J, Januszyk M, Montoro D, et al. CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Nov 11 [cited 2017 Nov 12];286(45):39497–509. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.256529>
 212. Ollendorff V, Szepietowski P, Mattei M-G, Gaudray P, Birnbaum D. New gene in the homologous human 11q13?q14 and mouse 7F chromosomal regions. *Mamm Genome* [Internet]. 1992 [cited 2018 Jan 5];2(3):195–200. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00302877>
 213. Goode EL, DeRycke M, Kalli KR, Oberg AL, Cunningham JM, Maurer MJ, et al. Inherited Variants in Regulatory T Cell Genes and Outcome of Ovarian Cancer.

- Scheurer M, editor. PLoS One [Internet]. 2013 Jan 30 [cited 2017 Dec 1];8(1):e53903. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382860>
214. Ollendorff V, Noguchi T, deLapeyriere O, Birnbaum D. The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins. *Cell Growth Differ* [Internet]. 1994 Feb [cited 2017 Nov 12];5(2):213–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8180135>
 215. Roubin R, Pizette S, Ollendorff V, Planche J, Birnbaum D, Delapeyriere O. Structure and developmental expression of mouse Garp, a gene encoding a new leucine-rich repeat-containing protein. *Int J Dev Biol* [Internet]. 1996 Jun [cited 2017 Dec 1];40(3):545–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840187>
 216. Macaulay IC, Tijssen MR, Thijssen-Timmer DC, Gusnanto A, Steward M, Burns P, et al. Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood* [Internet]. 2007 Apr 15 [cited 2017 Dec 1];109(8):3260–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192395>
 217. Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. Identification of a Regulatory T Cell Specific Cell Surface Molecule that Mediates Suppressive Signals and Induces Foxp3 Expression. Bozza P, editor. PLoS One [Internet]. 2008 Jul 16 [cited 2017 Dec 1];3(7):e2705. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002705>
 218. Oida T, Weiner HL. TGF- β Induces Surface LAP Expression on Murine CD4 T Cells Independent of Foxp3 Induction. Unutmaz D, editor. PLoS One [Internet]. 2010 Nov 24 [cited 2017 Dec 1];5(11):e15523. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015523>
 219. Barbet R, Peiffer I, Hatzfeld A, Charbord P, Hatzfeld JA. Comparison of Gene Expression in Human Embryonic Stem Cells, hESC-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2011 [cited 2017 Nov 12];2011:368192. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2011/368192/>
 220. Carambia A, Freund B, Schwinge D, Heine M, Laschtowitz A, Huber S, et al. TGF- β -dependent induction of CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* [Internet]. 2014 Sep [cited 2017 Dec 1];61(3):594–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24798620>
 221. Li Y, Kim B-G, Qian S, Letterio JJ, Fung JJ, Lu L, et al. Hepatic Stellate Cells Inhibit T Cells through Active TGF- β 1 from a Cell Surface-Bound Latent TGF- β 1/GARP Complex. *J Immunol* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2017 Dec 1];195(6):2648–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26246140>

222. Kehrmann A, Truong H, Repenning A, Boger R, Klein-Hitpass L, Pascheberg U, et al. Complementation of non-tumorigenicity of HPV18-positive cervical carcinoma cells involves differential mRNA expression of cellular genes including potential tumor suppressor genes on chromosome 11q13. *Cancer Genet* [Internet]. 2013 Jul 1 [cited 2017 Dec 1];206(7–8):279–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24042169>
223. Gauthy E, Cuende J, Stockis J, Huygens C, Lethé B, Collet J-F, et al. GARP Is Regulated by miRNAs and Controls Latent TGF- β 1 Production by Human Regulatory T Cells. Unutmaz D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Sep 30 [cited 2017 Dec 1];8(9):e76186. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076186>
224. Zhou Q, Haupt S, Prots I, Thümmeler K, Kremmer E, Lipsky PE, et al. miR-142-3p is involved in CD25+ CD4 T cell proliferation by targeting the expression of glycoprotein A repetitions predominant. *J Immunol* [Internet]. 2013 Jun 15 [cited 2017 Nov 16];190(12):6579–88. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1202993>
225. Hahn SA, Stahl HF, Becker C, Correll A, Schneider F-J, Tuettenberg A, et al. Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4+ T cells. *Blood* [Internet]. 2013 Aug 15 [cited 2018 Jan 5];122(7):1182–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818544>
226. Wang R, Zhu J, Dong X, Shi M, Lu C, Springer TA. GARP regulates the bioavailability and activation of TGF. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2012 Mar 15 [cited 2017 Nov 15];23(6):1129–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278742>
227. Edwards JP, Thornton AM, Shevach EM. Release of active TGF- β 1 from the latent TGF- β 1/GARP complex on T regulatory cells is mediated by integrin β 8. *J Immunol* [Internet]. 2014 Sep 15 [cited 2017 Dec 1];193(6):2843–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25127859>
228. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Aug 11 [cited 2017 Nov 15];106(32):13445–50. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0901944106>
229. Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One* [Internet]. 2008 Jul 16 [cited 2017 Dec 1];3(7):e2705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628982>

230. Edwards JP, Fujii H, Zhou AX, Creemers J, Unutmaz D, Shevach EM. Regulation of the expression of GARP/latent TGF- β 1 complexes on mouse T cells and their role in regulatory T cell and Th17 differentiation. *J Immunol* [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2017 Nov 15];190(11):5506–15. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1300199>
231. O'Connor MN, Salles II, Cvejic A, Watkins NA, Walker A, Garner SF, et al. Functional genomics in zebrafish permits rapid characterization of novel platelet membrane proteins. *Blood* [Internet]. 2009 May 7 [cited 2017 Dec 1];113(19):4754–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109564>
232. Vermeersch E, Denorme F, Maes W, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Edwards J, et al. The role of platelet and endothelial GARP in thrombosis and hemostasis. Ahrens I, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Mar 9 [cited 2017 Dec 1];12(3):e0173329. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0173329>
233. Metelli A, Wu BX, Fugle CW, Rachidi S, Sun S, Zhang Y, et al. Surface Expression of TGF β Docking Receptor GARP Promotes Oncogenesis and Immune Tolerance in Breast Cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2016 Dec 15 [cited 2017 Dec 1];76(24):7106–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27913437>
234. Probst-Kepper M, Geffers R, Kröger A, Viegas N, Erck C, Hecht H-J, et al. GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 Dec 26];13(9b):3343–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19453521>
235. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF- β on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 Dec 26];39(12):3315–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19750484>
236. Delgado M, Toscano MG, Benabdellah K, Cobo M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, et al. In vivo delivery of lentiviral vectors expressing vasoactive intestinal peptide complementary DNA as gene therapy for collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2017 Oct 26];58(4):1026–37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.23283>
237. Zhang X-Y, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P, Reiser J. Lentiviral Vectors for Sustained Transgene Expression in Human Bone Marrow-Derived Stromal Cells. *Mol Ther* [Internet]. 2002 May [cited 2017 Dec 29];5(5):555–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991746>
238. Toscano MG, Frecha C, Benabdellah K, Cobo M, Blundell M, Thrasher AJ, et al. Hematopoietic-Specific Lentiviral Vectors Circumvent Cellular Toxicity Due to

- Ectopic Expression of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2008 Feb [cited 2017 Oct 26];19(2):179–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18240968>
239. Toscano MG, Anderson P, Munoz P, Lucena G, Cobo M, Benabdellah K, et al. Use of zinc-finger nucleases to knock out the WAS gene in K562 cells: a human cellular model for Wiskott-Aldrich syndrome. *Dis Model Mech* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2017 Oct 28];6(2):544–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23324327>
 240. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2008 Feb 7 [cited 2017 Nov 12];2(2):141–50. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590907003141>
 241. Li C, Guo B, Ding S, Rius C, Langa C, Kumar P, et al. TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res* [Internet]. 2003 [cited 2017 Nov 12];23(2B):1189–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820370>
 242. Russell KC, Tucker HA, Bunnell BA, Andreeff M, Schober W, Gaynor AS, et al. Cell-Surface Expression of Neuron-Glial Antigen 2 (NG2) and Melanoma Cell Adhesion Molecule (CD146) in Heterogeneous Cultures of Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Nov 12];19(19–20):2253–66. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2012.0649>
 243. Fonsatti E, Jekunen AP, Kairemo KJ, Coral S, Snellman M, Nicotra MR, et al. Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2000 May [cited 2017 Nov 12];6(5):2037–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815930>
 244. Hawinkels LJAC, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, et al. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* [Internet]. 2010 May 15 [cited 2017 Nov 12];70(10):4141–50. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-4466>
 245. Spiropoulos A, Theodosaki M, Stefanaki K, Paterakis G, Tzetis M, Giannikou K, et al. Rapid clinical-scale propagation of mesenchymal stem cells using cultures initiated with immunoselected bone marrow CD105+ cells. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2011 Sep [cited 2017 Nov 12];15(9):1983–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2010.01157.x>

246. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmiopathy U, et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and o. *Blood* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2017 Nov 12];112(2):295–307. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-07-103697>
247. Jiang T, Liu W, Lv X, Sun H, Zhang L, Liu Y, et al. Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* [Internet]. 2010 May [cited 2017 Nov 12];31(13):3564–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210000669>
248. Kawashima I, Ohsumi J, Mita-Honjo K, Shimoda-Takano K, Ishikawa H, Sakakibara S, et al. Molecular cloning of cDNA encoding adipogenesis inhibitory factor and identity with interleukin-11. *FEBS Lett* [Internet]. 1991 Jun 3 [cited 2017 Nov 12];283(2):199–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1828438>
249. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2011 Jul 8 [cited 2017 Nov 12];9(1):11–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590911002943>
250. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* [Internet]. 2007 Aug [cited 2017 Nov 12];25(8):2025–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2006-0548>
251. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2017 Nov 12];109(1):228–34. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2006-02-002246>
252. Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2017 Nov 12];58(7):929–39. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2008.168534>
253. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* [Internet]. 2009 Jan 21 [cited 2017 Nov 12];15(1):42–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.1905>
254. Chan D V, Somani A-K, Young AB, Massari J V, Ohtola J, Sugiyama H, et al. Signal

- peptide cleavage is essential for surface expression of a regulatory T cell surface protein, leucine rich repeat containing 32 (LRR32). *BMC Biochem* [Internet]. 2011 May 26 [cited 2017 Nov 12];12(1):27. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/12/27>
255. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRR32) is essential for the surface expression of latent TGF- β on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009 Aug 11 [cited 2017 Nov 12];106(32):13445–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651619>
256. Gauthy E, Cuende J, Stockis J, Huygens C, Lethé B, Collet J-F, et al. GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF- β 1 production by human regulatory T cells. Unutmaz D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Sep 30 [cited 2017 Nov 15];8(9):e76186. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076186>
257. Fierro FA, Kalomoiris S, Sondergaard CS, Nolte JA. Effects on proliferation and differentiation of multipotent bone marrow stromal cells engineered to express growth factors for combined cell and gene therapy. *Stem Cells* [Internet]. 2011 Nov [cited 2017 Nov 15];29(11):1727–37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.720>
258. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1. *J Immunol* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2017 Nov 15];182(1):240–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109155>
259. Zhou AX, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. GARP-TGF- β Complexes Negatively Regulate Regulatory T Cell Development and Maintenance of Peripheral CD4+ T Cells In Vivo. *J Immunol* [Internet]. 2013 May 15 [cited 2017 Nov 16];190(10):5057–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23576681>
260. Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schönthal AH, Katula KS, et al. Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1999 Nov [cited 2017 Nov 17];10(11):3607–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564259>
261. Woodbine L, Brunton H, Goodarzi AA, Shibata A, Jeggo PA. Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2011 Sep [cited 2017 Dec 6];39(16):6986–97. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkr331>

