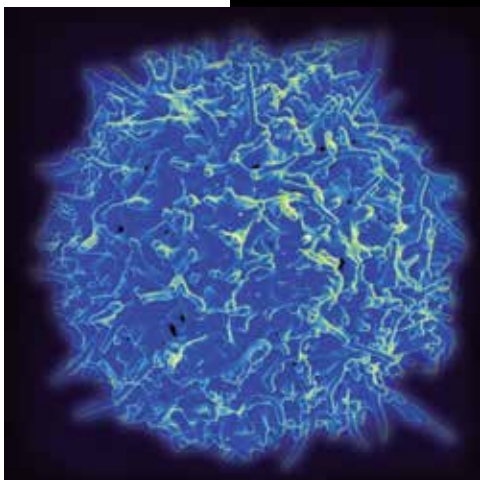




Las células Treg en la inmunoedición e inflamación asociada al cáncer

Carlos Agustín Villegas Valverde^a, Deisy María Ramírez Pérez^b

Resumen

En la actualidad existen 2 teorías inmunológicas, mayormente aceptadas, que explican el origen y desarrollo del cáncer: la inmunoedición tumoral y la inflamación asociada al cáncer. En ambas participan los linfocitos T reguladores (Treg) en el proceso de carcinogénesis, progresión y metástasis. Pero la mayoría de los estudios las ubican en etapas avanzadas dentro de la inmunopatogenia. La teoría de la inmunoedición del tumor propone 3 etapas inmunopatogénicas: eliminación, equilibrio y escape. Sin embargo, estas células participan en la tolerancia periférica y homeostasis del sistema inmunitario (SI). Por lo tanto, su papel no se limita a contribuir al escape de los tumores, sino que pueden participar aún antes de la aparición de la primera célula neoplásica. Quizá la función más importante se encuentre en la etapa de equilibrio de la inmunoedición, pues en ella el papel del SI adaptativo es decisivo para el control del paso a la etapa de escape, pudiendo en algunos casos provocar la regresión espontánea.

^aEspecialista en Inmunología. Profesor Asociado de la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Máster en Educación Médica. Investigador Agregado del Instituto de Oncología y Radiobiología de Cuba.

^bEspecialista en Farmacología Clínica. Profesora de Farmacología. Facultad Ciencias Médicas de Holguín, Cuba.
Correos electrónicos: carlosvillega@infomed.sld.cu, vilvalca@gmail.com

Recibido: 20-mayo-2015. Aceptado: 18-julio-2015.

nea. Profundizando en los conocimientos de la dinámica que muestran estas células en las etapas iniciales del cáncer, se podrán describir biomarcadores diagnósticos y pronósticos, así como blancos terapéuticos que cambien el curso de la enfermedad. En esta revisión se hace una aproximación a la participación de las Treg en el desarrollo del cáncer a través de los procesos de la inflamación e inmunoedición.

Palabras clave: Sistema inmunitario, Treg, regulación, inflamación, inmunoedición, cáncer.

Treg cells in the immunoediting and inflammation associated with cancer

Abstract

Nowadays there are two accepted theories explaining the origin and development of the cancer: Tumor Immunoediting and the inflammation associated to the cancer. In both, the participation of regulatory T cells (Treg) in the carcinogenesis, progression and metastatic processes is evident but most of the studies locate these cells in advanced stages of the immunopathogenesis of the neoplastic process. However, these cells participate in the peripheral tolerance and homeostasis of the immune system. Therefore their role is not limited to contribute in the tumor cell evasion, but rather they may participate before the first cancer cell emerges. Their most important function is probably the one involved in the equilibrium stage of the immunoediting, because in this phase

the adaptive immune system is decisive for the progression into the escape stage, being able in some cases to induce a spontaneous regression of the tumor. A study in depth of the dynamics of these cells in the initial stages of the cancer can help with the identification of biomarkers for diagnosis and prognosis, as well as therapeutic targets that could change the course of cancer. In this revision an approach to the participation of the Treg in the development of cancer through inflammation and immunoediting is described.

