



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CÉLULAS T REGULADORAS EN SALUD Y ENFERMEDAD

(TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN)

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Helena Solleiro Villavicencio

MÉXICO, D.F, 2011.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Ana Esther Aguilar Cárdenas.

VOCAL: Profesor: Enrique Ortega Soto.

SECRETARIO: Profesor: María Inés Vargas Rojas.

1er. SUPLENTE: Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría.

2° SUPLENTE: Profesor: Óscar Armando Pérez Méndez.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS, DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN TABAQUISMO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María Inés Vargas Rojas.

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Leonardo Limón Camacho.

SUSTENTANTE :

Helena Solleiro Villavicencio.

Agradecimientos

A la Dra. María Inés Vargas por todo lo que me ha enseñado a lo largo de los dos últimos años.

Al Dr. Raúl Sansores por haberme introducido a su grupo de trabajo.

A la Dra. Ana Esther Aguilar por los conocimientos que me ha transmitido, por su dedicación y comprensión.

Al Dr. Enrique Ortega por su tiempo y dedicación para revisar este trabajo.

A Ahira Torres por su apoyo y por siempre orientarme.

A la UNAM por toda la formación académica y personal que me ha otorgado en los últimos ocho años de mi vida.

Dedicatoria

Dedico este trabajo especialmente a mis padres quienes me han apoyado incondicionalmente a lo largo de mi vida, además de ser un gran ejemplo a seguir.

A mis abuelos, que me han demostrado que la felicidad y el éxito sólo se pueden conseguir con amor, esfuerzo y dedicación.

A mis tías, tíos y primos, por su cariño y apoyo.

A mis amigos y amigas de la preparatoria, por tantos años recorridos juntos.

A mis amigos y amigas de la Facultad de Química, por todas las experiencias que vivimos juntos y que nos han llevado a convertirnos en profesionistas.

ÍNDICE

Planteamiento del problema.....	5
Objetivo.....	5
Introducción.....	6
Marco Teórico:	
• Propiedades generales de la respuesta inmune.....	9
Células T reguladoras naturales CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	23
Historia.....	25
Origen y desarrollo.....	26
Caracterización fenotípica.....	28
Mecanismos de acción.....	31
Participación de las Treg en salud y enfermedad.....	36
• Células Treg y embarazo.....	38
• Células Treg y enfermedades infecciosas.....	40
• Células Treg y enfermedades autoinmunes.....	42
• Células T reg y cáncer.....	44
Conclusiones.....	46
Bibliografía.....	48

Planteamiento del problema

Los procesos inflamatorios resultan esenciales para la defensa del huésped contra los microorganismos invasores, la eliminación de los residuos por el daño en el órgano blanco y para favorecer la reparación tisular. En condiciones fisiológicas éste es un riesgo calculado para el huésped; sin embargo, en algunos casos la permanencia de un estímulo o alguna falla en la regulación de la respuesta inmune pueden llevar a la perpetuación de un proceso inflamatorio y ser ésta la causa del desarrollo de enfermedad.

En los últimos años creció el interés por estudiar la supresión mediada por las células T CD4⁺ como un mecanismo de regulación para mantener un estado de tolerancia a lo propio. Con la caracterización fenotípica de una subpoblación de células T naturalmente anérgica y supresora denominada células T reguladoras (Treg) que son CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, se retomó el concepto planteado en la década de los '70, cuando se demostró la presencia de un fenómeno de supresión mediado por los linfocitos T o sus productos.

Objetivo

Realizar una breve revisión bibliográfica, que nos permita describir a las células Treg, su origen, sus mecanismos de acción y su participación en los procesos de salud y enfermedad.

Introducción

El sistema inmune distingue lo propio de lo ajeno y de esta manera es capaz de mantener un estado de tolerancia contra autoantígenos. El primer mecanismo de tolerancia antígeno-específica es la eliminación en el timo de las células T autorreactivas. Este mecanismo de eliminación no es 100% eficiente y existen células T con alta afinidad por antígenos propios, que escapan de este proceso de selección y migran a la periferia. En este caso, son los mecanismos de tolerancia periférica los encargados de controlar a estas células T autorreactivas.

Durante los últimos 15 años surgió evidencia sobre la existencia de un mecanismo activo de tolerancia periférica, el cual depende de la presencia de una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ con funciones supresoras. Esta población denominada células T reguladoras (Treg) fue descrita en 1995, inicialmente en modelos animales ² cuando se demostró que la administración de células T CD4⁺ a ratones nu/nu (ratones sin timo y por esto carentes de linfocitos T) podía prevenir el desarrollo de gastritis autoinmune; estudios posteriores determinaron que las células T CD4⁺CD25⁺ también eran capaces de inhibir el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal, la diabetes mellitus, la encefalitis autoinmune experimental y la enfermedad injerto contra huésped ³⁻⁶.

En los humanos se ha demostrado la capacidad supresora *in vitro* de las células Treg ⁷⁻⁹ y más importante aún, que la expansión de estas células T autorreactivas es suprimida por esta población celular ¹⁰.

Después de más de una década de investigación en modelos animales y el aporte de los estudios en humanos, el papel central de las células Treg en los mecanismos de inmunorregulación es evidente ¹¹⁻¹⁴ ya que como veremos en esta

revisión, esta subpoblación celular tiene una importante participación en los mecanismos de tolerancia periférica tanto en procesos infecciosos, como en inflamación y en las enfermedades autoinmunes.

Se han descrito diferentes tipos de células reguladoras (tabla 1); las células Tr1 son un tipo de células T cooperadoras (Th, por sus siglas en inglés) dependientes de interleucina (IL)-10 para su diferenciación y algunas de sus propiedades reguladoras, no expresan Forkhead box P3 (FOXP3 por sus siglas en inglés) pero al igual que las células T reguladoras naturales (Treg n), que son las que provienen del timo como células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, tienen alta expresión de CD152 en la superficie y pueden inducir indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) ¹⁵. Las células Th3 se caracterizan por la producción de factor beta de crecimiento transformante (TGF-β por sus siglas en inglés) y dependen de éste para su diferenciación, además expresan la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25) ¹⁵ como las células Treg. Otra población de células Treg son las inducidas (Treg i), éstas tienen expresión de FOXP3 inducida en la periferia¹⁶, a diferencia de las células Treg naturales (Treg n) que lo expresan desde su origen en el timo.

A pesar de que esta revisión se enfoca en las células Treg, antes de iniciar una descripción detallada de este tipo de células, se hará un breve resumen acerca del sistema inmune, con base en el planteamiento de Abbas et al (2012)¹.

Tabla 1. Tipos de células T reguladoras

	Origen	Marcadores	Blanco	Supresión
Treg n	Timo	CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	Te	Contacto
Treg i	Periferia	CD4 ⁺ CD25 ^{HI} CD152 ⁺ GIRT ⁺	Te, APC	Citocinas
Th1	Periferia	CD4 ⁺ CD25 ^{HI} CD152 ⁺ GIRT ⁺	Te, APC	IL-10
Th3	Periferia	CD4 ⁺ CD25 ^{HI} CD152 ⁺ GIRT ⁺	Te, APC	TGF- β

Abreviaturas: Células T reguladoras naturales (Treg n), inducidas (Treg i), células T cooperadoras (Th), células T efectoras (Te), células presentadoras de antígeno (APC por sus siglas en inglés).

Propiedades generales de la respuesta inmune

El sistema inmune, se define como el conjunto de moléculas, células y mecanismos biológicos dentro de un organismo encargados de combatir agentes extraños, así como de la tolerancia hacia lo propio.

La defensa contra los microorganismos y algunos agentes reconocidos como extraños tiene lugar a través de las primeras reacciones correspondientes a la inmunidad innata; las respuestas posteriores están a cargo de la inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos ya instaurados incluso antes de contraerse la infección, preparados para responder con rapidez una vez producida; estos mecanismos responden al estímulo microbiano y a los derivados de las células dañadas. Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes: 1) barreras físicas y químicas, como epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies; 2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas) y linfocitos citolíticos naturales (NK por sus siglas en inglés); 3) proteínas sanguíneas, como los factores del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y 4) unas proteínas denominadas citocinas, que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células encargadas de la inmunidad innata. Los mecanismos de esta línea de defensa son específicos para aquellas estructuras comunes a los grupos de microbios afines y no tienen por qué distinguir la existencia de diferencias sutiles entre las sustancias ajenas.

A diferencia de la inmunidad innata, la magnitud y capacidad de la inmunidad adaptativa crece con cada exposición sucesiva a un microorganismo (u otro tipo

de antígeno) concreto. Las características que definen a la inmunidad adaptativa son la especificidad frente a diversas moléculas y la propiedad de “recordar” las exposiciones repetidas al mismo microorganismo para responder con mayor energía (memoria inmunológica). Los principales componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos de secreción.

Existen dos tipos de respuestas inmunes adaptativas: la inmunidad humoral y la inmunidad celular. La inmunidad humoral cuenta con unas moléculas presentes en la sangre y en las secreciones de las mucosas, conocidas como anticuerpos, y son producidas por las células B. Los anticuerpos reconocen antígenos específicos, y los marcan como blanco para su eliminación por diversos mecanismos efectores.

La inmunidad celular queda a cargo de las células T. Los microorganismos intracelulares (virus y algunas bacterias) sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del huésped, donde los anticuerpos circulantes no los tienen a su alcance. La defensa contra estas infecciones corresponde a la inmunidad celular, que fomenta la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o la desaparición de las células infectadas para suprimir los reservorios de infección.

Las células del sistema inmune adaptativo normalmente se encuentran en el torrente sanguíneo y en la linfa como elementos circulantes, configurando agregados dotados de una estructura anatómica en los órganos linfoides y con una distribución dispersa prácticamente en todos los tejidos.

Los órganos linfoides periféricos, son tejidos especializados que sirven para concentrar los antígenos que hayan accedido por la piel, el tubo digestivo y las vías respiratorias. La captura del antígeno y su transporte hacia los órganos

linfoides son los primeros pasos que dan origen a las respuestas inmunitarias adaptativas. Los antígenos quedan expuestos por las células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas en inglés; células dendríticas, macrófagos y linfocitos B) para su reconocimiento a cargo de los linfocitos específicos. Los linfocitos vírgenes (aquéllos que aún no han tenido una presentación antigénica) migran a través de estos órganos linfoides periféricos, donde reconocen los antígenos y se diferencian para montar una respuesta inmune, convirtiéndose así en linfocitos efectores.