262. Gottlieb E, Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2017 Dec 6];20(15):5680–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10891504>
263. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J* [Internet]. 1999 Nov 1 [cited 2017 Dec 6];18(21):6027–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10545114>
264. Schroder K, Wandzioch K, Helmcke I, Brandes RP. Nox4 Acts as a Switch Between Differentiation and Proliferation in Preadipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2017 Dec 6];29(2):239–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057021>
265. Wu J, Niu J, Li X, Wang X, Guo Z, Zhang F. TGF- β 1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC Dev Biol* [Internet]. 2014 May 18 [cited 2017 Dec 6];14(1):21. Available from: <http://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-213X-14-21>
266. Zhang F, Ren T, Wu J. TGF- β 1 induces apoptosis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulation of mitochondrial reactive oxygen species production. *Exp Ther Med* [Internet]. 2015 Sep [cited 2017 Dec 7];10(3):1224–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26622469>
267. Zhang Y, Carr T, Dimtchev A, Zaer N, Dritschilo A, Jung M. Attenuated DNA Damage Repair by Trichostatin A through BRCA1 Suppression. *Radiat Res* [Internet]. 2007 Jul [cited 2017 Dec 9];168(1):115–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722998>
268. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, et al. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* [Internet]. 1999 May 28 [cited 2017 Dec 28];284(5419):1534–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348742>
269. Young K, Conley B, Romero D, Tweedie E, O'Neill C, Pinz I, et al. BMP9 regulates endoglin-dependent chemokine responses in endothelial cells. *Blood* [Internet]. 2012 Nov 15 [cited 2017 Dec 28];120(20):4263–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23018639>
270. Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella L-M, Banville D, Vary CPH, Bernabéu C. Endoglin Regulates Cytoskeletal Organization through Binding to ZRP-1, a Member of the Lim Family of Proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Jul 30 [cited 2017 Dec 28];279(31):32858–68. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15148318>

271. Salazar KD, Lankford SM, Brody AR. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF- β ₁ that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2017 Dec 28];297(5):L1002–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734317>
272. Augello A, De Bari C. The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2010 Oct [cited 2017 Dec 28];21(10):1226–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804388>
273. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KSR, Chase L, Lakshmiopathy U, et al. PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and oste. *Blood* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2017 Dec 28];112(2):295–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18332228>
274. Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, Stagg J, Galipeau J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2017 Dec 28];179(3):1549–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641021>
275. Nassiri F, Cusimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, et al. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res* [Internet]. 2011 Jun [cited 2017 Dec 28];31(6):2283–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737653>
276. Bernabeu C, Conley BA, Vary CPH. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem* [Internet]. 2007 Dec 15 [cited 2017 Dec 28];102(6):1375–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17975795>
277. Choy L, Skillington J, Derynck R. Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol* [Internet]. 2000 May 1 [cited 2017 Dec 28];149(3):667–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791980>
278. Berg DT, Gupta A, Richardson MA, O'Brien LA, Calnek D, Grinnell BW. Negative Regulation of Inducible Nitric-oxide Synthase Expression Mediated through Transforming Growth Factor- β -dependent Modulation of Transcription Factor TCF11. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Dec 21 [cited 2017 Dec 28];282(51):36837–44.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928287>

279. Sugiyama Y, Kakoi K, Kimura A, Takada I, Kashiwagi I, Wakabayashi Y, et al. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the suppression of iNOS synthesis in macrophages by regulating IRF3 and STAT1 pathways. *Int Immunol* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2017 Dec 28];24(4):253–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331441>
280. Zhu H, Guo Z-K, Jiang X-X, Li H, Wang X-Y, Yao H-Y, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc* [Internet]. 2010 Mar 25 [cited 2017 Dec 28];5(3):550–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203670>
281. Barbet R, Peiffer I, Hatzfeld A, Charbord P, Hatzfeld JA. Comparison of Gene Expression in Human Embryonic Stem Cells, hESC-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2011 [cited 2017 Nov 12];2011:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/sci/2011/368192/>
282. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, et al. Latent TGF- β structure and activation. *Nature* [Internet]. 2011 Jun 16 [cited 2017 Dec 28];474(7351):343–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677751>
283. Han Y, Guo Q, Zhang M, Chen Z, Cao X. CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2017 Dec 28];182(1):111–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19109141>
284. Pap E, Pállinger É, Falus A. The role of membrane vesicles in tumorigenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2017 Dec 28];79(3):213–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20884225>
285. Dabovic B, Chen Y, Colarossi C, Obata H, Zambuto L, Perle MA, et al. Bone abnormalities in latent TGF-[beta] binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-[beta] bioavailability. *J Cell Biol* [Internet]. 2002 Jan 21 [cited 2017 Dec 28];156(2):227–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790802>
286. Flaumenhaft R, Abe M, Sato Y, Miyazono K, Harpel J, Heldin CH, et al. Role of the latent TGF-beta binding protein in the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. *J Cell Biol* [Internet]. 1993 Feb [cited 2017 Dec 28];120(4):995–1002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432736>
287. Shi M, Liu Z-W, Wang F-S. Immunomodulatory properties and therapeutic

- application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Dec 28];164(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21352202>
288. Yang Y, Pan X, Lei W, Wang J, Song J. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene* [Internet]. 2006 Nov 26 [cited 2017 Dec 29];25(55):7235–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799646>
289. Li Y, Qin Y, Yang C, Zhang H, Li Y, Wu B, et al. Cardamonin induces ROS-mediated G2/M phase arrest and apoptosis through inhibition of NF- κ B pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis* [Internet]. 2017 Aug 31 [cited 2017 Dec 29];8(8):e3024. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29048425>
290. Yu P, Zhang C, Gao C-Y, Ma T, Zhang H, Zhou M-M, et al. Anti-proliferation of triple-negative breast cancer cells with physagulide P: ROS/JNK signaling pathway induces apoptosis and autophagic cell death. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Sep 8 [cited 2017 Dec 29];8(38):64032–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28969050>
291. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* [Internet]. 2005 Feb 25 [cited 2017 Dec 29];120(4):483–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734681>
292. Valle-Prieto A, Conget PA. Human Mesenchymal Stem Cells Efficiently Manage Oxidative Stress. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2010 Dec [cited 2017 Dec 29];19(12):1885–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380515>
293. Lyublinskaya OG, Borisov YG, Pugovkina NA, Smirnova IS, Obidina J V, Ivanova JS, et al. Reactive Oxygen Species Are Required for Human Mesenchymal Stem Cells to Initiate Proliferation after the Quiescence Exit. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2015 [cited 2017 Dec 29];2015:502105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26273423>
294. Sart S, Song L, Li Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2015 Jul 27 [cited 2017 Dec 29];2015:1–14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/105135/>
295. Tormos KV, Anso E, Hamanaka RB, Eisenbart J, Joseph J, Kalyanaraman B, et al. Mitochondrial Complex III ROS Regulate Adipocyte Differentiation. *Cell Metab* [Internet]. 2011 Oct 5 [cited 2017 Dec 29];14(4):537–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982713>

296. Udartseva OO, Lobanova M V, Andreeva ER, Buravkov S V, Ogneva I V, Buravkova LB. Acute Hypoxic Stress Affects Migration Machinery of Tissue O₂-Adapted Adipose Stromal Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016 [cited 2017 Dec 29];2016:7260562. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115943>
297. Borodkina A, Shatrova A, Abushik P, Nikolsky N, Burova E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2014 Jun 12 [cited 2017 Dec 29];6(6):481–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24934860>
298. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* [Internet]. 1993 Apr 22 [cited 2017 Dec 29];362(6422):709–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8469282>
299. Vilenchik MM, Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: Production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2003 Oct 28 [cited 2017 Dec 29];100(22):12871–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14566050>
300. Zhang F, Ren T, Wu J, Niu J. Small concentrations of TGF- β 1 promote proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via activation of Wnt/ β -catenin pathway. *Indian J Exp Biol* [Internet]. 2015 Aug [cited 2017 Dec 29];53(8):508–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26349313>
301. Noubade R, Wong K, Ota N, Rutz S, Eidenschenk C, Valdez PA, et al. NRROS negatively regulates reactive oxygen species during host defence and autoimmunity. *Nature* [Internet]. 2014 May 13 [cited 2017 Dec 30];509(7499):235–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739962>
302. Hurov KE, Cotta-Ramusino C, Elledge SJ. A genetic screen identifies the Triple T complex required for DNA damage signaling and ATM and ATR stability. *Genes Dev* [Internet]. 2010 Sep 1 [cited 2017 Dec 30];24(17):1939–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810650>
303. Luo J, Emanuele MJ, Li D, Creighton CJ, Schlabach MR, Westbrook TF, et al. A Genome-wide RNAi Screen Identifies Multiple Synthetic Lethal Interactions with the Ras Oncogene. *Cell* [Internet]. 2009 May 29 [cited 2017 Dec 30];137(5):835–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490893>
304. Huygens C, Liénart S, Dedobbeleer O, Stockis J, Gauthy E, Coulie PG, et al. Lysosomal-associated Transmembrane Protein 4B (LAPTM4B) Decreases Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1) Production in Human Regulatory T Cells. *J*

- Biol Chem [Internet]. 2015 Aug 14 [cited 2017 Dec 30];290(33):20105–16.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126825>
305. Zhang Y, Wu BX, Metelli A, Thaxton JE, Hong F, Rachidi S, et al. GP96 is a GARP chaperone and controls regulatory T cell functions. *J Clin Invest* [Internet]. 2015 Feb 2 [cited 2017 Dec 30];125(2):859–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25607841>
306. Zuehlke A, Johnson JL. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. Gestwicki JE, editor. *Biopolymers* [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 Dec 30];93(3):211–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19697319>
307. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett* [Internet]. 2003 Apr 10 [cited 2017 Dec 30];540(1–3):3–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12681474>
308. Shi D, Li X, Chen H, Che N, Zhou S, Lu Z, et al. High level of reactive oxygen species impaired mesenchymal stem cell migration via overpolymerization of F-actin cytoskeleton in systemic lupus erythematosus. *Pathol Biol* [Internet]. 2014 Dec [cited 2017 Dec 30];62(6):382–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25239279>
309. Song H, Cha M-J, Song B-W, Kim I-K, Chang W, Lim S, et al. Reactive Oxygen Species Inhibit Adhesion of Mesenchymal Stem Cells Implanted into Ischemic Myocardium via Interference of Focal Adhesion Complex. *Stem Cells* [Internet]. 2010 Mar 31 [cited 2017 Dec 30];28(3):N/A-N/A. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20073042>
310. Denu RA, Hematti P. Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 [cited 2017 Dec 30];2016:1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27413419>