Key words: Immune system, Treg, regulation, inflammation, immunoediting, cancer.

INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de las células T reguladoras (Treg) ha habido diferentes posiciones y contradicciones alrededor de ellas, e incluso se ha cuestionado su existencia. A finales de los años sesenta se abrió un camino que condujo al descubrimiento de diferentes poblaciones y subpoblaciones de linfocitos. Estas células que al microscopio óptico y con las tinciones habituales se muestran indistinguibles, con el desarrollo de la tecnología, los anticuerpos monoclonales y el conocimiento en inmunología, se develó la existencia de una diversidad, no sólo fenotípica sino también funcional^{1,2}.

El primer esclarecimiento fue en las 2 poblaciones más distintivas del sistema inmunitario (SI) adaptativo, los linfocitos B y T, posteriormente se ha ido describiendo una gama creciente de diferentes células con características fenotípicas distintivas, que van desde los marcadores de superficie hasta los factores transcripcionales o reguladores maestros, que definen perfiles funcionales altamente especializados^{1,2}.

Junto con la diversificación fenotípica y funcional de estas células surgieron las incógnitas acerca de sus orígenes. ¿Tendrían un ancestro común en la línea linfoide o progenitores mieloides diferentes? Hoy esta interrogante está esclarecida, a la luz de los conocimientos actuales, ya que se llegó al consenso de un progenitor linfoide común.

Posteriormente, surgen nuevas disquisiciones en cuanto a los destinos de los precursores celulares de los diversos linfocitos. Aparecen dicotomías entre compromisos hacia un patrón específico de diferen-

ciación, con propiedades antagónicas de exclusión, es decir un patrón de diferenciación excluye la posibilidad del desarrollo de otro, y más recientemente, la flexibilidad y plasticidad de estos linfocitos, que proponen la interconversión de fenotipos funcionales condicionados por el microambiente donde se desarrollan y actúan estas células.

En este contexto ha surgido, caracterizado y evolucionado el conocimiento sobre las células Treg. Los que mencionaron primero la existencia de linfocitos “supresores” fueron Gershon y Kondo, en 1971, pero su hallazgo quedó silenciado por falta elementos necesarios para su comprensión por parte de la comunidad científica, hasta los años noventa del siglo XX, cuando se logran vincular con la producción de ciertas citocinas supresoras o reguladoras como la IL-10. Esto permitió agregar a la dicotomía Th1/Th2 el llamado patrón regulador Th3¹⁻³.

En este nuevo escenario donde evidencias moleculares comenzaron a apoyar no sólo la existencia de estas células sino que, además, se les adjudica una función específica, investigadores del The Aichi Cancer Research Institute (Nagoya) descubren que si a ratones sin timo que habían desarrollado enfermedades autoinmunitarias, se les transferían linfocitos de animales normales singénicos, se revertía la autoinmunidad. Esto sugirió que los animales normales, no sólo producen linfocitos respondedores y autorreactivos, sino que además, generan reguladores¹⁻².

Shimon Sakaguchi y colaboradores continuaron sistemáticamente estos estudios, hasta llegar a una caracterización más detallada de las células Treg y acuñaron su nombre como linfocitos T “reguladores” (Treg). Inicialmente se fenotiparon con los marcadores CD4⁺ y CD25⁺ en ratones y posteriormente en humanos. En el año 2003, Fontenot, Hori y Khattri con sus respectivos colaboradores descubren el gene codificante para un factor transcripcional que funciona como “controlador maestro” en estas células, el Foxp3 (*fork head box* [P3], por sus siglas en inglés). Gracias a estas investigaciones se conocen los marcadores que tipifican estos linfocitos, permitiendo su caracterización y diferenciación del resto de los otros linfocitos, dentro de los que se encuentran en superficie moléculas como: CD4⁺, CD25⁺,

antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4⁺), receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) inducido por glucocorticoides (GIRT⁺) e intracelulares como el factor transcripcional Foxp3^{1,2,4,5}.