Los linfocitos constan de distintos subconjuntos que difieren en sus funciones y en sus productos proteicos, pero que son muy parecidos desde el punto de vista morfológico. Los linfocitos B son denominados así porque son las células que derivan de la médula ósea; los linfocitos T son llamados así porque a pesar de que nacen en la médula ósea, es en el timo donde éstos maduran. Tanto los linfocitos T como los B constan de varios subconjuntos dotados de unas características fenotípicas y funcionales distintas; éstas características se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Linfocitos

Clase	Funciones principales	Receptor de antígeno y especificidad	Principales marcadores
Linfocitos T CD4 ⁺ cooperadores	Diferenciación de los linfocitos B (inmunidad humoral). Activación de los macrófagos (inmunidad celular).	TCR. Diversas especificidades para los complejos péptido-CPH de clase II.	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁻ .
Linfocitos T CD4 ⁺ reguladores	Función supresora de otros linfocitos T (regulación de respuestas inmunes, mantenimiento de la autotolerancia).	TCR. Diversas especificidades para los complejos péptido-CPH de clase II.	CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD25 ⁺ (de manera constitutiva y sostenida).
Linfocitos T CD8 ⁺ citotóxicos	Destrucción de la célula infectada por microorganismos, destrucción de células tumorales.	TCR. Diversas especificidades para los complejos péptido-CPH de clase II.	CD3 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁻ .
Linfocitos $\gamma\delta$	Funciones cooperadoras y citotóxicas (inmunidad innata).	Heterodímeros $\gamma\delta$. Especificidad limitada para los antígenos peptídicos y no peptídicos.	CD3 ⁺ , CD4 y CD8 variable.
Linfocitos B	Producción de anticuerpos (inmunidad humoral).	Varios receptores activadores e inhibidores. Especificidad limitada para el CPH o las moléculas del tipo MHC.	CD16 (receptor para la fracción cristalizable de la inmunoglobulina G).
Linfocitos citolíticos naturales (NK)	Destrucción de las células infectadas por virus o alteradas (inmunidad innata).	Varios receptores activadores e inhibidores. Especificidad limitada para el MHC o las moléculas del tipo de MHC.	CD16; CD3.
Linfocitos NKT	Supresión o activación de las respuestas inmunes adaptativas.	TCR. Especificidad limitada para los complejos glucolípidos-CD1.	CD16; CD3.

Abreviaturas: TCR, Receptor de Células T; MHC, Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Maduración y selección de los linfocitos T $\alpha\beta$.

Las células troncales pluripotenciales de la médula ósea (y del hígado fetal), denominadas células troncales hematopoyéticas (HSCs por sus siglas en inglés), dan lugar a todos los linajes de células de la sangre; estos precursores de linfocitos T migran al timo para completar su maduración.

El desarrollo temprano de los linfocitos T se caracteriza por la proliferación de los progenitores (pro-T) por efecto de la interleucina-7 (IL-7) producida por las células del timo. En el núcleo de algunas de las células pro-T, se reordenan los genes que codifican la cadena β del Receptor de Células T (TCR por sus siglas en inglés), por recombinación mediada por la V(D)J recombinasa. El TCR no se expresa aún en la superficie de las células pro-T; tampoco se expresan en la membrana las moléculas accesorias CD4 ni CD8. Por esta razón las células pro-T se denominan CD4⁻/CD8⁻ o dobles negativas.

El reordenamiento de la cadena β ocurre al activarse uno de los dos alelos que codifican la cadena β . El otro alelo es inhibido durante el reordenamiento del alelo activado (esto se denomina "exclusión alélica"). Si no se produce una cadena β completa en una célula pro-T, ésta experimenta muerte celular programada.

Si la recombinación VDJ tiene lugar con éxito y se sintetiza una cadena β , ésta se expresa en la superficie celular, unida a una proteína invariable denominada pre-T α , para formar el complejo pre-TCR. La expresión de la cadena β marca el estadio pre-T, y al mismo tiempo comienza el reordenamiento de la cadena α . Si una célula no es capaz de sintetizar una cadena α y el TCR completo, esa célula muere.

Los timocitos dobles positivos son aquellas células sobrevivientes, que expresan tanto la cadena α como la β , es decir un TCR completo, CD3 y tanto CD4 como CD8; estas células son las que pasan por los mecanismos de selección positiva y negativa.

Durante la selección positiva se pone en marcha el mecanismo de restricción del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés): los linfocitos T de un individuo concreto sólo pueden detectar un antígeno si éste viene presentado por una molécula del MHC del mismo individuo. Las diferentes clonas de timocitos dobles negativos expresan diferentes tipos de TCR $\alpha\beta$. Si el TCR de una célula T reconoce una molécula MHC en el timo (que por definición es una molécula MHC presentando un péptido propio del individuo), esa célula T es seleccionada para sobrevivir. Para asegurarse de que el linfocito T durante su maduración será expuesto a todo tipo de péptido propio, las células epiteliales medulares del timo expresan numerosos genes, que codifican la mayor parte de las proteínas presentes en los tejidos periféricos.

Las células que no son capaces de reconocer un complejo "péptido propio-MHC" en el timo, mueren por apoptosis. Estas células no serían útiles para el individuo, porque serían incapaces de reconocer los péptidos presentados por las moléculas de MHC en los tejidos periféricos.

Simultáneamente al proceso de selección positiva, las células T que reconocen complejos péptido-MHC de clase-I preservan la expresión de CD8, el correceptor que se une a la molécula MHC-I, y pierden la expresión de las moléculas de CD4. A la inversa, las células que reconocen complejos péptido-MHC de clase-II preservan la expresión de CD4 y pierden la de CD8. Así, lo que se obtiene al final del proceso de selección positiva son timocitos simples positivos.

Los timocitos simples positivos que poseen receptores que reconocen fuertemente los complejos "péptido:MHC" en el timo, también sufren apoptosis; éste es el proceso de selección negativa, que sirve para eliminar linfocitos que podrían reaccionar de forma dañina contra proteínas propias que se expresan en el timo. Por esto, se dice que éste es el mecanismo de la tolerancia central, pues asegura que las proteínas propias no sean atacadas por los linfocitos T.

Las células T que han pasado los procesos de selección positiva y negativa son linfocitos maduros, que presentan las siguientes características:

- Son células simples positivas $CD4^+$ o $CD8^+$.
- Están restringidas para las moléculas MHC propias ($CD4^+$: MHC-II, $CD8^+$:MHC-I).
- Son tolerantes para las proteínas propias.
- Son vírgenes, es decir que no han encontrado nunca un antígeno que las active.

Activación de los linfocitos T CD4⁺

Para la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes en células efectoras o reguladoras, es necesario que ocurra presentación antigénica y coestimulación. Los linfocitos T CD4⁺ vírgenes migran del torrente sanguíneo hasta los órganos linfáticos, desde un órgano linfático a otro, y de vuelta a la sangre, hasta que entran en contacto con el antígeno para el cual expresan receptores específicos. Por su parte, el antígeno llega desde los ganglios linfáticos por drenaje linfático y al bazo a través de la circulación sanguínea. Durante su migración hasta los ganglios linfáticos, las células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) maduran hasta transformarse en APC profesionales. Una vez en el ganglio linfático, ocurre la presentación antigénica cuando las DC muestran a los linfocitos T CD4⁺ vírgenes péptidos derivados de la proteína endocitada asociados a moléculas del MHC de clase II. Los péptidos presentados por las DC son: derivados de antígenos proteicos extracelulares de microorganismos, antígenos proteicos solubles que son administrados con adyuvantes, o agentes químicos que ingresan a través de la piel y que se unen a proteínas propias y las modifican (desencadenando una sensibilidad por contacto). Además de presentar los antígenos, las DC expresan de manera elevada moléculas coestimuladoras como las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), que se unen a sus ligandos CD28 (produciendo señales positivas) y CTLA-4 (produciendo señales negativas) (figura 1).

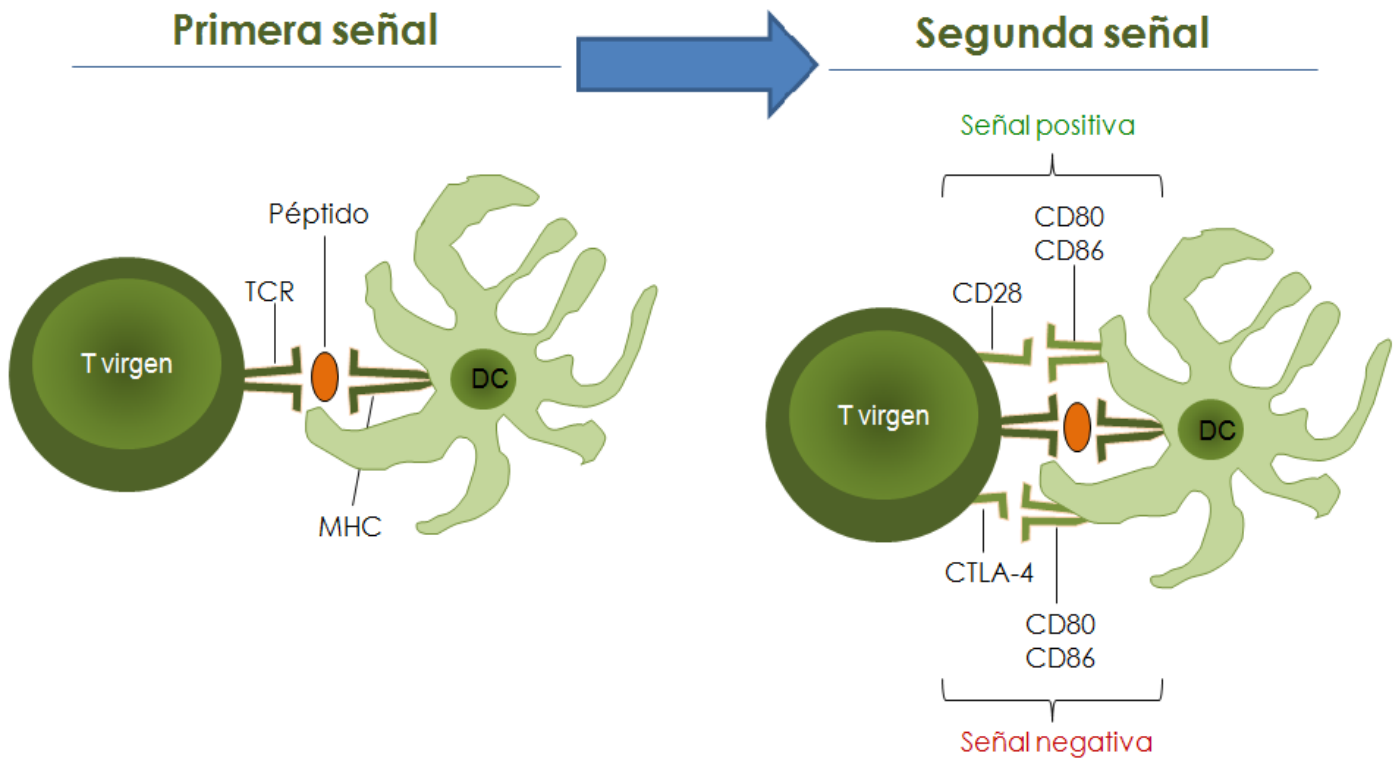


Figura 1. Señales de activación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes. La activación de los linfocitos ocurre en los ganglios linfáticos. La primera señal de activación ocurre por la unión del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) de clase II de las células dendríticas (DC) con el Receptor de Células T de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes. Para potenciar las señales enviadas por el Receptor de Células T (TCR), existen señales secundarias coestimuladoras. Las señales son de tipo positivo cuando interactúa la proteína CD28 de los linfocitos con CD80 y CD86 de las DC; en cambio, si se une el receptor CTLA-4 de los linfocitos con CD80 y CD86 de las DC, las señales serán negativas.

Las señales positivas suministradas por las moléculas coestimuladoras son esenciales para la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺; éstas cooperan con las señales del TCR para potenciar la activación de los factores de transcripción que permiten la síntesis de citocinas. Las señales negativas o inhibitoras serán discutidas más adelante en la sección de tolerancia periférica.

Tolerancia inmunológica

La tolerancia inmunológica se define como la falta de respuesta a un antígeno específico (tolerógeno), inducida por la previa presentación antigénica.

La tolerancia inmunológica establece un papel importante en el mantenimiento del estado de salud, esto es por varios motivos. En principio, los individuos sanos presentan tolerancia ante sus antígenos propios (autoantígenos), ya que los linfocitos autorreactivos son eliminados durante la selección negativa. Cuando los mecanismos de autotolerancia fallan, ocurren reacciones inmunológicas contra autoantígenos; estas reacciones se denominan autoinmunidad, y las enfermedades que desencadenan se conocen como enfermedades autoinmunes.