ANEXO I: PUBLICACIÓN

Mesenchymal Stromal Cells Express GARP/LRRC32 on Their Surface: Effects on Their Biology and Immunomodulatory Capacity

ANA BELÉN CARRILLO-GÁLVEZ, MARIÉN COBO, SARA CUEVAS-OCAÑA, ALEJANDRA GUTIÉRREZ-GUERRERO, ALMUDENA SÁNCHEZ-GILBERT, PIERPAOLO BONGARZONE, ANGÉLICA GARCÍA-PÉREZ, PILAR MUÑOZ, KARIM BENABDELLAH, MIGUEL G. TOSCANO, FRANCISCO MARTÍN, PER ANDERSON

Key Words. Glycoprotein A repetitions predominant • Leucine-rich repeat containing 32 • Mesenchymal stem cells • Membrane bound TGF- β 1 • Proliferation • Immunomodulation

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSCs) represent a promising tool for therapy in regenerative medicine, transplantation, and autoimmune disease due to their trophic and immunomodulatory activities. However, we are still far from understanding the mechanisms of action of MSCs in these processes. Transforming growth factor (TGF)- β 1 is a pleiotropic cytokine involved in MSC migration, differentiation, and immunomodulation. Recently, glycoprotein A repetitions predominant (GARP) was shown to bind latency-associated peptide (LAP)/TGF- β 1 to the cell surface of activated Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) and megakaryocytes/platelets. In this manuscript, we show that human and mouse MSCs express GARP which presents LAP/TGF- β 1 on their cell surface. Silencing GARP expression in MSCs increased their secretion and activation of TGF- β 1 and reduced their proliferative capacity in a TGF- β 1-independent manner. Importantly, we showed that GARP expression on MSCs contributed to their ability to inhibit T-cell responses *in vitro*. In summary, we have found that GARP is an essential molecule for MSC biology, regulating their immunomodulatory and proliferative activities. We envision GARP as a new target for improving the therapeutic efficacy of MSCs and also as a novel MSC marker. *STEM CELLS* 2015;33:183–195

INTRODUCTION

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are nonhematopoietic, multipotent cells with self-renewal capacity present in virtually all tissues. Their secretion of growth factors and potent immunomodulatory properties make them a promising tool for therapy in inflammatory/autoimmune diseases. Although MSC therapy is deemed safe, several phase III clinical trials using MSCs for the treatment of inflammatory/autoimmune diseases have failed to show any significant clinical benefit [1, 2]. It has become clear that we need a better characterization of the MSC preparations and a better understanding of MSC biology, including the mechanisms behind their immunomodulatory capacity.

The transforming growth factors- β (TGF- β 1, 2, and 3) are pleiotropic molecules involved in multiple biological processes including development, control of stem cell behavior, carcinogenesis, tissue homeostasis and regeneration, and immune responses [3–5]. TGF- β 1 is produced by MSCs and has been demonstrated to promote fibroblast proliferation and to participate in MSC-mediated immunomodulation [6–8]. TGF- β 1 also

directly influences MSCs, affecting both their migration and differentiation [9, 10] highlighting the importance of TGF- β 1 for the therapeutic activity of MSCs. The TGF- β s are produced as precursor peptides consisting of the mature TGF- β domain and the latency-associated peptide (LAP) domain. The precursor peptide is cleaved by the endoprotease furin, thus separating the two domains and LAP then associates noncovalently with the mature TGF- β peptide forming the small latency complex (SLC). LAP maintains TGF- β biologically inactive and its removal enables TGF- β to bind to its receptors and induce signaling [11]. Inside the cell, the SLC normally associates with latent TGF- β binding proteins (LTBPs) forming the large latency complex, which is then secreted and anchored to the extracellular matrix (ECM) [12, 13] where TGF- β can be activated by reactive oxygen species, low pH, integrins, proteases, and thrombospondin-1 [14]. Recently, glycoprotein A repetitions predominant (GARP), also called leucine-rich repeat containing 32 (LRRC32) [15], was shown to bind LAP/TGF- β 1 and present it on the cell membrane of platelets

GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalucian Regional Government, PTS Granada, Granada, Spain

Correspondence: Per Anderson, Ph.D., GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalucian Regional Government, PTS Granada, Avenida de la Ilustración 114, 18016 Granada, Spain. Telephone: 34-958-715500; Fax: 34-958-637071; e-mail: per.anderson@genyo.es; or Francisco Martín, Ph.D., GENYO, Centre for Genomics and Oncological Research, Pfizer/University of Granada/Andalucian Regional Government, PTS Granada, Avenida de la Ilustración 114, 18016 Granada, Spain. Telephone: 34-958-715500; Fax: 34-958-637071; email: francisco.martin@genyo.es

Received November 28, 2013; accepted for publication August 10, 2014; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* September 2, 2014.

© AlphaMed Press 1066-5099/2014/\$30.00/0

http://dx.doi.org/10.1002/stem.1821

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

and activated CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) [16, 17]. Several cell types express membrane bound TGF- β 1 (mbTGF- β 1) including immature dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells [18–20] but GARP expression has so far only been described on the surface of activated Tregs and megakaryocytes/platelets [17, 21]. GARP regulates the bioavailability of TGF- β 1 and its role has primarily been studied in the context of T-cell differentiation and function where GARP-bound LAP/TGF- β 1 on Tregs is involved in both infectious tolerance and the induction of T-helper (Th)–17 cells [22, 23]. Recently, expression of mbTGF- β 1 was found on human umbilical cord blood-derived MSCs [24] and on microvesicles prepared from murine bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) [25]. However, how TGF- β 1 is attached to the cell surface of MSCs and the role of mbTGF- β 1 in MSC biology and therapeutic efficacy are unknown. In this report, we show that GARP is expressed on the surface of mouse and human MSCs colocalizing with mbTGF- β 1. Silencing of GARP in MSCs reduced the surface expression of LAP/TGF- β 1 while increasing its secretion and activation. Interestingly, MSCs lacking GARP exhibited an impaired proliferative capacity and were less efficient in suppressing the proliferation of T cells *in vitro*. In summary, this study highlights the importance of GARP for MSC biology and function, adding a new molecule that can be modulated when aiming to improve the therapeutic efficacy of MSCs for the treatment of autoimmune/inflammatory diseases.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male BALB/c (6–10 weeks; Charles River, Barcelona, Spain, www.crivier.com) were used to initiate cultures of mASCs and mBM-MSCs or for the generation of splenocyte cell suspensions. All experiments were performed according to the Institutional Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals in Research and with the approval of the local ethics committee at the H. U. Virgen Macarena in Seville, Spain.

Isolation and Culturing of MSCs

Abdominal (epididymal) and subcutaneous (inguinal) fat from BALB/c mice (Charles River) were processed as previously described [26]. Cells were resuspended in complete MesenCult medium (Stem Cell, Grenoble, France, www.stemcell.com) and seeded at a density of 20,000–30,000 cells per square centimeter and cultured at 5% O₂/5% CO₂ at 37°C. Subsequent passages were plated at 10,000 cells per square centimeter. BM-MSCs were obtained by flushing femurs and tibiae of male BALB/c mice and adding 1.5 × 10⁶ cells per square centimeter in cell culture flasks. Human ASCs were obtained from Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (Granada, Spain) and cultured in advanced Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, www.lifetechnologies.com), Glutamax (GIBCO, Grand Island, NY, www.lifetechnologies.com), and 100 U/ml penicillin/streptomycin (GIBCO). The phenotypic characterization and differentiation of mASCs into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes were

performed as previously described [27] (Supporting Information Fig. S1). All experiments using human samples were performed according to the Institutional Guidelines and approved by the ethics committee of the H.U. Virgen de Macarena.

Lentiviral Vector Production and ASC Transduction

MISSION shRNA plasmid DNAs specific for mouse GARP (LRRC32) (RefSeq: SHCLND-NM_001113379; two different mouse GARP/LRRC32-specific shRNA plasmids were used, referred to in the manuscript as LV#3 and LV#6), for human GARP (RefSeq: SHCLND-NM_005512; two different human GARP/LRRC32-specific shRNA plasmids were used, referred to in the manuscript as LV#18 and LV#19) and a MISSION pLKO.1-puro nonmammalian shRNA control plasmid (all from Sigma Aldrich, St Louis, MO, www.sigmaldrich.com) were amplified using One Shot Stbl3 *Escherichia coli* (Invitrogen) grown at 30°C. Lentiviral vectors (LVs) were produced by cotransfecting 293T cells with: (a) vector shRNA plasmid, (b) packaging plasmid pCMVΔR8.91, and (c) envelope plasmid pMD.G, using Lipofectamine In Vitro DNA Transfection Reagent (Ver. II; SigmaGen Laboratories, Rockville, MD, www.signagen.com) and concentrated as previously described [28]. For transduction of ASCs, 0.7 × 10⁶ ASCs (passages 2–4) were mixed with the concentrated virus, left at room temperature for 10 minutes, and subsequently seeded in six-well plates and maintained at 5% O₂; 5% CO₂ at 37°C for 5 hours. Cells were then washed, seeded in T75 flasks, and incubated at 5% O₂; 5% CO₂ at 37°C. GARP expression was assayed by flow cytometry and RT-qPCR on days 3 and 5 after transduction, respectively. Vector copy number per transduced ASC was determined by qPCR, using the QuantiTect SYBRGreen PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany, www.qiagen.com), performed on an MX3005Pro sequence detection system (Stratagene, La Jolla, CA, www.stratagene.com) as previously described [29]. For the different LV-transduced cells, the following primers were used: puromycin FW: 5'-TGCAAGAACTCTCTCCTCAGC-3', puromycin RV: 5'-AGGCCTTCCATCTGTGCT-3'. Tenfold increasing amounts of plasmid DNA (10² up to 1 × 10⁷ copies) were used to determine the standard curve in each experiment.