No sólo se han descrito Treg CD4⁺, también se han estudiado sus contrapartes CD8⁺ con funciones supresoras, encontrándose que su concentración es mucho menor que las Treg CD4⁺. Sin embargo, en ciertos tejidos como los ojos y las tonsilas, las Treg CD8⁺ juegan un papel preponderante en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica⁶⁻⁸.

A modo introductorio, también es necesario aproximar la inserción de la Treg en el cáncer. El primer científico que involucró a componentes del SI en el cáncer fue Rudolf Virchow en 1868, y lo hizo desde una relación favorecedora. El infiltrado linforeticular en un tejido revelaba la existencia del cáncer en los sitios de inflamación crónica. Con esta hábil observación describió la relación de la inflamación con el origen del cáncer. Paradójicamente, 20 años después, un cirujano de Nueva York, William Coley, desarrolló un tratamiento para los tumores malignos infectándolos con bacterias. Por lo tanto, desde el siglo XIX se evidenció la existencia de roles duales contrapuestos en el funcionamiento del SI y específicamente en su participación en el cáncer. Por un lado se evidencia una relación favorecedora entre la inflamación y el cáncer, y por otro, la inflamación infecciosa podía hacer evidente el cáncer al SI eliminándolo. En 1900 Paul Ehrlich planteó que en el cuerpo existían moléculas capaces de reconocer y destruir tumores. En este último aporte se fundamenta la hipótesis de la “vigilancia inmunológica” postulada por sir Macfarlane Burnet y Lewis Thomas a mediados del siglo XX. Con esta teoría comienzan los científicos a dirigir la mirada hacia el SI como defensor contra el cáncer. No obstante, siempre existieron algunas evidencias que se oponían a esta hipótesis, dejando claro que se requerían nuevos estudios al respecto^{9,10}.

En el 2001 se amplía la teoría de la vigilancia inmunológica al involucrar a la inmunidad innata, desde el modelo del peligro de Polly Matzinger. En este caso mediante la activación de receptores no clonales ubicados en células del SI innato, por señales de daño celular emitidas por las células neoplásicas

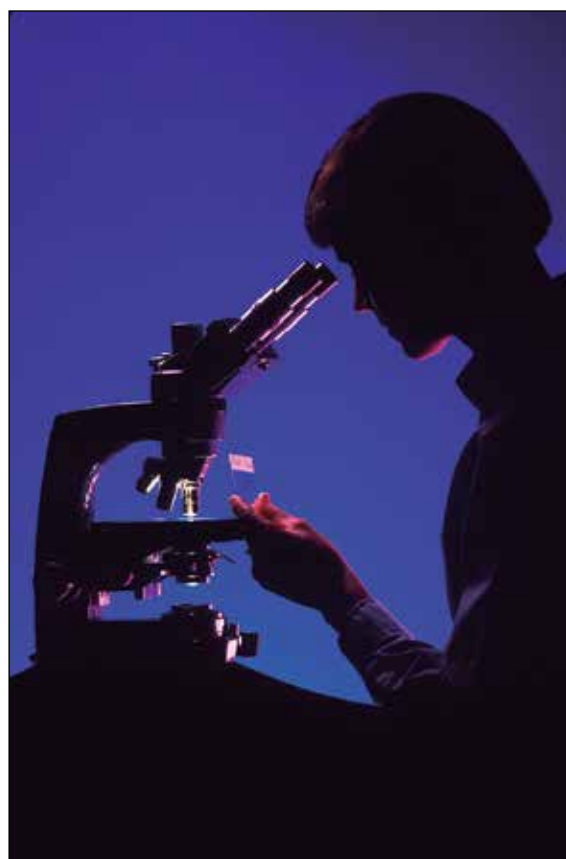


Foto: Bill Branson

y su entorno, se ponen en marcha diferentes mecanismos que detectan y destruyen células neoplásicas y que pueden desencadenar inflamación¹¹.

En el 2002 Schreiber y colaboradores proponen la teoría de la inmuoedición tumoral partiendo de la base del papel dual del SI en la carcinogénesis. Donde coexisten elementos de respuesta inmunitaria y de evasión del tumor¹².