Por otro lado, los antígenos reconocidos como extraños se pueden administrar de tal manera que inhiben las respuestas inmunológicas mediante la inducción de la tolerancia en linfocitos específicos; es decir, que muchos de los mecanismos de tolerancia hacia los antígenos reconocidos como extraños son similares a los de autotolerancia. La inducción de la tolerancia inmunitaria puede ser aprovechada en el abordaje terapéutico para evitar respuestas inmunológicas perjudiciales, que ocurren principalmente en las enfermedades autoinmunes y alérgicas, así como en el rechazo de los trasplantes de órganos.

Según el sitio donde ocurre la inducción, la tolerancia puede ser dividida en central y periférica. La tolerancia central garantiza que el repertorio de los linfocitos maduros no pueda reconocer a los antígenos propios que estén presentes en los órganos linfáticos generadores. Algunos de los linfocitos T CD4⁺ que reconocen a autoantígenos se diferencian en linfocitos T reg que migran a la periferia e impiden reacciones en contra de antígenos propios.

La tolerancia periférica es producida cuando los linfocitos maduros que reconocen antígenos propios se hacen incapaces de responder a esos antígenos, pierden su viabilidad y se convierten en linfocitos de vida corta, o se les induce a muerte por apoptosis. Este tipo de tolerancia permite que los linfocitos T no reaccionen en contra de antígenos propios específicos de tejido, que no son abundantes en el timo; por otro lado, los mecanismos de tolerancia periférica pueden inducir la falta de reactividad hacia las formas tolerógenas de antígenos reconocidos como extraños. La tolerancia periférica ocurre por los mecanismos de: ignorancia, eliminación, inhibición (anergia) y regulación (figura 2).

La ignorancia es posible ya que algunos antígenos propios son ignorados por el sistema inmune, de tal manera que los linfocitos entran en contacto con el antígeno propio pero no responden de forma detectable y permanezcan viables y funcionales. La importancia de este mecanismo no está bien establecida, por lo que no se profundizará en éste.

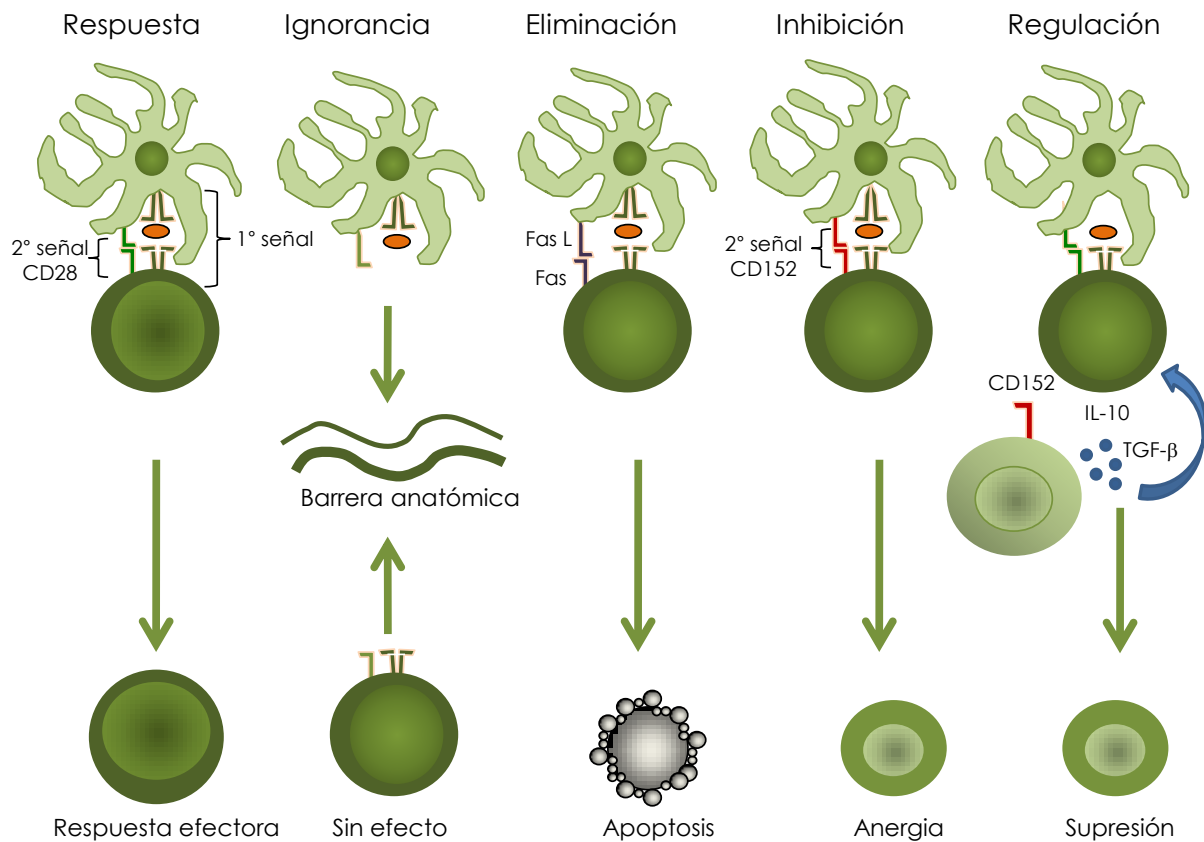


Figura 2. Mecanismos de tolerancia periférica. La respuesta efectora ocurre por presentación antigénica de las APC a los linfocitos T y por coestimulación de moléculas accesorias. La ignorancia tiene lugar cuando algunos antígenos son ignorados por el sistema inmune, por lo que los linfocitos que entran en contacto con el antígeno propio no responden en su contra. En la eliminación los linfocitos T que reconocen antígenos propios sin inflamación o que son estimulados de forma repetida por antígenos, mueren por apoptosis. La inhibición produce anergia (ausencia de reactividad funcional), es posible cuando los linfocitos T CD4⁺ son expuestos a un antígeno en ausencia de señales de coestimulación y de inmunidad innata. La regulación ocurre es orquestada por células reguladoras, por ejemplo las Treg, cuyas funciones principales son la supresión de respuestas inmunológicas y el mantenimiento de la autotolerancia.

La exposición de células T CD4⁺ maduras a antígenos en ausencia de coestimulación o actividad de la inmunidad innata provoca que las células sean incapaces de responder en contra de ese antígeno; es decir, que estas células se vuelven anérgicas. Retomando conceptos descritos anteriormente, la activación de células T depende de dos señales básicas; la primera es el reconocimiento antigénico por parte del TCR, mientras que la segunda ocurre por la participación de moléculas de coestimulación. La prolongación de la primera señal en ausencia de la segunda conduce a la anergia.

Se sabe que varias alteraciones bioquímicas y génicas son las responsables de la anergia. En primer lugar, los linfocitos anérgicos muestran un bloqueo en la transducción de señales inducidas por el TCR. Los mecanismos que conducen a un bloqueo de esta señalización aún no están completamente comprendidos. Algunos modelos experimentales han demostrado que el bloqueo puede atribuirse a una menor expresión del TCR y al reclutamiento por el complejo TCR de moléculas inhibitoras como las tirosina fosfatasas. También es probable que el reconocimiento de antígenos propios active las ubiquitina ligasas celulares, que pueden marcar proteínas ligadas al TCR para ser degradadas en los proteosomas o los lisosomas; como resultado de esta acción ocurre una pérdida de las moléculas transmisoras de señales y una activación defectuosa de los linfocitos T. Cuando los linfocitos T reconocen los autoantígenos, pueden ocupar receptores inhibidores de la familia CD28. Los dos inhibidores cuya participación fisiológica en la autotolerancia está mejor establecida son el Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4 o CD152) y el Programmed Death-1 (PD-1). El CTLA-4 compite con CD28 por los coestimuladores B7, además de proporcionar señales inhibitorias que contrarrestan las activadas por el TCR. PD-1 reconoce dos ligandos, PD-L1

(expresado en APC y en varios tipos de células) y PD-L2 (expresados en APC); este reconocimiento lleva a la activación de los linfocitos T. Las enfermedades autoinmunes en ratones knock-out deficientes de PD-1, son menos severas que en los ratones con déficit en CTLA-4. Se ha postulado que el CTLA-4 funciona principalmente en el control de la activación inicial de las células T en los órganos linfoides, mientras que la PD-1 es más importante para limitar las respuestas de las células efectoras diferenciadas en los tejidos periféricos. Aún no se comprende el por qué del balance que existe entre receptores activadores e inhibidores. Una posible explicación es que las APC que presentan antígenos propios expresan bajos niveles de receptores B7-1 y B7-2, comprometiendo así la unión de CD28 pero no de CTLA-4.

Por otro lado, las DC que residen en los órganos linfoides y en tejidos no linfoides pueden expresar antígenos propios a los linfocitos T, manteniendo así la tolerancia. Las DC tisulares por lo general están en un estado inmaduro (en reposo) y expresan pocos coestimuladores, por lo que son llamadas DC tolerogénicas.

Los linfocitos T que reconocen antígenos propios sin inflamación o que son estimulados de forma repetida por antígenos, mueren por apoptosis. La apoptosis puede ser inducida, en este caso, por dos vías bioquímicas. La primera es la vía mitocondrial o intrínseca, regulada por la familia de proteínas Bcl-2. Los linfocitos T que reconocen antígenos propios sin coestimulación o sin una respuesta innata acompañante pueden activar a la proteína Bim, que a su vez activará a dos proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 llamadas Bax y Bak, que se polimerizan e insertan en la membrana mitocondrial, aumentando la permeabilidad de ésta. Al salir ciertos elementos mitocondriales, éstos activan la vía de las

caspasas (proteasas de cisteína intracelulares) que culmina con la fragmentación del DNA nuclear y demás cambios que son parte del perfil de una célula apoptótica.

La segunda vía se conoce como extrínica. En ésta, la estimulación repetida de los linfocitos T da lugar a la coexpresión de receptores de muerte celular y de sus ligandos, lo que provoca una inducción a apoptosis. En los linfocitos T CD4⁺, correspondiente receptor de muerte celular se denomina Fas (CD95) y su ligando es llamado Ligando de Fas (FasL). Fas es un miembro del Factor de Necrosis Tumoral (TNF por sus siglas en inglés), y FasL es un homólogo a la citocina TNF. La unión de Fas y FasL activa a una cadena de caspasas que producen muerte celular por apoptosis.

La tolerancia mediante regulación, es producida principalmente por los linfocitos Treg, por lo que ésta será ampliamente descrita en las siguientes secciones de este texto.

Células T reguladoras naturales CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺

En los últimos años el interés por estudiar la supresión mediada por las células T CD4⁺ como un mecanismo de regulación para mantener un estado de tolerancia a lo propio, llevó a la caracterización fenotípica de una subpoblación de células T naturalmente anérgicas y supresoras denominadas células Treg³; con esto se retomó el concepto planteado en la década de los '70, cuando se demostró la presencia de un fenómeno de supresión mediado por los linfocitos T o sus productos¹⁸. En los experimentos realizados en esa época los ratones silvestres en los que se eliminaron las células Treg, desarrollaban enfermedades

autoinmunes órgano-específicas como tiroiditis, gastritis y adrenalitis, de forma similar a las que se observan en los humanos. Aún más, se demostró que al reconstituir a estos ratones con la población de células Treg se inhibía el desarrollo de estas enfermedades ^{18,19}.