Detection of Surface and Intracellular GARP and LAP/TGF- β 1 Expression

For LAP/TGF- β 1 staining, mASCs were plated at 5,000 cells per square centimeter and after 24–48 hours cells were harvested using phosphate buffered saline (PBS) with 2 mM EDTA. Cells were incubated with 7AAD (Sigma-Aldrich) and 2.4G2 (for mASCs; eBioscience, San Diego, CA, www.eBioscience.com) followed by anti-mouse LAP/TGF- β 1 (TW7-16B4) or anti-human LAP/TGF- β 1 (TW4-6H10) (Biolegend, San Diego, CA, www.biolegend.com) followed by goat anti-mouse IgG-APC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, www.jacksonimmuno.com) or a donkey anti-mouse IgG-Alexa488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, www.lifetechnologies.com), respectively. For GARP expression, ASCs were harvested using TrypLE (Gibco) and stained for murine GARP (Garp-PE; YGIC86), with or without Sca-1, or human GARP (GARP-eFluor660; G14D9) all from eBioscience. For GARP staining of human platelets, blood from healthy volunteers was collected in EDTA tubes and centrifuged at 400g for 7 minutes to obtain the platelet-containing supernatant. Platelets were then precipitated at 800g for 7 minutes and washed with PBS, centrifuged again at 400g to discard cellular

contaminants and counted. 10^6 human platelets were then stained for human GARP (GARP-eFluor660; G14D9) and CD41a-PE (HIP8; eBioscience). For intracellular staining of GARP, ASCs were fixed, permeabilized, and stained using the BD Cytofix/Cytoperm kit according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Diego, CA, www.bdbiosciences.com). Cells were acquired on a FACS Canto II flow cytometer and analyzed using the FACS Diva software (BD Biosciences). Corresponding isotype controls were used for determining background staining.

mRNA Analysis by RT-qPCR

Total RNA was obtained using the Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were reverse-transcribed using the Superscript first-strand system (Invitrogen) and qPCRs were performed using the QuantiTect SYBR-Green PCR kit (Qiagen) on a Stratagene MX3005P system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, www.agilent.com). Mouse-specific Primers: GARP FW: 5'-ACCAGATCCCTGCTACTCTG-3', GARP RV: 5'-ACGAAGCGCTGTATAGAAGC-3'; TGF- β 1 FW: 5'-TGCGCTGCAGAG ATAAAA-3', TGF- β 1 RV: 5'-AGCCCTGT ATCCGCTCTCT-3'; IL-11 FW: 5'-TCTTCCCTAAAGACTCTGG-3', IL-11 RV: 5'-TTCAAGTCCGAG TCACAGTC-3'; cnn-1 FW: 5'-AC AAGAGCGGAGATTGAGC-3', cnn-1 RV: 5'-TGAGTGTGTG CAGTGTTC-3'; HES1 FW: 5'-CGGCATTCCAA GCTAGAGAAG-3', HES1 RV: 5'-GGTAGTCTATGGCGTGTGATCTG-3'; β -actin FW: 5'-AATCGTGGTACATCAAAG-3', β -actin RV: 5'-ATGCCACAGGATT CCATACC-3'. Human-specific primers: GARP FW: 5'-ACAACACC AAGCAAAGTGC-3', GARP RV: 5'-ACGAAGTGTGTGTAGAAGC-3'; IL-11 FW: 5'-GACCTACTGTCTACTCTGCG-3', IL-11 RV: 5'-AGTCTTCAAGCAGCAGTC-3'; GAPDH FW: 5'-ATGGGGAAG GT GAAGTCG-3', GAPDH RV: 5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'.

Western Blot

Cells were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors (both from Sigma Aldrich) at 1×10^6 cells/100 μ l. The lysates (20 μ g/sample) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% polyacrylamide under reducing conditions) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, www.bio-rad.com). Membranes were blocked with 5% nonfat milk and probed with anti-LRR32 (Plato-1; ENZO Life Sciences, Ann Arbor, MI, www.enzolifesciences.com) at 1:500 dilution at 4°C overnight, followed by 1 hour of incubation with goat anti-mouse IgG-IRDye680 (1:20,000 dilution; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, www.lifcor.com). Protein was detected using an Odyssey Image scanner system (LI-COR Biosciences).

Confocal Microscopy

For LAP/GARP costaining, mASCs were harvested with EDTA as described above and stained with GARP-PE (YGIC86; eBioscience) and purified anti-mouse LAP/TGF- β 1 (TW7-16B4) followed by a donkey anti-mouse IgG-Alexa488 (Molecular Probes). For phospho-Smad2/3 staining, NT, CTRL-LV, LV#3, and LV#6 mASCs were plated in Lab-Tek II cc^2 eight-well chamber slides (Nalgen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, www.thermofisher.com) at 5,000 cells/well and cultured in MesenCult supplemented with 0.2% FCS for 2 days. Cells were stained for phospho-Smad2/3 (rabbit anti-mouse/human phospho-Smad2 [Ser465/467]/Smad3 [Ser423/425]; Cell Signaling Technologies, Beverly, MA www.cellsignal.com) followed by a goat anti-rabbit Alexa555 Ab (Molecular Probes) according to the manufacturer's protocol. Slides were mounted using Slowfade Gold antifade reagent containing DAPI (Molecular Probes).

www.StemCells.com

Images were acquired on a Zeiss LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany, www.zeiss.com). The extent of colocalization (overlapping coefficient according to Mander) was calculated using the ZEN 2010 software (Carl Zeiss).

Analysis of mASC Proliferation

Proliferation of ASCs was measured using the xCelligence real-time cell analyzer system from Roche (Roche Applied Science, Penzberg, Germany, www.roche.com). In brief, 800 cells/well of NT, LV-CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs or NT, LV-CTRL, LV#18, and LV#19 hASCs were added to 16-well E-plates as described previously [30]. The E-plates were then placed on the device station in the incubator (normoxia; 5% CO₂ at 37°C) for continuous recording of impedance, as reflected by cell index. In some experiments, a TGF- β 1/2/3-neutralizing antibody (1D11; R&D Systems, Minneapolis, MN, www.rndsystems.com) or SB431542 (Sigma) was added on days 1 and 3 to the wells at 2.5 μ g/ml and 10 μ M, respectively. Cell proliferation was also assayed using the CellTiter-Blue reagent, according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, WI, www.promega.com). In brief, NT, LV-CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs were seeded in 96-well plates (800 cells/well) and cultured at 5% O₂/5% CO₂ at 37°C. On days 1, 3, and 7, CellTiter-Blue was added to the cells during the last 4 hours of culture and fluorescence was measured at 560 nm on a Glomax multidetection system (Promega).

Assessment of the Immunomodulatory Activity of mASCs In Vitro

Cocultures of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled splenocytes and mitomycin C-treated mASCs (NT, LV-CTRL, LV#3, and LV#6) were set up as previously described [27]. Cell division was analyzed using the FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, www.flowjo.com). Culture supernatants were assayed for NO₂ content using the Griess assay as previously described [27]. In some mASC:splenocyte cocultures, Compound E (Enzo Life Sciences) were added at 50, 100, and 500 nM. For analyzing the expression of HES1 in responder T cells, ASC:splenocyte cocultures were set up as described above. After 1 day of stimulation, the splenocytes were collected and used for RT-qPCR for HES1. Splenic natural killer (NK) cells were purified using the NK cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, www.miltenyibiotec.com) according to the manufacturer's instructions. NK cells (60,000 cells) were added to mitomycin C-treated NT, LV-CTRL, LV#3, or LV#6 mASCs (60,000 cells) in 24-well plates and cultured for 5 days in the presence or absence of 100 ng/ml recombinant murine IL-15 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, www.peprotech.com). The nonadherent cells in the cocultures were collected and stained for CD49b and NKG2D (both from eBioscience) and analyzed on a FACS Canto flow cytometer (BD Biosciences). RPMI with 10% heat-inactivated serum was used for both coculture assays.

Measurement of TGF- β 1 Production by ASCs

NT, LV-CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs or NT, LV-CTRL, LV#18, and LV#19 hASCs (20,000 cells per square centimeter) were cultured for 48 hours and the TGF- β 1 levels in supernatants, w/ or w/o acid activation, were analyzed using a TGF- β 1 Ready-SET-go ELISA kit (eBioscience) according to the manufacturer's description. The TGF- β 1 levels in complete MesenCult and advanced DMEM media were subtracted from the data obtained from the ASC cultures.

© 2014 The Authors. STEM CELLS Published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of AlphaMed Press

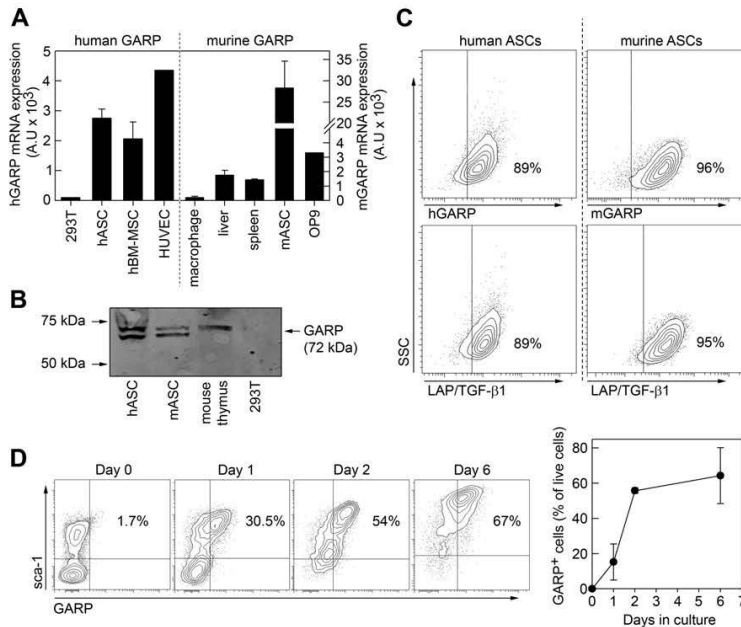


Figure 1. MSCs express GARP and LAP/TGF- β 1 on their surface. (A): RT-qPCR analysis of GARP expression in human (left) and mouse (right) MSCs. hASCs and hBM-MSCs were analyzed together with human negative (293T) and positive (HUVEC) cell lines. Murine MSCs from adipose tissue (mASCs) and the MSC-line OP9 are shown in the right panel. As controls for murine samples we used BM-derived macrophages, mouse liver, and spleen. (B): Total protein from hASCs, mASCs, murine thymocytes, and 293T cells were analyzed by Western blot using an anti-mouse/human GARP antibody. (C): EDTA-harvested human and murine ASCs were stained for GARP (top) and LAP/TGF- β 1 (bottom) surface expression and analyzed by flow cytometry. (D): Fat tissue from BALB/c mice was treated with collagenase type I and the resulting cell suspensions were stained for GARP and sca-1 expression before (day 0) and 1, 2, and 6 days after *in vitro* culturing and analyzed by flow cytometry. (A) and (D) show mean (SEM) of three independent experiments; (B) and (C) show a representative experiment out of >3 . Abbreviations: GARP, glycoprotein A repetitions predominant; hASC, human mesenchymal stromal cells from adipose tissue; hBM, human bone marrow; LAP, latency-associated peptide; MSC, mesenchymal stromal cell; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, www.graphpad.com). All data are represented as mean (SEM) of three independent experiments unless otherwise stated in the figure legend. Pairwise and multiple comparisons of the data have been performed using the nonparametric Mann-Whitney *U* test and the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's post-test, respectively. *p* values $<.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

MSCs Express GARP and LAP/TGF- β 1 on Their Surface

A report by Barbet et al. [31] described the presence of GARP mRNA in hMSCs using TaqMan low density arrays (TLDA);

however, no further analysis has been published on GARP and MSCs. Since TGF- β 1 is a key regulator of multiple cellular functions (proliferation, differentiation, and immunomodulation) and GARP binds TGF- β 1, we hypothesized that GARP could play an important role in MSCs biology. We therefore studied whether GARP expression was a general property of MSCs (mouse and human) and examined its surface localization. As previously described, GARP mRNA was expressed in human MSCs but we also detected GARP expression in mouse MSCs from different origins (Fig. 1A and Supporting Information Fig. S2). GARP protein was detected in both human and mouse adipose-tissue-derived MSCs (ASCs) by Western blot (Fig. 1B). In addition to the 72 kDa GARP band observed in thymocytes, we also detected an additional lower band in ASCs. This could be due to differences in glycosylation and/or protein processing [15, 32]. By fluorescence-activated cell sorting (FACS) we showed that both mASCs and hASCs expressed GARP and LAP/TGF- β 1 on their surface (Fig. 1C).