En el año 2000 Hanahan y colaboradores proponen la primera versión de las características distintivas del cáncer (*hallmarks*), resumiendo las propiedades patogénicas de estas células. Propusieron 6 rasgos distintivos de las células malignas: potencial replicativo ilimitado, evasión de la apoptosis, insensibilidad a las señales de inhibición de crecimiento, autosuficiencia en señales de crecimiento, invasión-metástasis y angiogénesis sostenida. Con la colaboración de Mantovani, en el 2009 se le agrega un séptimo *hallmark*: la inflamación. En el año 2011 Hanahan actualiza los *hallmarks* agregando 2 nue-

vos: la disregulación energética celular y la evasión al SI. Plantean, además, 2 “capacidades habilitantes” que son procesos condicionantes y generadores de la aparición de los *hallmarks* descritos, los cuales son la inestabilidad genética y la inflamación¹³.

Desde que se describe el proceso de evasión de los tumores al SI y se aplican los conceptos de la teoría inmunológica de la Tolerancia Dominante al microambiente tumoral, las células Treg han emergido como un mecanismo de escape utilizado por las células tumorales o como resultado de un fallo de la homeostasis que debe ejercer el SI en el organismo. Una de las localizaciones donde se inició la descripción del rol de las Treg en el cáncer fue en el tumor de ovario¹⁴.

ORIGEN Y DIVERSIDAD DE LAS TREG

Las Treg son un grupo de células que representan alrededor del 10% de los linfocitos T. Con base en el sitio de inducción, los linfocitos Treg CD4⁺ se dividen en 2 grandes grupos: las Treg naturales (nTreg) o “naturalmente inducidas” porque desde su origen poseen la función reguladora, y las adaptativas (aTreg) o inducibles, que no se originan con función reguladora pero adquieren dicha función por inducción, dependiendo del microambiente en donde se encuentren. Ambos grupos ontogenéticamente se originan del progenitor linfoide común en la médula ósea y maduran en el timo, donde sufren, como todos los linfocitos T, la selección de un repertorio útil y alcanzan su competencia funcional. Estas características compartidas no son las que deciden su división taxonómica, pues como el criterio antes descrito plantea, es el sitio donde se diferencian hacia Treg quien decide su fenotipo. La función también contribuye a su clasificación, las nTreg se encargan fundamentalmente de contribuir a la autotolerancia, mientras que las aTreg, del control de las respuestas inmunitarias^{5,8,15,16}.

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES

El descubrimiento y caracterización de estas células contribuyó a las evidencias científicas de la teoría de la Tolerancia Dominante, ya que poseen como función principal contribuir a la tolerancia inmunoló-

gica, fundamentalmente a nivel periférico. También participan en la homeostasis del SI, específicamente en la regulación de la respuesta inmunitaria en su etapa de contracción, que se refiere al cese de la respuesta, así como en el control de la inflamación. Son capaces de prevenir la autoinmunidad. Participan en el control de la respuesta inmunitaria a patógenos en las mucosas, contribuyendo al establecimiento y mantenimiento de la Flora intestinal. Además, interfieren con la respuestas a antígenos foráneos, como por ejemplo alérgenos e incluso aloantígenos y frente a los tumores, ya que éstos últimos están compuestos por antígenos propios. Los trabajos de Shimon Sakaguchi son los que han permitido caracterizar mejor las células Treg; en la **tabla 1** se puede apreciar un resumen de esta caracterización a través de marcadores moleculares¹⁷⁻²⁰.