Las células Treg tienen marcadores de superficie celular comunes a las células Th, lo que dificulta su identificación y aislamiento. En los humanos estas células representan entre el 1 y el 2% de los linfocitos T CD4⁺ presentes en sangre periférica, y se ha demostrado que las células con capacidad reguladora son las que tienen alta expresión constitutiva de CD25 ⁸, un marcador que también se encuentra en las células Th pero únicamente después de ser activadas ⁸.

La descripción del gen *FOXP3* o factor de transcripción Scurfin, y los informes que demuestran la expresión del mRNA ¹⁶ de éste en las células Treg de los humanos y de los ratones, han motivado a que se considere a *FOXP3* como un marcador molecular que caracteriza fenotípicamente a esta población y se puede considerar como un factor determinante de su origen y función ²⁰.

Se sabe que uno de los mecanismos activos de la tolerancia periférica está dado por las células Treg ^{21,22}. Si bien los mecanismos moleculares por los cuales estas células se originan y actúan, no están bien definidos, se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* la existencia de defectos en la capacidad reguladora de células Treg relacionados con enfermedades autoinmunes y los procesos inflamatorios crónicos.

Historia

Después del descubrimiento en 1960, de las funciones de los linfocitos Th, Gershon propuso la existencia de una población de células con capacidad de suprimir la respuesta inmune ¹⁷. Sin embargo, como en ese momento no se pudo identificar ningún marcador celular o alguna molécula soluble específica de dicha población esta idea fue abandonada. En la década de los '70 se sugirió que las células supresoras mediaban efectos biológicos al producir sustancias solubles. A pesar de que numerosos experimentos proporcionaban datos que sugerían la existencia de una población de células supresoras, esta teoría fue descartada en la década de los '80, ya que con la descripción de las células Th1 y Th2 se propuso que la supresión era el resultado de la actividad de las citocinas inmunorreguladoras producidas por estas subpoblaciones celulares ²². En esta misma década se demostró *in vivo* que los ratones timectomizados el tercer día de vida (d3Tx) desarrollaban enfermedades autoinmunes órgano-específicas, las cuales podían ser prevenidas con la administración de células T singénicas obtenidas del timo o del hígado de animales adultos ^{23,24}; sin embargo, fue en 1995 cuando Sakaguchi y colaboradores demostraron que la causa del desarrollo de estas enfermedades en los ratones d3Tx, era por la ausencia específica de las células T CD4⁺CD25⁺ ¹⁷ y que su transferencia las prevenía. Así, estos datos rescataron el concepto propuesto por Gershon sobre la existencia de una población de células reguladoras.

Por otro lado, se descubrió que FOXP3 estaba altamente expresado en células T CD4⁺CD25⁺ ²⁶. Previamente se había reportado en un modelo murino que la mutación del gen *FoxP3*, provocaba una deficiencia inmunológica causante

de esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía y muerte temprana ¹⁶, mientras que la mutación del gen ortólogo en el humano causa el síndrome de poliendocrinopatía inmune y enteropatía ligada al X (IPEX por sus siglas en inglés) ^{27,28}. De esta manera se hizo evidente la participación de FOXP3 en el desarrollo y función de las células Treg.

Origen y desarrollo

El desarrollo de esta población celular se conoce como la tercera función del timo ²⁹, y requiere de la interacción TCR con el MHC de clase II unido a un péptido propio expresado en el estroma tímico ³⁰. La expresión de FOXP3 es dependiente de la unión del CD28 con sus ligandos B7-1/B7-2 y se requiere para que las células no sean eliminadas, a pesar del reconocimiento del antígeno con gran afinidad ³⁰. Los corpúsculos de Hassall localizados en la médula del timo, tienen un papel muy importante en la tolerancia central ya que en éstos se convierten los timocitos con alta afinidad por antígenos propios y potencialmente autorreactivos en células Treg ³¹ (figura 3).

La similitud entre la mutación de *FoxP3/FOXP3* (en los ratones y los humanos respectivamente) y la eliminación de las células Treg en los modelos estudiados, lleva a establecer una relación entre el desarrollo y la función de estas células con el gen *FoxP3* ³², por esto se considera que las células Treg n son aquéllas que expresan este factor de transcripción desde su diferenciación en el timo, y que éste no es sólo necesario para la ontogenia sino también para la función. En modelos animales se demostró que aumentar la expresión de FoxP3 mediante la transducción de un retrovirus de este gen a células T CD4⁺CD25⁻, les confiere capacidad supresora ³³.

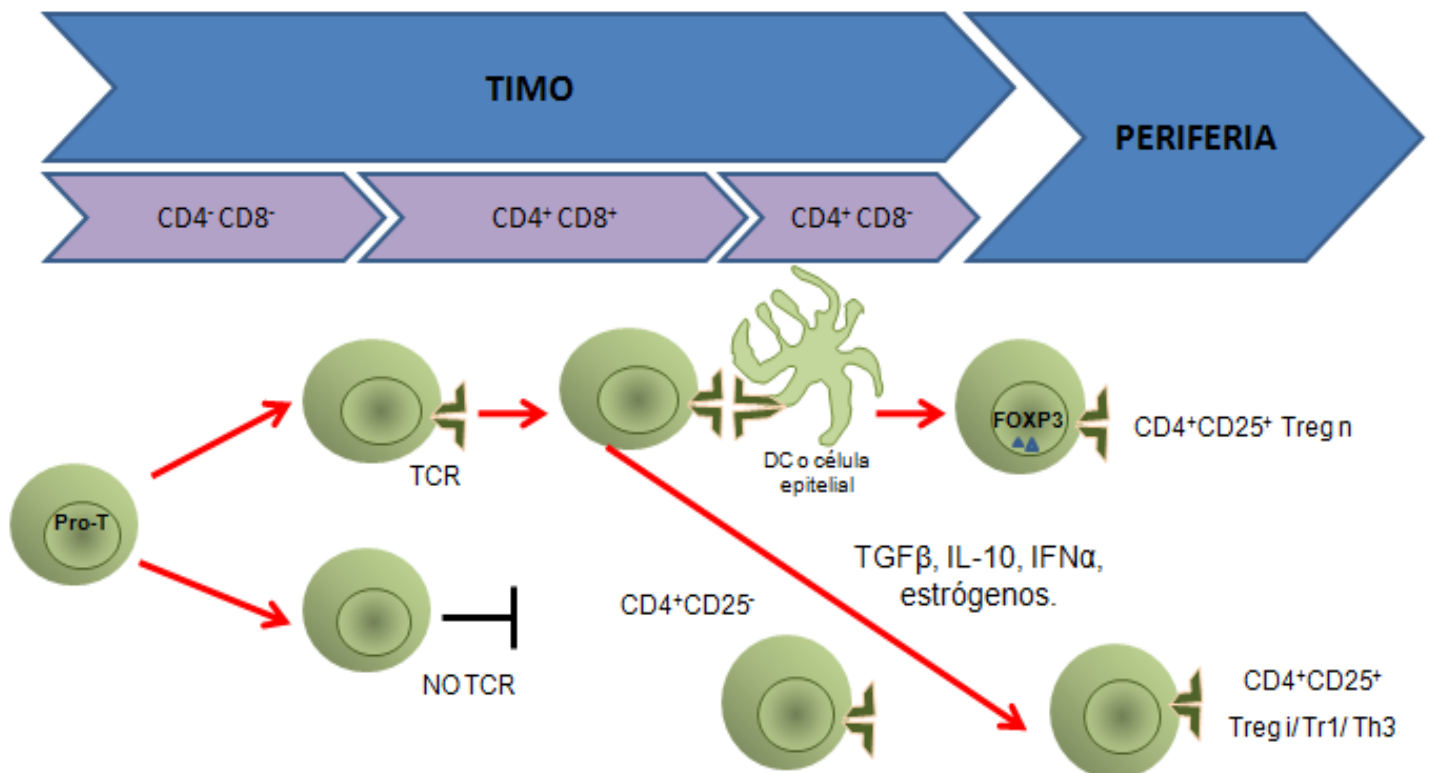


Figura 3. Ontogenia de las células Treg. Las células pro-T son el primer precursor de la línea de linfocitos T. Al ocurrir el reordenamiento de genes de la cadena β , ésta se comienza a expresar en la membrana celular y al mismo tiempo inicia el reordenamiento de la cadena α . Al expresarse ambas cadenas en la superficie, la célula ya posee un TCR. Si el TCR de una célula T reconoce una molécula MHC en el timo, esa célula T es seleccionada para sobrevivir ("selección positiva"); al mismo tiempo las células que reconocen complejos péptido-CPH clase-II preservan la expresión de CD4 y pierden la de CD8. Posteriormente ocurre la selección negativa, donde los linfocitos dobles positivos inmaduros, cuyos receptores reconocen fuertemente los complejos "péptido:CPH" en el timo, sufren apoptosis. En el caso de las células Treg n, la expresión de FOXP3 y CD25 ocurre a nivel tímico desde la selección negativa por estimulación de la presentación antigénica; en cambio, los otros tipos de Treg (Treg i, Tr1 y Th3) no expresan CD25 y FOXP3 (Treg i) sino hasta que son estimulados en la periferia tanto por presentación antigénica como por factores como TGF β , IL-10, IFN α y estrógenos.

Cuando la diferenciación de células T $CD4^+CD25^-$ ocurre en la periferia, favorecida en un microambiente rico en $TGF-\beta$, a estas células se les llama T reguladoras inducidas (Treg i) ³⁴ (figura 3).

Caracterización fenotípica

Durante los últimos años se ha buscado la manera de caracterizar a las células Treg, éstas expresan de forma constitutiva el CD25, el CTLA-4 y el PD-L1 ⁸; sin embargo estos marcadores son comunes a los expresados por células Th activadas, por lo que se han hecho numerosos experimentos con el intento de encontrar algún marcador exclusivo que las identifique.

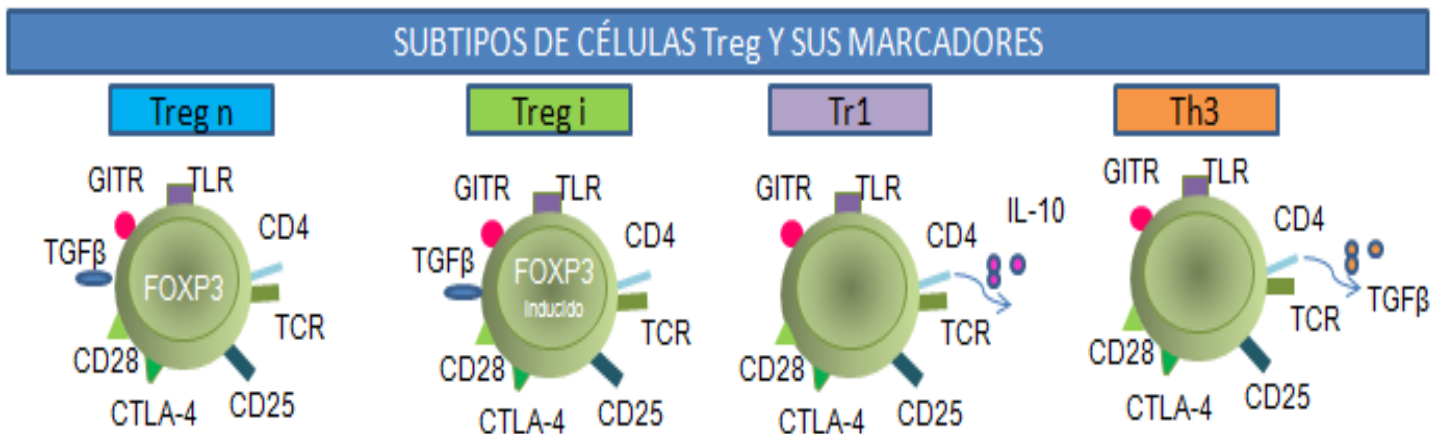


Figura 4. Subtipos de células Treg y sus marcadores. Todas las células Treg se pueden caracterizar fenotípicamente porque expresan de forma constitutiva TCR, CD4, CD25, CTLA-4, CD28, GITR (Receptor de TNF inducido por glucocorticoides por sus siglas en inglés) y Receptores Tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés). Las células Treg n expresan FOXP3 desde el timo. El $TGF\beta$ membranal es expresado tanto por las células Treg n como por las Treg i; éstas últimas también expresan FOXP3 pero por inducción en la periferia. Las células Tr1 secretan IL-10, mientras que las Th3 pueden liberar $TGF\beta$ al medio.