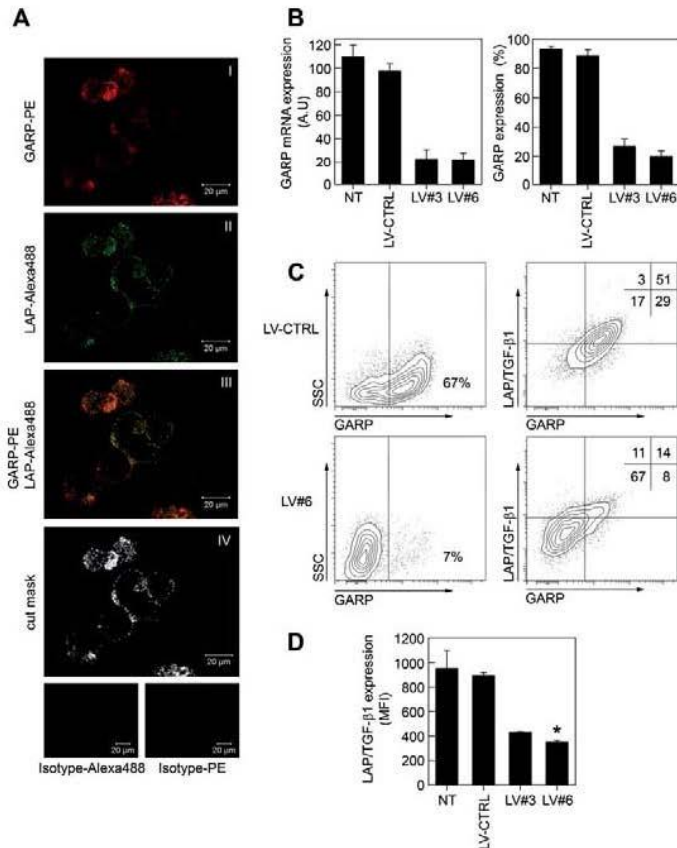


Figure 2. GARP binds LAP/TGF β 1 to the surface of mASCs. (A): Murine ASCs were surface stained for GARP PE and LAP Alexa488 or isotype controls (bottom panels) as described in Materials and Methods. Stainings are shown separately (panels I and II) and overlapping (panel III). A cut mask representing colocalized GARP/LAP/TGF β 1 is shown in panel IV. Cells were imaged using a Zeiss LSM 710 confocal microscope. (B): Murine ASCs were transduced with lentiviral vectors expressing a nonspecific shRNA (LV CTRL) or GARP specific shRNAs (LV#3 and LV#6) and GARP silencing in mASCs was assessed by qPCR (left panel) and flow cytometry (right panel). The general vector copy number/mASC for the different LVs used was two to three copies per cell. (C): LV CTRL and LV#6 mASCs were stained for GARP (left panels) or GARP and LAP/TGF β 1 (right panels). One representative experiment out of three is shown. (D): The LAP/TGF β 1 expression levels (MFI) on NT, LV CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs were measured on a flow cytometer. Results are shown as mean (SEM) of three independent experiments. *, $p < .05$ versus LV CTRL. Abbreviations: GARP, glycoprotein A repetitions predominant; LAP, latency associated peptide; LV, lentiviral vector; TGF β 1, transforming growth factor β 1.

Interestingly, mASC and hASCs also contained high levels of intracellular GARP (Supporting Information Fig. S3). Harvesting mASCs using TrypLE dramatically decreased the mbTGF β 1 staining (Supporting Information Fig. S4) and we therefore used PBS with 2 mM EDTA when detaching M5Cs for the analysis of mbTGF β 1 expression. In order to investigate the GARP expression on freshly isolated mASCs, we stained cell

suspensions obtained from collagenase digested fat tissue for GARP expression before and after adherence to plastic. We found that GARP was not expressed on freshly isolated sca 1⁺ cells (Fig. 1D, day 0) but was rapidly induced on sca 1⁺ adherent cells upon in vitro culture (Fig. 1D, day 1), reaching a 20–30 fold induction after 1–2 days, respectively, although later passages generally expressed higher levels of GARP (Fig. 1D,

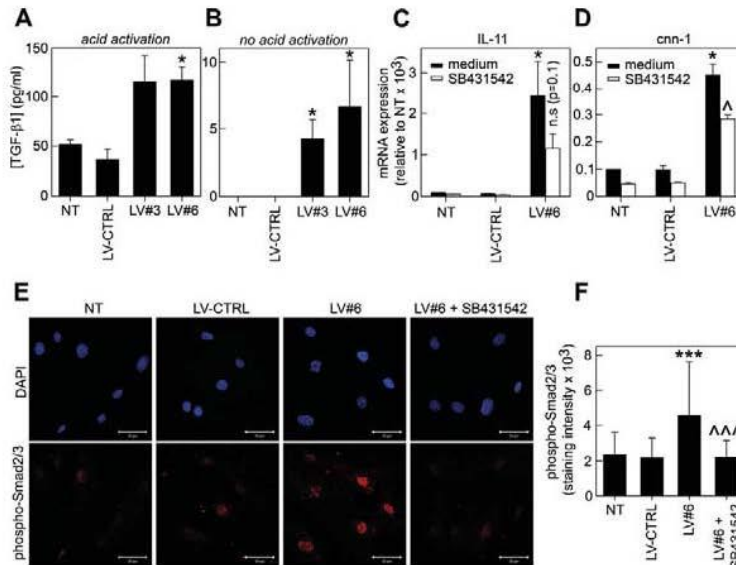


Figure 3. Glycoprotein A repetitions predominant modulates the secretion and activation of TGF β 1. (A, B) NT, LV CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs were cultured for 48 hours and the levels of TGF β 1 were measured in acid activated (A) or non acid treated (B) supernatants by ELISA. (C, D) NT, LV CTRL, and LV#6 mASCs were cultured for 2 days in the presence (white bars) or absence (black bars) of SB431542 (10 μ M). Total RNA was reverse transcribed and the expression levels of IL11 (C) and cnn 1 (D) were analyzed by qPCR. Data are shown as mean (SEM) of four independent experiments. *, $p < .05$ versus LV CTRL. Δ , $p < .05$ versus LV#6 (medium). (E, F): NT, LV CTRL, and LV#6 mASCs were cultured in eight well chamber slides (5,000 cells/well) in medium supplemented with 0.2% FCS, with or without SB431542 (10 μ M) for 48 hours. The cells were subsequently fixed, methanol permeabilized, and stained for phospho Smad2/3 and mounted using Slowfade Gold antifade reagent (Life Technologies) containing DAPI. Images were captured using a Zeiss LSM 710 confocal microscope. One representative experiment out of two is shown. Data are represented as mean (SD). ***, $p < .001$ versus LV CTRL; $\Delta\Delta\Delta$, $p < .001$ versus LV#6. Abbreviations: LV, lentiviral vector; TGF β 1, transforming growth factor β 1.

day 6 and Fig. 1C). The GARP expression on mASCs was not affected by TrypLE or the collagenase type 1 treatment (data not shown). These data suggest that GARP is not expressed on the surface of mASCs under physiological conditions and that it is induced upon in vitro culturing.

GARP Binds LAP/TGF- β 1 to the Cell Surface of mASCs

The main function described for GARP on T cells and platelets is the binding of LAP/TGF β 1 to their surfaces [17]. We observed that GARP and LAP/TGF β 1 colocalized on mASCs using confocal microscopy (overlapping constant according to Mander 0.65 ± 0.1), suggesting a close interaction (Fig. 2A). However, apart from GARP, other surface molecules, including neuropilin 1 and glucose regulated protein 78 can bind LAP/TGF β 1 to the cell surface [33, 34] and we found that both genes were expressed in mASCs (Supporting Information Fig. 55). In order to study the contribution of GARP to the surface expression of LAP/TGF β 1 on MSCs we knocked down GARP and analyzed the surface levels of LAP/TGF β 1 by flow cytometry. Mouse ASCs were transduced with LVs encoding for a nonspecific siRNA (LV CTRL) or two different GARP specific siR

NAs (LV#3 and LV#6). Three to five days after transduction with LV#3 and LV#6, GARP expression, both at mRNA and protein level, was reduced by more than 80% compared to non transduced (NT) and LV CTRL mASCs (Fig. 2B). Importantly, GARP silencing significantly reduced the expression of LAP/TGF β 1 on the surface of mASCs (Fig. 2C, 2D) indicating that GARP participates in the attachment of mbTGF β 1 on the surface of mASCs.