Los mecanismos por los cuales las Treg CD4⁺ ejercen sus funciones, se agrupan tomando en cuenta diferentes criterios. Según el tipo de molécula efectora se dividen en dependientes del contacto célula-célula o por mediadores solubles. En el primer caso la célula reguladora requiere entrar en contacto directo con la célula diana para ejercer su efecto, mientras que en el segundo caso mediante secreción de moléculas solubles puede ejercer su acción reguladora a distancia de forma paracrina sobre las células vecinas. También pudieran dividirse en directo e indirectos según la mediación de terceras células como las presentadoras de antígenos (CPA). En este caso las Treg actúan sobre células clave que regulan el SI, como las mencionadas CPA, programándolas en un sentido tolerante, dando como resultado una respuesta tolerogénica o la ausencia de respuesta. No obstante, se considera que resulta más adecuada la división taxonómica según el mecanismo efector involucrado y que se enuncia a continuación:

Supresión a través de la célula dendrítica (CD)

En este caso las Treg llevan a cabo su función reguladora interfiriendo con el proceso de maduración y función de la CD, que es una célula presentadora de antígenos especializada en coordinar las respuestas inmunitarias. Se ha observado en estudios inmunohistoquímicos de tejidos de algunos tumores

Tabla 1. Marcadores de las Treg CD4⁺

Función	Factor transcripcional	Activación y memoria	Origen y alojamiento	Función efectora	Apoptosis/supervivencia y otros
Marcadores	FoxP3	CD45RA	CD62L	CD62L	CD27
		CD45RO	CCR4	ICOS	OX40
		CD25	CCR6	CD39 CD73	CD95
		HLA-DR	CCR9	LAP	PD1
		Pérdida de CD127	CD103	Granzyme B	GITR
		CD69	CD304	Galectin 1	Galectin 3
		CD45RA	CD31	Galectin 10	GARP
		Pérdida de CD49d	Pérdida de CD49d	TRANCE	MS4A4B
				CD80/CD86	IL-1R
				IL-10	CD6
				IL-17	
				CD2	
				Pérdida de IL-2	

Tomados de sus siglas en inglés: CCR: CC-chemokine receptor; CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen 4; FoxP3: fork head box P3; GARP: glycoprotein A repetitions predominant; GITR: glucocorticoid-induced TNF-receptor-related protein; ICOS: inducible T cell co-stimulator; IL: interleukin; LAP: latency-associated peptide; MS4A4B: membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B; PD1: programmed cell death 1; R: receptor; TRANCE: TNF-related activation-induced cytokine; TReg: regulatory T. Tomado de: Shimon Sakaguchi y cols, Nature, 2010²¹.

maligros avanzados, una alta concentración de células dendríticas inmaduras junto con la presencia linfocitos Treg²¹⁻²⁵.

Supresión mediada por citocinas inhibitorias

Existen varias citocinas con actividad inhibitoria involucradas en las funciones de las Treg, las mejores caracterizadas han sido: factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), interleucina 10 (IL-10) y la interleucina 35 (IL-35). En el cáncer inducido por radiación UV se ha comprobado que la IL-10 proveniente de las Treg contribuye al bloqueo de la respuesta inmunitaria antitumoral, favoreciendo la progresión del tumor^{20,21,25,27,28}.

Supresión mediada por actividad citolítica

La citotoxicidad es una función común de las células asesinas naturales (NK, *natural killer*) y de los linfocitos CD8⁺; sin embargo, las Treg poseen esta actividad mediada por Granzima A, perforinas y facilitada por la adhesión a través de la molécula CD18. La galectina-1 expresada por las Treg es otra molécula que induce citotoxicidad tanto en ratones como en humanos^{18,20,21,25}.

Supresión mediada por alteración metabólica

Se han realizado numerosas investigaciones acerca de la interleucina 2 (IL-2) en el origen, diferenciación y función de las Treg, al ser uno de los primeros mecanismos que involucran la inducción de alteraciones metabólicas en los linfocitos T efectoras, encargados de eliminar las células cancerosas. El secuestro o captura de IL-2 del medio extracelular es una de las consecuencias distintivas de la expresión del FoxP3 en las Treg, coincidiendo con la inhabilidad de producir dicha IL-2. Junto con esto aumenta la expresión del CD25 (cadena α del receptor de alta afinidad para la IL-2). Al igual que sus pares efectoras, las Treg requieren de IL-2 para su función de supervivencia. Esta combinación de ausencia de producción autocrina de IL-2 y expresión de su receptor de alta afinidad conlleva al secuestro de la IL-2 del medio, privando a los linfocitos circundantes de esta citocina necesaria para la activación, proliferación y función. El resultado es el incremento de las Treg a expensas de las T efectoras útiles para destruir el tumor. Este conocimiento ha sido utilizado como fundamento de una de las primeras inmunoterapias contra el cáncer, como es