La población de las células Treg aislada del timo y la sangre periférica de los humanos representan entre el 5 y el 10% del total de los timocitos CD4⁺CD8⁻ maduros y del 1 al 2% del total de linfocitos T CD4⁺ en la sangre periférica ^{7,8}. Las células CD4⁺CD25⁺ con capacidad reguladora son aquellas que tienen alta expresión del CD25 y el 95% de estas células tiene una expresión homogénea de CD45RO, CD62L y CD122 ⁸, además expresan receptores tipo Toll (TLR) entre los que están el 4, 5, 7 y 8 ³⁵; no obstante, ninguno es exclusivo de esta población celular. Las células Treg de los humanos expresan FOXP3 ²⁷; a partir de este descubrimiento se consideró a este factor de transcripción como el más importante marcador fenotípico. Si bien FOXP3 puede ser expresado por otras poblaciones celulares después de ser activadas, solo las células Treg tienen una expresión alta y sostenida del mismo (figura 4).

En la tabla 3 se resumen las características de los principales marcadores fenotípicos de las células Treg.

Tabla 3. Características de los marcadores principales de las células Treg

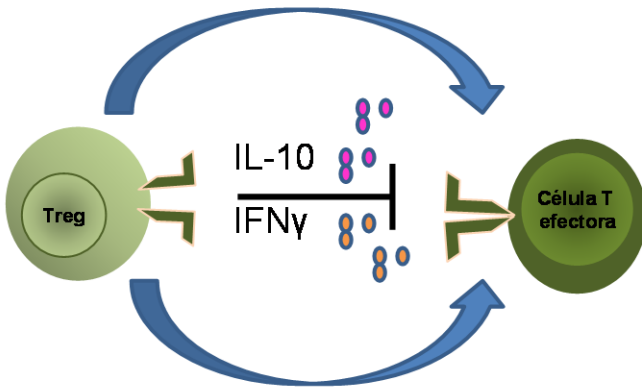
Marcador	Localización	Estructura molecular	Función	Referencia
Receptor de Células T (RCT)	Membrana.	Dos cadenas polipeptídicas, α y β unidas por puentes disulfuro.	Reconocimiento específico de antígeno.	MeSH. Descriptor data. 09/09/11. http://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&term=T-Cell+Receptor
CD4 (T4, Leu-3, L3T4)	Membrana.	Glucoproteína con cuatro dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplásmica.	Diferenciación tímica, transducción de señales, adhesión celular.	UniProt. 09/09/11. http://www.uniprot.org/uniprot/P01730

Marcador	Localización	Estructura molecular	Función	Referencia
CD122 (IL2R β , p75)	Membrana.	Glucoproteína. Dímero de unión no-covalente entre cadena α y β .	Unión a IL-2. Involucrado en la endocitosis mediada por el receptor. Transducción de señales mitógenicas de IL-2.	UniProt. 09/09/11. http://www.uniprot.org/uniprot/P14784
CTLA-4 (CD152)	Membrana.	Homólogo a CD28.	Inhibición de la activación de los linfocitos, contrarrestando las señales liberadas por CD28.	UniProt. 09/09/11. http://www.uniprot.org/uniprot/P16410
Receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR por sus siglas en inglés. TNFRSF18.)	Membrana.	Proteína con un dominio extracelular y uno intracelular (con estructura similar a CD27).	Inhibición de la actividad supresora de las células Treg.	UniProt. 09/09/11. http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y5U5#Q9Y5U5
FOXP3	Núcleo.	Proteína con un dominio de unión a DNA y un dominio tipo "dedo de zinc".	Factor de transcripción. Represor de la transcripción del gen <i>IL2</i> .	UniProt. 09/09/11. http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BZS1
CD62L (selectina L, LAM-1)	Membrana.	Dominios: uno homólogo al de lectinas, uno homólogo al factor de crecimiento epidermal, y dos secuencias repetidas de consenso.	Adhesión entre los leucocitos y el endotelio.	Uniprot. 09/09/11. http://www.uniprot.org/uniprot/P16581

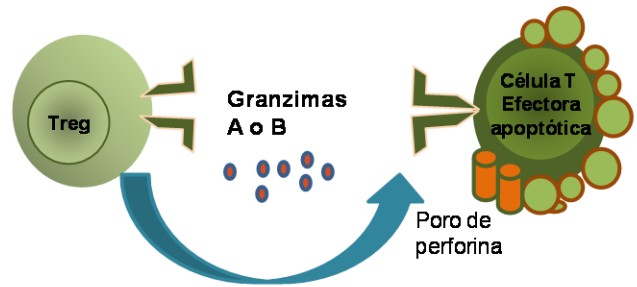
Mecanismos de acción.

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción por los cuales las células Treg median la supresión de las células efectoras (figura 5); dentro de los principales están: a) un mecanismo dependiente de citocinas, especialmente de la IL-10 y del TGF- β , en el que los factores solubles con características antiinflamatorias tienen una acción directa sobre la población de las células T efectoras o bien un efecto inhibitorio sobre las APC, induciendo de esta manera una respuesta tolerogénica; b) un mecanismo de eliminación por medio de la vía de granzimas-perforinas; c) un mecanismo de competencia en el que las células Treg consumen factores de crecimiento y supervivencia tales como la IL-2, que induce a apoptosis en la población de las células efectoras, así como interferencia en sus mecanismos de activación y finalmente, d) un mecanismo dependiente del contacto celular, a través de la unión del CTLA-4 o el CD28 a sus ligandos CD80 y CD86³⁶.

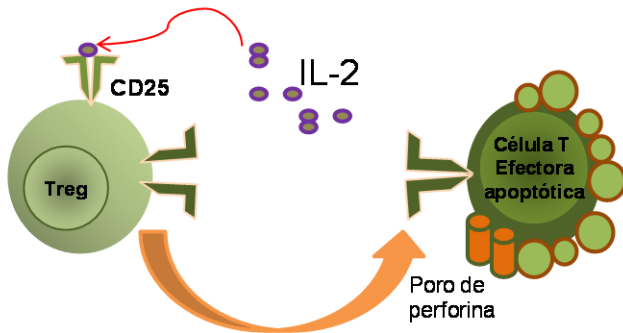
A. Supresión mediada por citocinas



B. Efecto citolítico



C. Supresión mediada por competencia



D. Inhibición de la maduración y función de las CPA

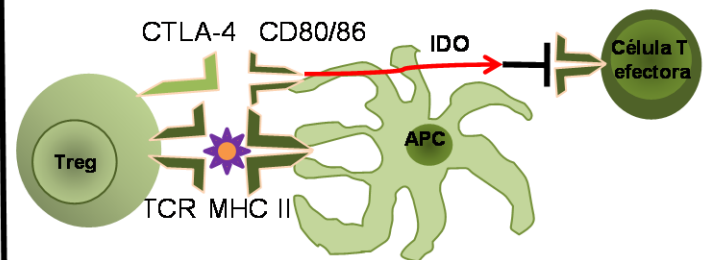


Figura 5. Mecanismos de supresión de células efectoras mediados por células Treg. No se conocen bien los factores que conducen a un mecanismo u otro, pero se han establecido cuatro posibles mecanismos de acción supresora mediados por las células Treg. En (A) la supresión ocurre por la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (también conocida como factor inhibidor de citocinas) y TGFβ (inhibe proliferación celular y la secreción y actividad de muchas citocinas). También puede ocurrir que las células Treg provoquen un efecto citolítico (B) mediante granzimas y perforinas que producen la activación de la vía de las caspasas y lisis osmótica, respectivamente, provocando la muerte de la célula T efectora. Cuando la célula Treg utiliza factores de crecimiento y proliferación que la célula efectora también utiliza, ocurre la supresión mediada por competencia (C). A través de la unión de TCR (Treg) y MHC II (APC) y por la interacción entre el receptor inhibitorio CTLA-4 (Treg) y los receptores CD80/ CD86 (CPA) se induce una respuesta negativa que inhibe la maduración y funcionalidad de las APC (D) y de igual manera, se secreta IDO, una enzima con efecto inmunosupresor.

La participación de citocinas, especialmente la IL-10, en la acción supresora de las células Treg fue ampliamente estudiada en la enfermedad inflamatoria intestinal de los modelos murinos; pero, la participación de ésta y del TGF- β es todavía controversial ³⁷. En los modelos *in vitro*, las células Treg humanas se activan a través de su TCR y es necesaria una señal de coestimulación a través del CD28 ³⁸. Se observó que al separar con membranas semipermeables a las células Treg de las efectoras, se evita la acción supresora, pues es a través del contacto celular que las células Treg se activan y como éstas tienen expresión constitutiva del CTLA-4, éste compite con el CD28 por los sitios de unión; así, por la ausencia de una señal de coestimulación positiva, la presentación antigénica es insuficiente y se favorece un estado de anergia. Otro mecanismo molecular propuesto, también dependiente del contacto celular, es que la unión del CTLA-4 a su ligando inicia una vía de señalización negativa y esto resulta en células T que no proliferan, ya sea por efecto directo del contacto celular o bien por acción de factores humorales como la IL-10 o el TGF- β producidos por las células Treg. Algunos estudios demuestran que la interacción directa y el contacto entre células CD4⁺CD25⁻ y las células Treg es necesario para la inmunorregulación. Por otro lado, se ha informado que las células Treg disminuyen la expresión de CD80 y CD86 en las APC ³⁹, lo que sugiere otro mecanismo de supresión. Adicional a la modulación directa o indirecta de la expresión de CD80 y CD86, se producen señales que activan a laIDO en las DC, la enzima que participa en el metabolismo del triptófano, en el cual se produce quinurenina, un mediador inmunosupresivo (figura 5). Estas señales también promueven la localización de los factores de

transcripción Foxo, que suprimen la expresión de genes que codifican para la IL-6

40 .

Las células Treg n activadas expresan granzima A y B; además tanto las células Treg n como las Treg i presentan citotoxicidad dependiente de perforinas en contra de algunas células blanco ($CD4^+$, $CD8^+$, monocitos $CD14^+$ y DC). Esta citotoxicidad es dependiente de las interacciones adhesivas producidas por CD18, mas es independiente de Fas/FasL⁴¹. Cao y colaboradores⁴² examinaron el papel de las perforinas y granzimas en la eliminación de células tumorales. En su modelo experimental utilizaron líneas tumorales celulares que exclusivamente inducen la producción de granzima B (pero no de granzima A) en células T reg, las cuales utilizan la granzima B para la supresión de la eliminación tumoral mediada por NK y/o células $CD8^+$. La actividad supresora se ve reducida en las células Treg de ratones knock-out deficientes de granzima B ($Gzmb^{-/-}$); en consecuencia los ratones $Gzmb^{-/-}$ eliminan los tumores de manera más eficiente que los ratones de tipo silvestre. Con éste y demás experimentos se demostró que la actividad citolítica de las células Treg ejerce un papel importante en la supresión del mecanismo antitumoral mediado por células NK y células T $CD8^+$.