Silencing of GARP Increases the Secretion and Activation of TGF- β 1

GARP has been shown to regulate the secretion of LAP/TGF β 1 [23, 35]. We therefore analyzed the secretion of TGF β 1 by NT, LV CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs and found that GARP^{-low} mASCs secreted significantly more TGF β 1 compared to NT and LV CTRL mASCs (Fig. 3A). In contrast, the TGF β 1 mRNA levels were similar in all cell populations (Supporting Information Fig. 56B). GARP has also been implicated in the regulation of TGF β 1 activation by providing a cell surface platform for the presentation of LAP/TGF β 1 to integrins [23]. We therefore measured the levels of active TGF β 1 in non acid

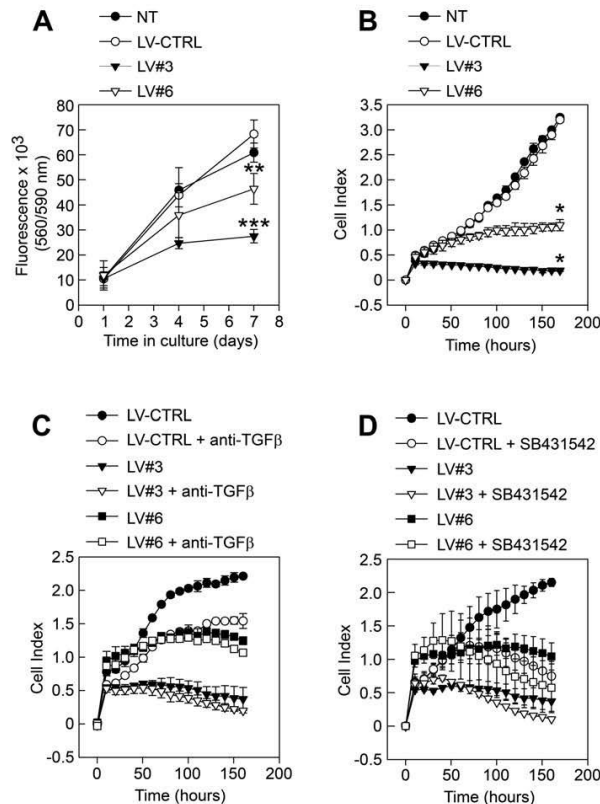


Figure 4. Silencing of glycoprotein A repetitions predominant affects the proliferation of mASCs. (A, B): NT (filled circles), LV-CTRL (open circles), LV#3 (filled triangles), and LV#6 (open triangles) mASCs were added (800 cells/well) to (A) 96-well plates and after 1, 4, and 7 days CellTiter-Blue were added to the cultures and fluorescence was measured at 560 nm or (B) to 16-well E-plates and proliferation was measured in real-time on an xCelligence real-time cell analyzer system. Results are presented as mean (SEM) of three independent experiments. *, $p < .05$ versus LV-CTRL; **, $p < .01$ versus LV-CTRL; ***, $p < .001$ versus LV-CTRL. (C, D): The proliferation of LV-CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs with (open circles, triangles, squares, respectively) or without (filled circles, triangles, squares, respectively) anti-TGF- β 1/2/3 Ab (C) and SB431542 (D) was measured in real-time on an xCelligence real-time cell analyzer system. Results are presented as mean (SEM) of two independent experiments. Abbreviations: LV, lentiviral vector; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

activated supernatants from NT, LV-CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs. Low amounts of active TGF- β 1 were found in supernatants from GARP^{low} mASCs but not in those from NT and LV-CTRL cultures (Fig. 3B). To corroborate the increased activation of TGF- β 1 by GARP^{low} ASCs, we analyzed the expression of TGF- β 1-inducible genes in NT, LV-CTRL, and GARP^{low} mASCs (transduced with LV#6). Addition of recombinant TGF- β 1 induced the expression of interleukin (IL) 11 and to a lesser extent calponin (cnn) 1 in mASCs [36, 37] (Supporting Information Fig. S6C). In agreement, we found that the expression of both genes was increased in GARP^{low} cells

compared to NT and LV-CTRL cells (Fig. 3C, 3D). Addition of the TGF- β inhibitor SB431542 partially reduced the expression levels of both IL-11 and cnn-1 suggesting that autocrine TGF- β 1 signaling is involved in their induction (Fig. 3C, 3D, white bars). If GARP^{low} mASC produce more active TGF- β 1 we should observe an increase in Smad2/3 phosphorylation in these cells. Indeed we observed a clear increment in the levels of nuclear phospho-Smad2/3 in GARP^{low} mASCs that was blocked by the addition of SB431542 (Fig. 3E, 3F). Taken together, these results indicate that GARP regulates the secretion and activation of TGF- β 1 by MSCs.

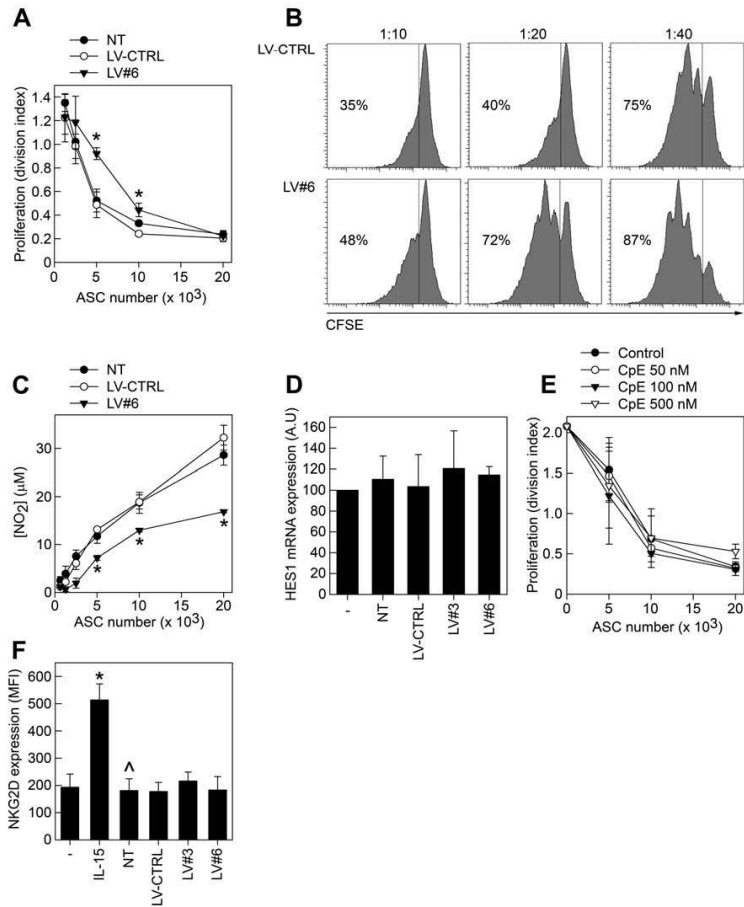


Figure 5. Role of glycoprotein A repetitions predominant in ASC-mediated immunomodulation. NT, LV-CTRL, and LV#6 mASCs were treated with mitomycin C and seeded at different numbers in 96-well plates. Balb/c splenocytes (200,000 cells/well) were labeled with CFSE and added to the ASC cultures and activated using anti-CD3 (1 μ g/ml). After 72 hours, cells were harvested and the dilution of CFSE in CD4⁺ T cells were analyzed on a FACS Canto II cytometer using the FlowJo software. Results are plotted as (A) division index and (B) representative histograms of CFSE-dilution in CD4⁺ cells. Results are shown as mean (SEM) of three independent experiments. *, $p < .05$ versus LV-CTRL. (C): Supernatants from the MSC:splenocyte cocultures were analyzed for NO₂ contents by Griess assay. Results are shown as mean (SEM) of three independent experiments. *, $p < .05$ versus LV-CTRL. As control, we set up parallel mASC cultures (LV#6, NT, and LV-CTRL) without splenocytes and detected similar cell numbers/viability (data not shown). (D): Splenocytes were cultured alone or with mitomycin C-treated NT, LV-CTRL, LV#3, and LV#6 mASCs for 24 hours in the presence of anti-CD3 (1 μ g/ml). The splenocytes were subsequently assayed for their expression of HES1 by quantitative RT-PCR. (E): Mitomycin C-treated mASCs, at different numbers, were cocultured with CFSE-labeled splenocytes in the presence or absence of various concentrations of compound E (CpE). After 72 hours, cells were harvested and the dilution of CFSE in CD4⁺ T cells was analyzed on a FACS Canto II cytometer using the FlowJo software. (F): NT, LV-CTRL, LV#3 and LV#6 mASCs were treated with mitomycin C and seeded at 60,000 cells/well in a 24-well plate. Natural killer (NK) cells (60,000 cells/well) were added on top of the mASCs and activated using 100 ng/ml rml-15 for 5 days. CD49b⁺ NK cells were analyzed for their expression of NKG2D on a flow cytometer. Results are shown as mean (SEM) of three independent experiments. *, $p < .05$ versus NK cells alone, ^, $p < .05$ versus NK cells alone stimulated with IL-15. Abbreviation: LV, lentiviral vector.

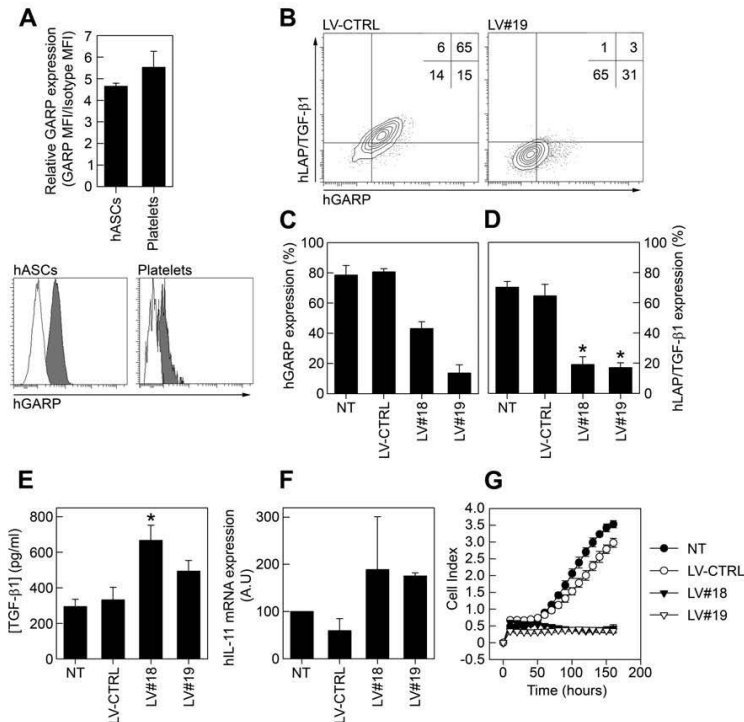


Figure 6. GARP expression on human ASCs. **(A):** Human ASCs and human platelets were stained for GARP expression and analyzed on a flow cytometer. In order to compare the relative GARP levels on hASCs and platelets we calculated the GARP MFI/Isotype MFI ratio (upper panel). GARP (gray histograms) and isotype control (white histograms) stainings of hASCs and platelets are shown (lower panel). **(B–D):** Human ASCs were transduced with lentiviral vectors expressing a nonspecific shRNA (LV-CTRL) or human GARP-specific shRNAs (LV#18 and LV#19). The general vector copy number/hASC for the LVs used was one to two copies per cell. **(B):** Representative dot plots of LAP/TGF- β 1/GARP costaining on LV-CTRL (left) and LV#19 (right) hASCs are shown. **(C, D):** A quantification of GARP **(C)** and LAP/TGF- β 1 **(D)** expression levels on NT, LV-CTRL, LV#18, and LV#19 hASCs are shown as mean (SEM) of three independent experiments. *, $p < .05$ versus LV-CTRL. **(E, F):** NT, LV-CTRL, LV#18, and LV#19 hASCs were cultured for 3 days and the levels of TGF- β 1 in acidified supernatants were measured by ELISA **(E)** and the expression of IL-11 was analyzed by quantitative RT-PCR **(F)**. Results are shown as mean (SEM) of two to four independent experiments. *, $p < .05$ versus LV-CTRL. **(G):** NT (filled circles), LV-CTRL (open circles), LV#18 (filled triangles), and LV#19 (open triangles) hASCs were added (800 cells/well) to 16-well E-plates and proliferation was measured on an xCelligence real-time cell analyzer system. Data are shown as mean (SD) of four experimental replicates. Abbreviations: GARP, glycoprotein A repetitions predominant; LAP, latency-associated peptide; LV, lentiviral vector; TGF- β 1, transforming growth factor- β 1.