Desde que se describe el proceso de evasión de los tumores al SI y se aplican los conceptos de la teoría inmunológica de la Tolerancia Dominante al microambiente tumoral, las células Treg han emergido como un mecanismo de escape utilizado por las células tumorales o como resultado de un fallo de la homeostasis que debe ejercer el SI en el organismo.

el empleo de IL-2 en el cáncer de células claras del riñón, con resultados satisfactorios^{18,20,21,25}.

DINÁMICA DE LA PARTICIPACIÓN DE LAS TREG EN EL CÁNCER

En la actualidad, las teorías más aceptadas que interrelacionan al SI con la carcinogénesis son:

1. La inmuoedición de los tumores propuesta por Schreiber, que describe fundamentalmente mecanismos extrínsecos inmunosupresores y promotores del cáncer, toda vez que fallaron los mecanismos de protección intrínsecos de las células involucradas en la transformación maligna.
2. La inflamación propuesta por Mantovani y que Hanahan la incluye como una característica habilitante en el origen del cáncer.

Sin embargo, no todos los puntos son convergentes en estas teorías, debido al rol dual de varios componentes del SI. En este sentido, la mayoría de los estudios demuestran que la carcinogénesis ocurre en un microambiente inflamatorio específico que incluso puede ser subclínico. Las células del SI mayormente involucradas y clave es esta conexión son: macrófagos asociados a tumores (TAM), células derivadas mieloides supresoras (MDSC), linfocitos Th1, Th17 y las Treg^{10,13,29}.

La inflamación asociada al cáncer puede ser infecciosa o estéril, en el primer caso existen varios ejemplos como la infección por ciertos virus: hepatitis B y C, el papiloma o algunas bacterias dentro de las que están el *Helicobacter pylori* y los bacteroides.

Mientras que en el segundo caso está la inflamación autoinmunitaria, como en la enfermedad inflamatoria intestinal y los síndromes autoinflamatorios, descritos más recientemente. Respecto a la cinética cronológica entre la inflamación y el cáncer, hay consenso de que se requiere un inmunocontexto inflamatorio para que la carcinogénesis se desarrolle. En algunos casos la inflamación mediante estrés genotóxico puede inducir la aparición de células neoplásicas y, en otros, a través de diferentes mediadores contribuye al desarrollo tumoral. Consideramos que la inflamación siempre precede al inicio y promoción de los tumores puesto que en las etapas de eliminación y equilibrio de Schreiber existe una respuesta inmunitaria en un microambiente inflamatorio efector, es decir destructor del tumor, pero cuando llega a la etapa de escape el entorno ha cambiado a una inflamación supresora. La mayoría de los autores incluyen la función de las Treg en esta última etapa, sin embargo su participación se extiende a todo el proceso^{30,31}.

Cuando comienza un foco inflamatorio, al igual que en una respuesta inmunitaria adaptativa, junto con esa activación se programan los mecanismos de control, pero estos poseen una cinética distinta y retardada a la de los mecanismos de activación, creando una ventana de actuación que permite, en un tiempo relativamente corto, eliminar la noxa que desencadenó la respuesta. Muchos autores coinciden en que el SI está diseñado para actuar por periodos cortos, si por algún motivo su actividad se prolongara, ésta tendría siempre consecuencias negativas para el tejido involucrado. Como ejemplo de que activación y control se planifican simultáneamente, se pueden mencionar a las resolvinas, que son sustancias antiinflamatorias naturales y cuya síntesis se programa desde el inicio de la inflamación aguda, junto con las prostaglandinas y leucotrienos. No obstante, su función no se inicia hasta varios días después, siendo decisiva para una reparación tisular normal. Otro ejemplo que involucra a las Treg ha sido reportado en estudios de infección por *Leishmania*, donde la estimulación de receptores tipo Toll-2 (TRL-2), que son receptores no clonales, que suministran señales de peligro a las CD contribuyendo a su activación y función, provocan simultáneamente una prolifera-