Las células Treg FOXP3⁺ pueden adquirir la capacidad de controlar específicamente la respuesta inmune de células Th1, Th2 o Th17, al modificar la expresión de los factores de transcripción específicos de cada linaje, T-bet, IRF-4 y RORyt, respectivamente; estos factores de transcripción pueden influir en los patrones de expresión de receptores de quimiocinas que facilitan la migración de las células Treg a un sitio particular de la inflamación. Por ejemplo, una fracción de las células Treg n expresa T-bet, y aumenta en las células Treg por estímulo de un medio rico en citocinas características de Th1; esto incrementa

la expresión del receptor C-X-C 3 de quimiocinas (CCR3, receptor controlado por T-bet), provocando el reclutamiento de células Treg hacia el sitio de inflamación donde predominan las células Th1⁴³⁻⁴⁵.

Es importante señalar que la actividad supresora de las células Treg debe estar controlada, ya que si fuera constante, podría afectar la capacidad del sistema inmune de combatir infecciones o cáncer. Para explicar esto Pasare y Medzhitov describieron un modelo de bloqueo de las células Treg mediado por TLR⁴⁶; el bloqueo de la actividad supresora de las células Treg resulta de una activación de las DC, de tal manera que es posible una respuesta inmune adaptativa patógeno-específica. Un modelo similar propuesto por Suttmuller y colaboradores⁴⁷, demostró que las células Treg son inactivadas durante las infecciones cuando los productos microbianos se unen a TLR2.

Partiendo de estos nuevos hallazgos, es posible hablar de las células Treg como una subpoblación más del tipo CD4⁺ y no como un linaje dedicado exclusivamente a la supresión. Se ha propuesto que poseen la capacidad de activar funciones del sistema inmune, por ejemplo la secreción de IgA por parte de las células B⁴⁸. Es decir, que las células Treg *in vivo* modulan la respuesta inmune de diferentes maneras, dependiendo posiblemente, del estímulo, del lugar, del entorno de citocinas y al parecer de su presencia en el momento en que las células T efectoras reciben el estímulo de activación⁴⁹.

Participación de las células Treg en salud y enfermedad

En los modelos animales, al igual que en los humanos, la deficiencia congénita de las células Treg causa defectos en la inmunorregulación y en la tolerancia a lo propio⁵⁰. Si bien el estudio de esta población celular es complicado por las características que estas células presentan para su aislamiento, se sabe que las células Treg participan de forma activa en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia a lo propio, así como en el control de la respuesta inmune contra antígenos extraños (figura 6).

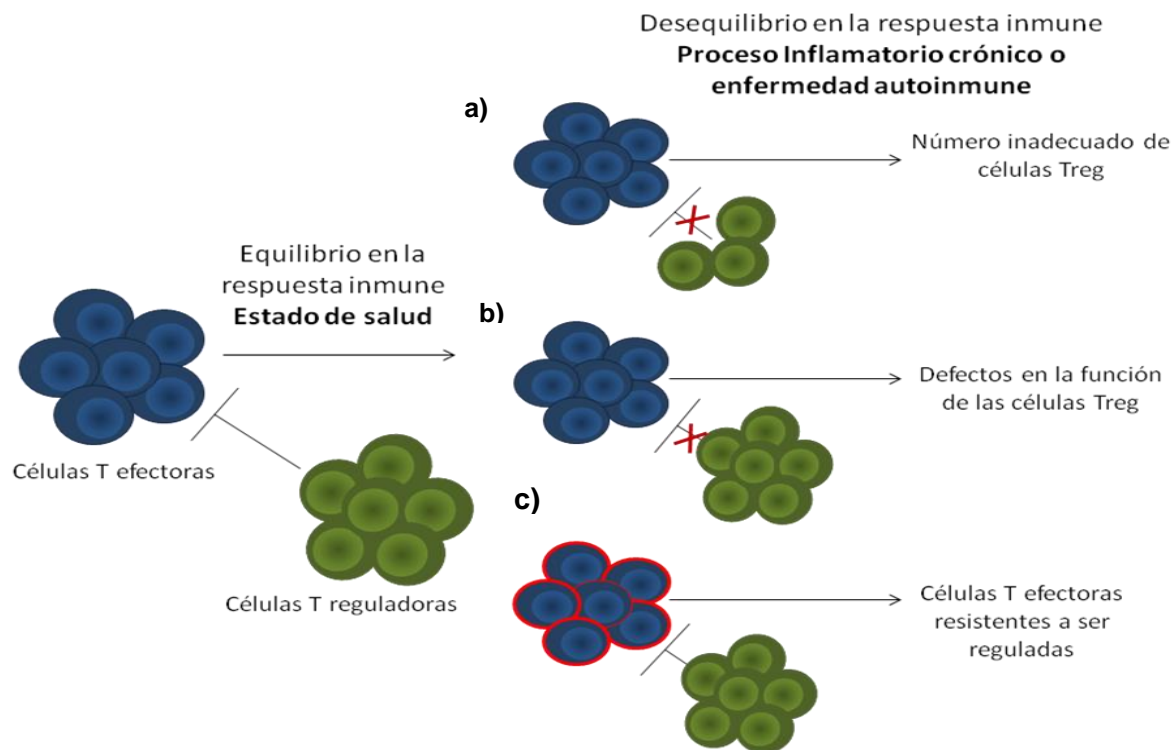


Figura 6. Causas que pueden llevar a fallas en la tolerancia periférica mediada por las células Treg. En estado de salud existe un equilibrio en la respuesta inmune, las células Treg ejercen un papel regulador óptimo. Cuando este equilibrio se rompe, no existe un control adecuado de la actividad y número de células efectoras, por lo que los procesos inflamatorios crónicos o enfermedades autoinmunes pueden ocurrir. Tres escenarios posibles podrían explicar este desequilibrio: a) Un número reducido de células Treg; b) niveles normales de células Treg pero con defectos en su función supresora; c) número y actividad adecuados de células Treg, sin embargo las células efectoras presentan resistencia a ser reguladas.

Tabla 4. Niveles de células Treg y sus efectos en estados patológicos

Enfermedad	Número de células Treg	Efecto
Enfermedades infecciosas		
Hepatitis por HCV	Aumenta	Mayor inflamación del hígado
SIDA por HIV	Aumenta	Inmunosupresión: expansión viral.
Malaria por <i>P. falciparum</i>	Normales/Aumenta	Inmunosupresión: inflamación sistémica y proliferación del parásito.
Enfermedades autoinmunes		
Esclerosis múltiple Síndrome autoinmune poliglandular tipo II Miastenia grave	Normales/Aumenta	Capacidad supresora deficiente, por lo que aumenta la inflamación. Mayor inflamación.
Lupus Eritematoso Generalizado (SLE)	Normales	Capacidad supresora eficiente, T efectoras menos sensibles a supresión.
Artritis Reumatoide (RA)	Aumenta	Capacidad supresora eficiente, T efectoras menos sensibles a supresión. Mayor inflamación.
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD)	Aumenta	Capacidad supresora eficiente, T efectoras menos sensibles a supresión. Mayor inflamación.
Cáncer		
-	Aumenta	Inmunosupresión: incapacidad para eliminar células tumorales por lo que hay expansión tumoral.

Muchos grupos han evaluado la capacidad supresora de las células Treg; sin embargo, los resultados son controversiales. Estas diferencias pueden ser explicadas por la dificultad de obtener esta población celular para ensayos *in vitro*, ya que al aislar estas células a partir de la sangre periférica, los cultivos se realizan con todas las células que expresan CD25 en la superficie. Si bien éste es un marcador que identifica a las células Treg, las células Th lo expresan cuando están activadas sin que les confiera una función reguladora. Los resultados obtenidos en estudios relacionados a procesos de salud y enfermedad, deben ser analizados tomando en cuenta esta dificultad técnica en cuanto a la obtención y pureza de las células Treg en los humanos (tabla 4).

Células T reguladoras y embarazo. En 1953, Medawar propuso que durante el embarazo participan mecanismos de tolerancia inmunológica que protegen al producto de la respuesta alogénica materna ⁵¹. En ausencia de las células T CD4⁺CD25⁺ durante el periodo gestacional, se produce una reacción inmunológica contra el feto ⁵².

Se han reportado porcentajes altos de células Treg en la decidua y la sangre periférica durante el embarazo. El aumento de esta población es mayor en las etapas tempranas de la gestación y presentan un pico máximo en el segundo trimestre con disminución en la etapa post-parto ⁵³, lo que sugiere la participación de esta población en la tolerancia materna hacia antígenos específicos y no específicos del feto (figura 7).