Finally, TGF- β 1 is known to inhibit adipogenic differentiation of MSCs in vitro [9]. However, while we found that GARP^{low} mASCs differentiated significantly less into adipocytes we could not increase adipogenesis by adding 5B431542 suggesting that the block in adipogenesis does not depend on TGF- β 1 (Supporting Information Fig. S7A, S7B).

Silencing of GARP Reduces mASC Proliferation

GARP has been shown to influence the proliferation of T cells and cell lines with ectopic GARP expression [38, 39]. We thus set out to analyze the effect of the presence or absence of GARP on mASC

proliferation in vitro. While the proliferation of ASCs transduced with LV-CTRL was similar to that of NT mASCs, transduction of mASCs with LV#3 and LV#6 decreased their proliferative capacity (Fig. 4A, 4B). Since TGF- β 1 is known to modulate MSC proliferation we investigated whether the increased production of active TGF- β 1 by GARP^{low} mASCs could be responsible for their decreased proliferation. However, the addition of a TGF- β 1/2/3-neutralizing antibody or 5B431542 to GARP^{low} mASCs did not promote but rather decreased the proliferation of mASC in general (Fig. 4C, 4D). These data suggest that the increase in TGF- β 1 activation by GARP^{low} mASC is not responsible for their decreased proliferative capacity.

Effect of mbTGF- β 1 on the Immunomodulatory Capacities of ASCs

Membrane bound TGF- β 1 has been shown to participate in the suppression of T-cell responses, induction of Tregs, and anergy in NK cells [17, 19, 22]. Thus, we wanted to assess a possible role of mbTGF- β 1/GARP in MSC-mediated immunomodulation. We found that silencing of GARP significantly reduced the capacity of mASCs to inhibit T-cell proliferation in vitro (Fig. 5A, 5B). We also measured the levels of NO₂ in the supernatants of the suppression cultures and found that the NO₂ levels were significantly lower in splenocyte:LV#6 cocultures compared to NT and LV-CTRL cocultures (Fig. 5C).

Ostroukhova et al. demonstrated that mbTGF- β 1, but not soluble TGF- β 1, induces Notch-HES1 signaling in responder T cells [40]. However, HES1 expression was not induced in T cells upon coculture with mASCs and we could not detect any difference in HES1 expression in T cells cultured with GARP^{-low} or with GARP⁺ mASCs. Furthermore, addition of compound E (CpE), an inhibitor of Notch signaling, to the cocultures did not affect the mASC-mediated suppression. Taken together, these data suggest that mASCs do not suppress T-cell responses via the Notch1 pathway (Fig. 5D, 5E).

MSCs can also inhibit the function of NK cells and we therefore analyzed whether mbTGF- β 1 expression on mASCs could play a role in the control of NK cell activation. In contrast to the effect of GARP expression on MSC-mediated T-cell suppression, we found that GARP^{-low} mASCs were equally efficient in inhibiting NK cell activation based on the upregulation of the NK cell activating receptor NKG2D in vitro (Fig. 5F).

GARP Controls TGF- β 1 Bioavailability and Proliferation of Human ASCs

We finally wanted to investigate whether GARP plays similar functions on hMSCs as compared to mMSCs. We first showed that hMSCs and human platelets contain comparable surface levels of GARP (Fig. 6A). As seen in mASCs, silencing of hGARP significantly decreased the expression of LAP/TGF- β 1 on the surface of hASCs (Fig. 6B–6D). We also found that GARP^{-low} hASCs secreted higher levels of TGF- β 1 (Fig. 6E). Although we did detect an increase in IL-11 expression in GARP^{-low} hASCs (Fig. 6F) we could not detect any increase in the levels of active TGF- β 1 in non-acid-treated supernatants from these cells compared to NT and LV-CTRL hASCs (data not shown). Finally, as observed in mASCs, silencing GARP expression blocked proliferation of hASCs (Fig. 6G) and reduced the differentiation of hASCs into adipocytes (Supporting Information Fig. 57C). In summary, these data indicate that GARP plays a similar role for both murine and human ASCs.

DISCUSSION

A report by Barbet et al. [31] described the presence of GARP mRNA in hMSCs using TLDA which prompted us to study its potential role in MSC biology. In this manuscript, we have shown for the first time that murine and human MSCs express GARP on their surface. This finding could be relevant for the understanding of MSC biology since GARP is involved in the modulation of TGF- β 1 localization/activity as well as in cell proliferation.

TGF- β 1 is involved in a multitude of MSC functions, including proliferation, differentiation, and immunomodulation

and it is thus important to understand the regulation of its production and activation by MSCs. TGF- β 1 has classically been viewed as a secreted latent molecule which, through the association with LTBP, is targeted to the ECM where perturbations to ECM integrity (in response to injury and inflammation) result in the activation of TGF- β 1 [14, 41]. However, the discovery that GARP presents TGF- β 1 on the surface of MSCs has opened up new possibilities. Many reports have shown that the cellular response to TGF- β differs depending on whether TGF- β is secreted or membrane bound [40, 42, 43]. The reason for these differences is not well understood but mbTGF- β 1 is thought to give rise to (a) high local concentration of active TGF- β 1, (b) sustained TGF- β 1 signaling, and (c) allowing other interactions to take place thereby modulating the response to TGF- β 1 in a manner which secreted TGF- β 1 cannot mimic [40, 44]. We found that GARP and LAP/TGF- β 1 colocalized to a high degree on the surface of MSCs. Although other surface molecules also can bind LAP/TGF- β 1, our GARP interference studies suggest that GARP is the main molecule involved in presenting mbTGF- β 1 on MSCs.

Several reports indicate that GARP can modulate the secretion of LAP/TGF- β 1 [23, 35]. Our data clearly demonstrate that silencing GARP expression increased the secretion of LAP/TGF- β 1 by MSCs. Interestingly, we found that GARP^{-low} mASCs produced higher levels of active TGF- β 1 compared to NT or LV-CTRL mASCs suggesting that GARP can modulate both the secretion and activation of TGF- β by MSCs. How the lack of GARP results in an increased activation of TGF- β by MSCs under normal culture conditions is not known. However, it has been shown that the LTBP3s are important for TGF- β activation in vitro and in vivo [45–47] and GARP has been found to efficiently outcompete LTBP1 from binding to LAP/TGF- β 1 [23]. Importantly, it has been shown that TGF- β 1 activation by MSCs depends on LTBP-3 in vitro [48]. We propose that in the absence of GARP, more LTBP/LAP/TGF- β 1 complexes are secreted by the MSCs, resulting in an increased ECM-localization and subsequent steady state activation of TGF- β 1 (Supporting Information Fig. S6A). Future studies should address under which circumstances and through which mechanisms mbTGF- β 1 can be activated on MSCs.

Both murine and human GARP^{-low} ASCs exhibited a significant reduction in their proliferative capacity. Since we observed an increased TGF- β 1 activation by GARP^{-low} ASCs and TGF- β 1 is known to increase [49] or inhibit [50, 51] the proliferation of MSCs we studied the possible involvement of TGF- β in reducing the proliferation of GARP^{-low} ASCs. However, the addition of TGF- β neutralizing antibodies or SB431542 to GARP^{-low} mASCs did not increase, but rather decreased their proliferation. This suggests that TGF- β 1 is a growth factor for MSCs and that the reduction in the proliferative capacity of GARP^{-low} MSCs is TGF- β 1 independent. How GARP can influence cell proliferation remains to be elucidated. In this direction, Zhou et al. demonstrated a positive correlation between GARP expression levels in HeLa cells and their proliferative capacity with an accumulation of the cell cycle-inhibitory proteins p53, p21/Cip1, and p27/Kip1 in GARP^{low} cells [39]. In addition, some reports have detected the amplification of the chromosomal fragment 11q13, containing the GARP gene, in solid tumors again suggesting that GARP can control cell proliferation which is in agreement with our data [52, 53]. Another process that can be negatively affected by increased secretion of TGF- β 1 is adipogenesis which was significantly reduced in GARP^{-low} ASCs. However, the addition of

SB431542 to the GARP^{-low} ASCs during the differentiation process did not increase adipogenesis. The cell density of cultured MSCs can also affect their differentiation into adipocytes [54]. Thus, our observed effect on MSC differentiation could be due to the lower proliferative capacity of GARP^{-low} ASCs in combination with other unknown factors not related to TGF- β 1.

Resting Tregs do not express GARP on their surface but they do contain high levels of intracellular GARP protein which upon activation relocate to the surface membrane [22, 32, 38]. Similarly, GARP was hardly expressed on freshly isolated cells from murine adipose tissue but its expression was rapidly induced on adherent cells with an MSC phenotype upon culturing in vitro. However, the circumstances that turn on GARP expression on MSCs are unknown and warrant further investigation. Interestingly, we found that MSCs expressed high levels of intracellular GARP (Supporting Information Fig. S3) and we are currently investigating the conditions that can lead to the activation/relocalization of GARP on MSCs. We would like to speculate that, as in Tregs, GARP surface localization could be an indicator of MSC activation.

As discussed before, the cellular response to TGF- β 1 differs depending on whether TGF- β 1 is secreted or membrane bound [40, 42, 43]. Silencing of GARP on Tregs significantly decreased their suppressive activity in vitro while increasing the GARP expression enhanced their suppressive activity [21, 38, 55]. MSCs have been shown to inhibit/modulate the activity of both innate and adaptive immune cells [56, 57]. Although GARP^{-low} mASCs were equally efficient as NT mASCs in inhibiting NK cell activation, we found that GARP expression on mASC contributed to their ability to inhibit T-cell responses in vitro. The GARP⁺ mASCs were twice as effective as their GARP^{-low} counterpart in inhibiting the proliferation of CD4⁺ T cells. This is an interesting finding considering the multitude of immunoregulatory molecules expressed by MSCs that can inhibit T-cell responses, including iNOS, PGE₂, and growth factors [57]. A possible mechanism of the increased suppression activity of GARP⁺ MSCs could involve mbTGF- β 1-mediated induction of Notch1/HES1. However, our data showed that MSCs do not suppress T-cell responses via the Notch1 pathway. Interestingly, GARP^{-low} mASCs produced less NO₂ suggesting that the increased secretion of TGF- β 1 by these cells could inhibit iNOS induction in an autocrine manner as previously described by Xu et al. [58]. Thus, we believe that GARP could participate in the MSC-mediated inhibition of T-cell proliferation by controlling their TGF- β 1 secretion/activation rather than directly interacting with T cells through mbTGF- β 1 in a cell contact-dependent manner. However, the exact role of GARP remains to be clarified and whether MSCs, through their expression of GARP/mbTGF- β 1, also can modulate T-cell differentiation into Treg and Th17 cells remains to be investigated. Also it is not known whether expression mbTGF- β 1 could protect injected MSCs from NK cell-mediated lysis in vivo or contribute to the hypoinnogenicity displayed by MSCs. Future studies on the role of GARP for the therapeutic efficacy of MSCs in vivo need to be performed in order to address the above mentioned issues.