ración de Treg sin activación, mientras dura la fase aguda de la infección, y estas células quedan latentes para ejercer su función reguladora en la fase de cronicidad de la infección. Cronológicamente cuando el elemento agresor no es neutralizado, en el tiempo determinado por la acción de la inmunidad innata, se activan los mecanismos de la inmunidad adaptativa, si ésta tampoco los neutraliza en su ventana de actuación, entonces los mecanismo de regulación y control se activan aún sin haber sido eliminada la noxa, pues ya estaban programados. El control de la respuesta no es totalmente dependiente de la eliminación del antígeno. Pero como el estímulo no cesa, se disparan señales que ponen en paralelo tanto mecanismos efectores como de control³²⁻³⁴.

Las Treg son decisivas en el control de las respuestas inmunitarias y el retorno a la normalidad del sistema, por lo que es frecuente verlas en los infiltrados inflamatorios agudos y en el caso de perpetuarse el foco de inflamación, como ocurre en las infecciones crónicas, su número tiende a incrementarse al igual que sus funciones, intentando controlar la inflamación y activación de linfocitos. Dicha etapa de contracción de la respuesta inmunitaria es importante para evitar el daño tisular excesivo, y garantizar la generación del repertorio de células de memoria que son el rasgo distintivo de la inmunidad³⁵.

El modelo de la inmuoedición propone 3 etapas: eliminación, equilibrio y evasión. En la primera (eliminación) pueden aparecer 3 resultados:

1. Destruir todas las células neoplásicas y retornar a la normalidad. En este caso funcionó la vigilancia inmunológica.
2. Eliminar las células malignas pero continuar las condiciones inflamatorias, porque el agente agresor (una infección, autoinflamación o autoinmunidad) persiste y como consecuencia pueden aparecer nuevas células transformadas con el tiempo, es decir otro clon.
3. Las células malignas pueden no ser eliminadas en su totalidad desde el inicio y continuar hacia la etapa siguiente.

Esto último se debe a que existe una inestabilidad genética en las células neoplásicas que permite

la aparición de variantes poco inmunogénicas que comienzan a mostrar ventaja frente a la acción del SI. Algunos autores plantean que el SI le aporta al cáncer una presión selectiva tipo darwiniana y, como resultado, el tumor crece “esculpido” por el SI, a expensas de variantes celulares más adaptadas a la agresión del SI. En todo caso para que progrese a la segunda etapa de equilibrio, tienen que aparecer células cancerosas resistentes al SI y que muestren latencia o que la tasa de destrucción y regeneración se igualen. El resultado es una latencia del crecimiento tumoral inmuoinducida, pudiendo pasar años en esta condición. En esta etapa el SI adaptativo es el protagonista^{12,29,36}.

Como se puede apreciar en este escenario, los antígenos que desencadenan la respuesta persisten. Al inicio pueden ser antígenos extraños provenientes de agentes biológicos y/o autoantígenos propios del tejido involucrado según el caso, y cuando ocurre la transformación maligna, pueden aparecer neoantígenos o sobreexpresarse otros normalmente expresados por el tejido involucrado. La consecuencia es una activación mantenida de los linfocitos efectores, llevándolos con frecuencia a un fenotipo “exhausto” los que no son efectivos en su función. Los mecanismos que generan este fenómeno son múltiples y se dividen en intrínsecos y extrínsecos. En este caso me referiré a los últimos: aumento de las señales de peligro, principalmente de daño y estrés celular, incremento de la densidad del antígeno, propagación del epítipo, presentación antigénica por células no profesionales, conversión de las células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales a tolerogénicas o disfuncionales, incremento de las células derivadas mieloides supresoras, incremento de citocinas tanto activadoras como supresoras y reclutamiento de Treg³⁷.