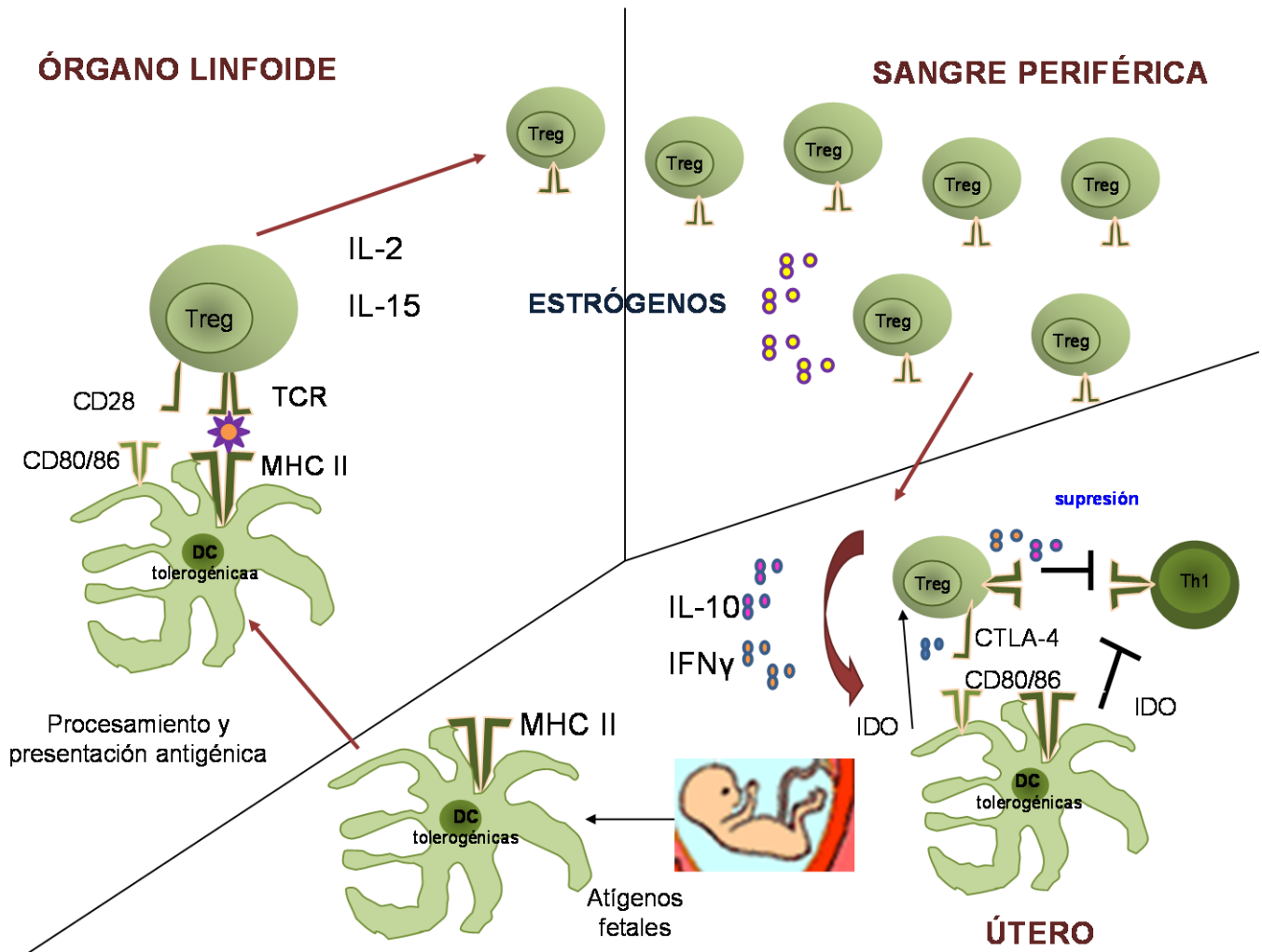


Figura 7. Tolerancia materno-fetal mediada por células Treg. En el útero, (A) Los antígenos fetales son procesados y presentados a través del MHC II de las DC tolerogénicas. Estas DC migran a los órganos linfoides (B) para llevar a cabo la presentación antigénica a las células Treg, que son activadas por medio de la interacción entre su TCR con el MHC II de la DC y por la expresión de señales de coestimulación CD80/86 y su ligando CD28. Esta activación induce a la secreción de citocinas de proliferación como IL-2 e IL-15, por otro lado, los niveles elevados de estrógenos en la periferia (C), propios del embarazo, podrían estar favoreciendo también la diferenciación de células a Treg. Las células Treg pasan al torrente sanguíneo y posteriormente ingresan al útero (A), donde actúan suprimiendo a las células efectoras como Th1, a través de contacto con DC tolerogénicas; sin embargo esta vez las células Treg estarán expresando el receptor inhibitorio CTLA-4. Las células Treg secretarán citocinas antiinflamatorias como IL-10 e IFN γ , mientras que las DC secretarán la enzima IDO que tiene un efecto inmunosupresor.

Se ha demostrado que las mujeres fértiles presentan un descenso significativo en las células Treg en sangre periférica después de la ovulación; en cambio, las mujeres que presentan abortos espontáneos no muestran fluctuaciones en la cantidad de células Treg ⁵⁴. Aunque no se conocen los factores que regulan a estas células, se ha reportado la participación de los estrógenos en el aumento de la expresión de Foxp3 *in vitro* e *in vivo*, ya que en ratones tratados con estrógenos aumenta el número de las células T CD4⁺CD25⁺. Estos resultados sugieren una vía por la cual esta población se incrementa durante la gestación para promover la tolerancia materna al feto ⁵⁵.

Defectos en el reclutamiento y/o la función de las células Treg durante el embarazo, pueden llevar a condiciones patológicas como abortos espontáneos, trabajo de parto pretérmino o preeclampsia ⁵⁶.

Células T reguladoras y enfermedades infecciosas. Las células Treg regulan la respuesta inflamatoria para evitar el daño tisular, pero este mecanismo de inmunorregulación puede favorecer la supervivencia del patógeno y en muchos casos la persistencia del mismo, llevando una infección a la cronicidad.

Como las células Treg expresan TLRs, los productos microbianos favorecen directamente su función. Estas células tienen un efecto inhibitorio en la respuesta Th1, promueven la polarización hacia las células Th2 y de esta forma se protege al huésped del daño que puede causar un proceso inflamatorio. La función de esta población celular es responder a las señales asociadas a la destrucción tisular y minimizar el daño colateral ⁵⁰. En los humanos se han asociado defectos en la población de las células Treg con enfermedades infecciosas causadas por *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter pylori*, virus de inmunodeficiencia humana

(HIV por sus siglas en inglés), virus de hepatitis C (HCV por sus siglas en inglés), citomegalovirus y Leishmania ⁵⁷⁻⁶¹.

En modelos animales se demostró que la acumulación de las células Treg en los sitios de infección, limita la eficacia de la respuesta Th1; como consecuencia, las células Treg promueven la persistencia y potencial transmisión del agente patógeno ⁶². Asimismo, la continua acumulación de estas células en los sitios de infección rompe la homeostasis en los órganos infectados, provocando una inmunosupresión local. En algunos casos el aumento de las células Treg puede causar reactivación de la enfermedad.

En biopsias de hígado de pacientes con hepatitis por HCV, existe una correlación inversa entre el número de las células Treg en la sangre periférica y el grado de inflamación histológica ⁶⁰.

La eliminación de las células Treg en la periferia en modelos murinos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) puede prevenir la progresión de la enfermedad ⁶³, mientras que la evidencia disponible en ensayos *in vitro*, indica que la infección por HIV se controla con la presencia de esta población celular ⁵⁹. En otras enfermedades infecciosas como la malaria, estas células no muestran un efecto protector, ya que su presencia abate la respuesta inmune en contra del parásito, modificando el curso de la infección en la sangre, con mayor producción del TGF- β y disminución en la respuesta inmune antígeno-específica, así como de la producción de las citocinas proinflamatorias, aumentando la sobrevivencia del *P. falciparum* ⁶⁴.

Células T reguladoras y enfermedades autoinmunes. Identificar a las células Treg es más complejo en las enfermedades autoinmunes debido a que la

inflamación persistente favorece altas frecuencias de células Th activadas en sangre periférica y como se mencionó previamente estas células expresan CD25 en la superficie, lo que también ha dado resultados controversiales.

Se han reportado defectos cuantitativos y cualitativos en la población de las células Treg en los pacientes con enfermedades autoinmunes. Las células Treg de los pacientes con esclerosis múltiple (EM) suprimen tan sólo un 20% de la proliferación celular, mientras que las de sus controles el 80%⁶⁵. Esta disminución en la capacidad supresora también se ha reportado en los pacientes con síndrome autoinmune poliglandular tipo II y con miastenia grave autoinmune^{12,66}. Sin embargo estos estudios deberán ser reevaluados con mediciones de marcadores más específicos como FOXP3, CD152 y CD127.

En la sangre periférica de los pacientes con lupus eritematoso generalizado (SLE por sus siglas en inglés) y diabetes autoinmune se encuentran menos células T CD4⁺CD25⁺ que en sujetos sanos^{67,68}. Sin embargo, en los pacientes con SLE, cuando las células Treg se identifican con FOXP3⁺ no sólo conservan el mismo porcentaje en relación a los controles sanos, sino que también conservan su capacidad supresora⁴⁹, lo que sugiere que los defectos en la supresión observados en cultivos autólogos son más por la presencia de células T efectoras menos sensibles a la acción reguladora que por un defecto en supresión de las células Treg.

En la artritis reumatoide (RA por sus siglas en inglés) se ha sugerido que las células Treg presentan defectos en la producción de las citocinas y que en aquellos pacientes tratados con bloqueadores del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α por sus siglas en inglés) no sólo aumenta el número de las células Treg, sino también, su capacidad supresora⁶⁹.

La presencia de las células Treg en los pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD por sus siglas en inglés) ha sido estudiada por numerosos investigadores. La citometría de flujo se ha utilizado para determinar el número de células reguladoras en el lavado broncoalveolar (BAL por sus siglas en inglés); se ha reportado un aumento de células Treg en pacientes con COPD comparándolos con controles no fumadores ⁷⁰. Al analizar los folículos linfoides, que están aumentados de tamaño por la enfermedad, se observó un incremento en la expresión de FOXP3 en las células T de pacientes con COPD; sin embargo, las células Treg presentes en los folículos son del tipo Treg i más que del tipo Treg n, ya que la formación de células Treg i se ve favorecida por presentación antigénica subóptima en un microambiente que contiene citocinas promotoras del desarrollo de esta población celular; por ejemplo, las células epiteliales alveolares tipo II proveen un microambiente rico en TGF- β que favorece el desarrollo de células Th3. Las células Treg i se caracterizan por tener una expresión inestable de FOXP3, por este motivo se piensa que las células reguladoras presentes en los folículos linfoides de pacientes con COPD son del tipo inducido, y que la inestabilidad en la expresión de FOXP3 podría estar reduciendo su capacidad reguladora ⁷⁰. Algunos cambios epigenéticos podrían estar implicados en la función de las células reguladoras en COPD, por ejemplo, el funcionamiento de las histonas desacetilasas ⁷¹. Por otro lado la reducción en los niveles de IL-10 en pacientes con COPD al compararse con controles sanos ⁷⁰ sugiere otro mecanismo por el cual la inmunorregulación no es eficiente en este grupo de pacientes. Un concepto importante a considerar es la función de las células Treg en COPD, relacionada con la función de linfocitos T efectores, ya que en los BAL de pacientes con COPD, la razón de linfocitos T citotóxicos (CTL por

sus siglas en inglés) y células Treg es mayor que la observada en sujetos fumadores sin COPD.

Se requieren más estudios que permitan mejorar las estrategias terapéuticas para controlar las enfermedades autoinmunes, éstas deberán ser dirigidas para incrementar el número y la eficiencia de células Treg para controlar la proliferación de las células T efectoras.

Células T reguladoras y cáncer. Las células Treg han sido identificadas como el mayor obstáculo para la inmunoterapia antitumoral efectiva. La abundancia de estas células en sangre periférica es mayor en pacientes con múltiples tipos de cáncer, y su prevalencia, debido a los linfocitos infiltrados en el tumor, correlaciona con un mal pronóstico clínico ⁷². Por el contrario, la eliminación o inactivación de las células Treg resulta en una mejor respuesta inmune antitumoral, así como una mayor eficacia de las vacunas contra el cáncer ⁷⁰.

Las células tumorales producen una variedad de factores solubles que participan en la progresión tumoral y en la inmunosupresión relacionada con células Treg. Estos factores incluyen varias citocinas como el TGF- β e IL-10. Se ha propuesto que el TGF- β puede inducir la diferenciación de las células CD4⁺ CD25⁻ periféricas a células Treg CD4⁺ CD25⁺ funcionales a través de la estimulación del factor transcripción FOXP3 ⁷³. La producción local de TGF- β es un factor clave en la transformación local de las células T efectoras en células Treg de supresión ⁷³.

La IL-10 es una citocina inmunosupresora y antiinflamatoria, que es producida por varios tipos de células tumorales y también es producida por otras células con actividad inmunosupresora, como los macrófagos asociados al tumor (TAM por sus siglas en inglés), las células Treg o por las células Th2. Se ha informado que los linfocitos infiltrados en el tumor o de sangre periférica de pacientes con cáncer secretan altos niveles de IL-10, que pueden estar implicados en la inmunosupresión a través de la actividad de células Treg ⁷⁵.

En un modelo murino realizado por Kuczma y colaboradores ⁷⁶ se demostró que la mayoría de las células Treg presentes en ratones sanos mantienen un fenotipo supresor estable; en éstas se expresó un nivel alto de Foxp3, así como un conjunto exclusivo de TCR no utilizado por células T virgen. Un pequeño subconjunto de células Treg, poseía TCR comunes a los de las células T efectoras y expresó un menor nivel de Foxp3. La respuesta a antígenos derivados de tumores induce a un reclutamiento clonal eficiente y a la expansión de células efectoras a antígenos específicos y de células Treg. Sin embargo, la población de células T reguladoras que predomina en los tumores corresponde al de las células que expresan TCR compartidos con células T CD4⁺ efectoras. Estos resultados sugieren que el repertorio de células Treg en los tumores se genera por la conversión de las células T CD4⁺ efectoras o la ampliación de un subconjunto de menor importancia de las células Treg.