In summary, we propose a model where quiescent GARP^{-low} MSCs become activated upon injury acquiring surface GARP expression. GARP will arm the MSCs with mbTGF- β 1, enhance their proliferative potential, and increase their ability to suppress T-cell responses. We propose GARP as a

marker to identify activated/semiactivated MSCs and as a tool to enhance the therapeutic potency of MSCs.

CONCLUSIONS

We have shown for the first time that mouse and human MSCs express GARP, a molecule previously found to be critical for anchoring latent TGF- β 1 to the plasma membrane of activated Tregs and platelets. GARP appears to be the main protein presenting TGF- β 1 on the surface of MSCs regulating its secretion and activation. GARP expression is required for MSC proliferation in a TGF- β 1-independent manner. Finally, GARP enhances the immunomodulatory capacity of MSCs. We envision GARP as a new MSC marker of importance for the understanding of MSC biology and therapeutic activity.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Raquel Marero Díaz, Nieves Varela Hernández, María José Luque Luque, Manuel José Bernal Quirós, and Alejandro Díaz Barreiro for fruitful discussions and excellent technical help during the preparation of the manuscript. This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias ISCIII (Spain) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) from the European Union, through the research Grants N° P112/01390 (P.A.), N° P112/01097, and ISCIII Red de Terapia Celular (TerCel: RD12/0019/0006) (F.M.), by the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Grants N° P09-CTS-04532 and PAIDI-Bio-326), and Consejería de Salud (Grant N° PI0001/2009) from the Junta de Andalucía and FEDER/Fondo de Cohesión Europeo (FSE) de Andalucía 2007–2013 to F.M. P.A. has a Miguel Servet Contract (CP09/00228), cofinanced by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) from the European Union. M.C. and F.M. are funded by the Fundación Progreso y Salud (Consejería de Salud—Junta de Andalucía). A.B.C.-G. and S.C.-O. are recipients of a scholarship from CEBioTic PTS, Granada, Spain. A.G.-P. is currently affiliated with the Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin, Germany. P.M. is currently affiliated with the Institute of Child Health, University College London, 30 Guilford Street, London WC1N 1EH, U.K. M.G.T. is currently affiliated with the Amarna Therapeutics S.L., Instituto Cartuja, C/Leonardo da Vinci 19^o, Isla de la Cartuja, 41092 Sevilla, Spain.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.A. and F.M.: conception and design, financial support, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, and final approval of the manuscript; A.B.C.-G. and M.C.: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, and final approval of the manuscript; S.C.-O., A.G.-G., A.S.-G., P.B., A.G.-P., P.M., M.G.T., and K.B.: collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, and final approval of the manuscript. A.B.C.-G. and M.C. contributed equally to this work. F.M. and P.A. shared senior authorship.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

A patent has been presented (register number: P201331730) for the use of GARP as a new marker for MSCs.

REFERENCES

- 1 Galipeau J. The mesenchymal stromal cells dilemma—Does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Cytotherapy* 2013;15:2–8.
- 2 Herreros MD, García-Arriaz M, Guadajajara H et al. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: A phase III randomized clinical trial (FAIT 1: Fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation. *Dis Colon Rectum* 2012;55:762–772.
- 3 Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000;342:1350–1358.
- 4 Oshimori N, Fuchs E. The harmonies played by TGF-beta in stem cell biology. *Cell Stem Cell* 2012;11:751–764.
- 5 Shull MM, Ormsby I, Kier AB et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693–699.
- 6 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838–3843.
- 7 Patel SA, Meyer JR, Greco SJ et al. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: Role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol* 2010;184:5885–5894.
- 8 Salazar KD, Lanfank SM, Brody AR. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L1002–1011.
- 9 Ng F, Boucher S, Koh S et al. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): Transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 2008;112:295–307.
- 10 Tang Y, Wu X, Lei W et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 2009;15:757–765.
- 11 Gentry LE, Nash BW. The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry* 1990;29:6851–6857.
- 12 Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C et al. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor. *Biochemistry* 1990;29:6851–6857.
- 13 Taipale J, Miyazono K, Heldin CH et al. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol* 1994;124:171–181.
- 14 Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003;116:217–224.
- 15 Ollendorff V, Noguchi T, deLapeyriere O et al. The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins. *Cell Growth Differ* 1994;5:213–219.
- 16 Stockis J, Coliau D, Coulle PG et al. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol* 2009;39:3315–3322.
- 17 Tran DQ, Andersson J, Wang R et al. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:13445–13450.
- 18 Gandhi R, Anderson DE, Weiner HL. Cutting Edge: Immature human dendritic cells express latency-associated peptide and inhibit T cell activation in a TGF-beta-dependent manner. *J Immunol* 2007;178:4017–4021.
- 19 Li H, Han Y, Guo Q et al. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 2009;182:240–249.
- 20 Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)-CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;194:629–644.
- 21 Wang R, Wan Q, Kozhaya L et al. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PLoS One* 2008;3:e2705.
- 22 Edwards JP, Fujii H, Zhou AX et al. Regulation of the expression of GARP/latent TGF-beta1 complexes on mouse T cells and their role in regulatory T cell and Th17 differentiation. *J Immunol* 2013;190:5506–5515.
- 23 Wang R, Zhu J, Dong X et al. GARP regulates the bioavailability and activation of TGFbeta. *Mol Biol Cell* 2012;23:1129–1139.
- 24 Fonseka M, Ramasamy R, Tan BC et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSC) inhibit the proliferation of K562 (human erythromyeloblastoid leukaemic cell line). *Cell Biol Int* 2012;36:793–801.
- 25 Mokarizadeh A, Delirezh N, Morshedi A et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett* 2012;147:47–54.
- 26 Cobo M, Anderson P, Benabdellah K et al. Mesenchymal stem cells expressing vasoactive intestinal peptide ameliorate symptoms in a model of chronic multiple sclerosis. *Cell Transplant* 2013;22:839–854.
- 27 Anderson P, Carrillo-Galvez AB, Garcia-Perez A et al. CD105 (Endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. *PLoS One* 2013;8:e76979.
- 28 Toscano MG, Frecha C, Ortega C et al. Efficient lentiviral transduction of *Herpesvirus saimiri* immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies. *Gene Ther* 2004;11:956–961.
- 29 Toscano MG, Frecha C, Benabdellah K et al. Hematopoietic-specific lentiviral vectors circumvent cellular toxicity due to ectopic expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Hum Gene Ther* 2008;19:179–197.
- 30 Toscano MG, Anderson P, Munoz P et al. Use of zinc-finger nucleases to knock out the WAS gene in K562 cells: A human cellular model for Wiskott-Aldrich syndrome. *Dis Model Mech* 2013;6:544–554.
- 31 Barbet R, Peiffer I, Hatzfeld A et al. Comparison of gene expression in human embryonic stem cells, hESC-derived mesenchymal stem cells and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2011;2011:368192.
- 32 Chan DV, Somani AK, Young AB et al. Signal peptide cleavage is essential for surface expression of a regulatory T cell surface protein, leucine rich repeat containing 32 (LRRC32). *BMC Biochem* 2011;12:27.
- 33 Glinka Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* 2008;84:302–310.
- 34 Oida T, Weiner HL. Overexpression of TGF-beta1 gene induces cell surface localized glucose-regulated protein 78-associated latency-associated peptide/TGF-beta. *J Immunol* 2010;185:3529–3535.
- 35 Gauthy E, Cuende J, Stockis J et al. GARP is regulated by miRNAs and controls latent TGF-beta1 production by human regulatory T cells. *PLoS One* 2013;8:e76186.
- 36 Fierro FA, Kalomiris S, Sondergaard CS et al. Effects on proliferation and differentiation of multipotent bone marrow stromal cells engineered to express growth factors for combined cell and gene therapy. *Stem Cells* 2011;29:1727–1737.
- 37 Kurpinski K, Lam H, Chu J et al. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells* 2010;28:734–742.
- 38 Zhou AX, Kozhaya L, Fujii H et al. GARP-TGF-beta complexes negatively regulate regulatory T cell development and maintenance of peripheral CD4+ T cells in vivo. *J Immunol* 2013;190:5057–5064.
- 39 Zhou Q, Haupt S, Prots I et al. miR-142-3a is involved in CD25+ CD4 T cell proliferation by targeting the expression of glycoprotein A repetitions predominant. *J Immunol* 2013;190:6579–6588.
- 40 Ostroukhova M, Qi Z, Oris TB et al. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J Clin Invest* 2006;116:996–1004.
- 41 Shi M, Zhu J, Wang R et al. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* 2011;474:343–349.

- 42** Han Y, Guo Q, Zhang M et al. CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 2009;182:111–120.
- 43** Zhang M, Xu S, Han Y et al. Apoptotic cells attenuate fulminant hepatitis by priming Kupffer cells to produce interleukin-10 through membrane-bound TGF-beta. *Hepatology* 2011;53:306–316.
- 44** Pap E, Pallinger E, Falus A. The role of membrane vesicles in tumorigenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;79:213–223.
- 45** Dabovic B, Chen Y, Colarossi C et al. Bone abnormalities in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-beta bioavailability. *J Cell Biol* 2002;156:227–232.
- 46** Flaumenhaft R, Abe M, Sato Y et al. Role of the latent TGF-beta binding protein in the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial and smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1993;120:995–1002.
- 47** Kojima S, Nara K, Rifkin DB. Requirement for transglutaminase in the activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J Cell Biol* 1993;121:439–448.
- 48** Koli K, Ryyanen MJ, Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* 2008;43:679–688.
- 49** Jian H, Shen X, Liu I et al. Smad3-dependent nuclear translocation of beta-catenin is required for TGF-beta1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes Dev* 2006;20:666–674.
- 50** Roostaeian J, Carlsen B, Simhaee D et al. Characterization of growth and osteogenic differentiation of rabbit bone marrow stromal cells. *J Surg Res* 2006;133:76–83.
- 51** Tapp H, Deepe R, Ingram JA et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: Transforming growth factor beta and 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R89.
- 52** Bekri S, Adelaide J, Merscher S et al. Detailed map of a region commonly amplified at 11q13->q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79:125–131.
- 53** Maire G, Forus A, Foa C et al. 11q13 alterations in two cases of hibernoma: Large heterozygous deletions and rearrangement breakpoints near GARP in 11q13.5. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;37:389–395.
- 54** McBeath R, Pirone DM, Nelson CM et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004;6:483–495.
- 55** Probst-Kepper M, Geffers R, Kroger A et al. GARP: A key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. *J Cell Mol Med* 2009;13:3343–3357.
- 56** Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut* 2013;62:1131–1141.
- 57** Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2011;164:1–8.
- 58** Xu C, Yu P, Han X et al. TGF-beta promotes immune responses in the presence of mesenchymal stem cells. *J Immunol* 2014;192:103–109.



See www.StemCells.com for supporting information available online.