En conclusión, el éxito de la inmunoterapia en cáncer es posible que dependa de la capacidad de bloquear la regulación positiva de FOXP3 en las células T CD4⁺ supresoras y / o la inhibición selectiva de la expansión de un subconjunto Treg.

Conclusiones

Las células Treg son una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ cuyas funciones primordiales y más estudiadas son la supresión de la respuesta inmune y el mantenimiento de la tolerancia a autoantígenos.

Las células Treg expresan de manera constitutiva marcadores como CD25, CD45RO, CD62L y CD122, mas éstos no son exclusivos de este linaje celular. Recientemente se ha incorporado a FOXP3 como marcador fenotípico característico de las células Treg, ya que en éstas se expresa de manera elevada y sostenida, además de ser un factor crítico para el desarrollo y función de esta clase de linfocitos. Actualmente se siguen realizando investigaciones para encontrar marcadores más específicos que nos permitan reconocer a las células Treg.

Hasta ahora se han descrito unos cuantos mecanismos moleculares mediante los cuales actúan las células Treg. Algunos modelos proponen que la activación de las Treg se debe al contacto directo de estas células con las efectoras o APC; otros grupos de investigación han propuesto mecanismos dependientes de citocinas antiinflamatorias. Concluyo que la modulación de la respuesta inmune que ejercen las células Treg ocurre a través de distintas vías, por lo que es importante evaluar bajo qué condiciones se activa una u otra.

Las células Treg ejercen un importante papel en los procesos de salud y enfermedad. En el embarazo, son pieza clave en la tolerancia materno-fetal. En las enfermedades infecciosas, el aumento de células Treg reduce la capacidad del

sistema inmune de combatir a los agentes patógenos, llevando a la cronicidad y a procesos inflamatorios más severos. En la autoinmunidad, algunos estudios demuestran que no es que éstas tengan una función deficiente sino que quizá las células efectoras presentan una resistencia a ser reguladas; sin embargo, esto debe ser estudiado más a fondo. En el cáncer se ha observado que las células tumorales favorecen la proliferación de células Treg y que la mayoría de estas últimas suelen expresar antígenos comunes a los de las células efectoras, por lo que existe una disminución en la capacidad de eliminar células tumorales.

Resulta ser una importante línea de investigación profundizar y mejorar los modelos de estudio de las células Treg, ya que elucidar las características y mecanismos de acción de estas células podría facilitar el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para combatir diversos problemas de salud.

Bibliografía

1. Abbas A K, Lichtman A H and Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7a ed. Elsevier Saunders. 2012. pp. 3-19, 153-243.
2. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh and Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -s (CD25): breakdown of single mechanism of self-tolerance causes various diseases. *J. Immunol.* 155:1151.
3. Groux H and Powrie F. 1999. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol. Today* 20:442.
4. Mottet C, Uhling H and Powrie F. 2003. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 170:3939.
5. Wood H and Sakaguchi S. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3:199.
6. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz , Exley M, Wilson B Et al. 2002. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109:131.
7. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T and Shuler G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193:1303.
8. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ and Hafler D.A. 2001. CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 167:1245.
9. Jonuleit H, Schmitt E, Tuettenberg A, Knop J and Enk AH. 2001. Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193:1285.
10. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beherray S and Kwok WW 2004. Autoreactive T cells in Healthy Individuals. *J. Immunol.* 172:5967

11. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL and Hafler DA. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199:971.
12. Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR and Lorenz HM. 2004. Defective suppressor function of human CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J. Exp. Med.* 199:1285.
13. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA and Mauri C. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J. Exp. Med.* 200:277.
14. Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, Planta M, McGlaughlin M, Jackson R, Zeigler S and Fauci A. 2004. CD25+CD4+ regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate both CD4+ and CD8+ HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J. Exp. Med.* 200:331.
15. Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F: Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 2005, 4:579-586.
16. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299:1057–61.
17. Gershon RK and Kondo K. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.*18:723.
18. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K and Masuda T. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subsets a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 181:72.
19. Asano M, Toda M, Sakaguchi N and Sakaguchi S. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* 184:387.

20. Fontenot JD, Gavin MA and Rudenski AY. 2003. FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4:330.
21. Annunzaito F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E and Romagnani S. 2002. Phenotype, localization and mechanism suppression of CD4+CD25+ human thymocytes. *J. Exp. Med.* 196:379.
22. Levings MK, Sangregorio R and Roncarolo MG. 2001. Human CD25+CD4+ regulatory T cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* 193:1295.
23. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989. 7:145-73.
24. Nishizuka Y and Sakukura T. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166:753.
25. Kojima A and Prehn RT. 1981. Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune disease in mice. *Immunogenetics.* 14:15.
26. Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P and Ferradini L. 2004. FoxP3 expressing CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the junction of infiltrating T cells. *J. Immunol.* 173:1444.
27. Gambineri E, Torgerson TR and Ochs HD. 2003. TI-immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked inheritance (IPEX) a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3 a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 15:430.
28. Powell BR, Buist NR and Stenzel P. 1982. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy and fatal infection in infancy. *J. Pediatr.* 100:731.
29. Seddon B and Mason D. 2000. The third function of the thymus. *Immunol. Today* 21:95.

30. Jodan MS et al. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2:301.
31. Norihiko W, Yi-Hong W, Heung KL, Tomoki I, Yui-Hsi W, Wie C and Yong-Jun L. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436:1181.
32. Khattri R, Cox T, Tasayko SA and Ramsdell F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* 4:337.
33. Loser K, Hansen W, Apelt J, Balkow S, Buer J, Beissert S. 2005. *In vitro*-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity. *Gene Therapy* **12**, 1294–1304
34. Matthias G. von Herrath & Leonard C. Harrison. 2003. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 3, 223-232.
35. Carmalho I, Lopes-carvalho T, Ostler D, Zejenay S, Haury M and Demengeot J. 2003. Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipo polysaccharide. *J. Exp. Med.* 197:403.
36. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino C and Hafler DA. 2010. FOXP3+ regulatory t cells in the human immune system. *Nature Reviews*, 10:490.
37. Gerard C. Blobel, Xuedong Liu, Shijing J. Fang, Tam How and Harvey F. Lodish. 2001. A Novel Mechanism for Regulating Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276. 39608-39617.
38. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A and Bluestone JA. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431.
39. Cederbom L, Hall H and Ivars F. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 30:1538.

40. Tadokoro, C.E., Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ and Dustin ML. 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 203, 505–511.
41. William J. Grossman, James W. Verbsky, Winfried Barchet, Marco Colonna, John P. Atkinson and Timothy J. 2004. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death . *Ley Immunity.* 21:4,589-601.
42. Xuefang C, Sheng F., Fehniger TA. , Song J., Collins LI, Piwnica-Worms DR and Ley TJ. 2007. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *J Immunol.* 27:4, 635-646.
43. Koch, M.A., Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB and Campbell DJ. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis function during type 1 inflammation. *Nat. Immunol.* 10, 595–602.
44. Zheng, Y., Chaudhry A, Kas A, deRoos P, Kim JM, Chu TT, Corcoran L, Treuting P, Klein U and Rudensky AY. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor F4 to control TH2 responses. *Nature* 458, 351–356
45. Zhou, L. Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF and Littman DR. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature* 453, 236–240.
46. Pasare C, Medzhitov R. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+ CD25+ T cell mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 299:1033-6.
47. Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG and Adema GJ. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 116:485-94.
48. Cerutti , A . & Rescigno , M . 2008 . The biology of intestinal immunoglobulin A responses . *Immunity* **28** , 740 – 750

49. Vargas-Rojas MI, Crispín JC, Richaud-Patin Y and Alcocer-Varela J. 2008. Quantitative and qualitative normal regulatory T cells are not capable of inducing suppression in SLE patients due to T-cell resistance. *Lupus*. 17:289-94.
50. Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H and Maloy K. 2003. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found. Symp.* 252:92.
51. Medawar PB. 1953. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7:320.
52. Aluvihare VR, Kallikourdis M and Betz A G. 2004. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 5:266.
53. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM and Drayson M t. 2004. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD4+CD25+ regulatory T-cells subset. *Immunology* 112:38.
54. Arruvito L, Sanz M, Banham AH and Fainboim L. 2007. Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *J Immunol*,178:2572-2578.
55. Polanczyk MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulls M, Vandembark A A, Ziegler SF and Offner H. 2004. Estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cells compartment. *J. Immunol.* 173:2227.
56. Saito S, Yasuchi S and Masatoshi S. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells in human pregnancy. *J. Repro. Immunol.* 65:111.
57. Raghavan S, Suri-Payer E and Holmgren J. 2004. Antigen-specific in vitro suppression of murine Helicobacter pylori-reactive immunopathological T cells by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Scan. J. Immunol.* 60:82.
58. Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM and Nixon DF. 2004. Human CD4+CD25+ regulatory T cells control T-cells responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J. Virol.* 78:2454.
59. Andersson J, Boasso A, Nilsson J, Zhang R, Shire NJ, Lindback S, Shearer GM and Chougnet CA. 2005. Cutting edge: the prevalence of regulatory T cells in

- lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J. Immunol.* 174:3143.
60. Cabrera R., Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C and Nelson DR. 2004. An Immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C infection. *Hepatology* 40:1062.
61. Belkaid Y, Piccirilo AC, Mendez S, Shevack E and Sacks DL. 2002. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420:502.
62. Belkaid Y and Rouse BT. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunol.* 6:353.
63. Beilharz MW, Sammels LM, Paun A, Shaw K, van Eeden P, Watson MW and Ashdown ML. 2004. Timed ablation of regulatory T cells can prevent murine AIDS progression. *J. Immunol.* 172:4917.
64. Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korble D, King E, Fletcher H, Andersen RF, Bejon P, Thompson F, Dunachie SJ, Edele F, de Souza JB, Sinden RE, Gilbert SC, Riley EM and Hill AV. 2005. Up regulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlate with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23:287.
65. M Edström, J Mellergård, J Mjösberg, MC Jenmalm, M Vrethem, R Press, C Dahle, and J Ernerudh. 2011. Transcriptional characteristics of CD4⁺ T cells in multiple sclerosis: Relative lack of suppressive populations in blood. *Mult Scler.* 17(1):57-66
66. Balandina A, Lécart S, Dartevelle P, Saoudi A and Berrih-Aknin S. 2005. Functional defect of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. 105:735.
67. M.-F Llu, C.-R Wang, L.-L Fung and C. -R Wu. 2004. Decreased CD4⁺CD25⁺ T Cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scan. J. Immunol.* 59:198.

68. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S and Maclaren N. 2002. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109:131.
69. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, Mauri C. 2004. Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . *J Exp Med.* 200(3):277-85.
70. Plumb J., Smyth JC, Singh Dave. 2009. Role of Regulatory T-cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annals of Respiratory Medicine.* 33:61– 67.
71. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC and Barnes PJ. 2005. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med.* 352:1967–1976.
72. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, et al. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169: 2756–2761.
73. Curiel TJ. 2008. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin. Immunol* 20: 241–246.
74. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H and Horwitz DA. 2004. Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol.* 172: 5213-5221.
75. Huang M, Wang J, Lee P, Sharma S, Mao JT, Meissner H, Uyemura K, Modlin R, Wollman J, Dubinett SM. 1995. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Res.* 55: 3847-3853.
76. Kuczma M, Kopij M, Pawlikowska I, Wang CY, Rempala GA, Kraj P. 2010. Intratumoral Convergence of the TCR Repertoires of Effector and Foxp3⁺ CD4⁺ T cells. *Plos One.* 5(10): e13623.