En la medida en que pasa el tiempo las células neoplásicas que van predominando en el tumor son las llamadas “variantes de escape”, que son poco inmunogénicas y poseen mecanismos de evasión al SI. Durante la fase de equilibrio coexisten células transformadas inmunogénicas, poco inmunogénicas y las variantes de escape. Este fenómeno pudiera ser el responsable del cambio de patrón inflamatorio, de una inflamación efectora hacia una inflamación

Estas células contribuyen a la tolerancia inmunológica, fundamentalmente a nivel periférico. También participan en la homeostasis del SI, así como en el control de la inflamación. Son capaces de prevenir la autoinmunidad, participan en el control de la respuesta inmunitaria a patógenos en las mucosas, interfieren con la respuestas a antígenos foráneos y frente a los tumores.

supresora, debido a que dichas células malignas resisten la presión del SI, debido a la propia acción de suprimirlo activamente. El estado de equilibrio puede revertirse a favor de la eliminación del tumor o progresar hacia el “escape”, dependiendo de factores que modifiquen la función inmune hacia potenciación o depresión respectivamente. Este balance es un área clave para su investigación y mejor comprensión, pues puede ser un blanco terapéutico atractivo en el manejo de la enfermedad en etapa subclínica²⁹.

MECANISMOS QUE INCREMENTAN LAS POBLACIONES DE TREG EN EL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO DEL TUMOR

Para abordar este tema se debe iniciar con la interrogante de “cómo se regulan las reguladoras”.

Existen 3 sistemas de señalización que dirigen la concentración y función de las Treg:

1. Señales de tráfico y alojamiento.
2. Señales de activación: 1.^a señal (a través del TCR), 2.^a señal (coestimulación) y 3.^a señal (mediada por citocinas).
3. Señales de peligro y daño celular (mediante receptores reconocedores de patrones asociados a patógenos y a daño celular).

En los sitios de inflamación los macrófagos liberan la quimiocina CCL22 reclutando nTreg por su receptor CCR4, provenientes de la circulación. También los linfocitos y células epiteliales liberan IL-16 que atraen a las nTreg CD4⁺, de esta forma co-

mienza a incrementarse esta población en el tejido. A medida que cambia la composición del infiltrado otras líneas celulares se incorporan al reclutamiento de Treg liberando diferentes quimiocinas, esto se explica más adelante. Por antígenos específicos en su mayoría autoantígenos se les proporciona la primera señal, permitiendo el inicio de la activación y proliferación. En unos casos antígeno dependiente, pues poseen TCR con mayor o menor diversidad, dependiendo del fenotipo, y en otros, el entorno de exceso de señales de peligro, citocinas activadoras y coestimulación, se produce una activación como “espectador inocente” (*bystander*) en ausencia de su antígeno cognado. Tanto macrófagos como CD participan en la activación por coestimulación y producción de la tercera señal que es mediada principalmente por TGF- β , IL-10 e IL-2³⁸.

Una mención especial requiere la señalización a través de receptores reconocedores de patrones (RRP). Las Treg son después de las CD las células que poseen mayor densidad y diversidad de RRP, coincidiendo con que son las 2 estirpes celulares con mayor capacidad reguladora del SI. Se ha observado que la estimulación de grupos específicos de receptores tipo Toll (TLR), condicionan el control de la actividad de las Treg, por un lado “inhibiendo la inhibición”, y por otro, favoreciendo las respuestas inhibitorias de estas células. Por ejemplo, la combinación TLR2 con TLR5 suprime las funciones reguladoras, mientras que la estimulación TLR4 y TLR5 induce supresión. Sin embargo, los hallazgos no son concluyentes y se requieren más investigaciones en este sentido. Como resultado de la combinación de ligandos de RRP que abundan en el medio, las Treg pueden: proliferar y ejecutar función supresora, proliferar sin ejecutar supresión o no incrementar su número y ejercer una potente acción supresora. Estas evidencias han venido a explicar, en parte, las contradicciones que se observan en los infiltrados de Treg en diferentes tipos de cáncer y su relación con su curso y pronóstico³⁴.

En el microambiente inflamatorio comienzan a incrementarse las citocinas provenientes de la nTreg, con lo que se generan las condiciones para que se induzcan las aTreg, que requieren citocinas como el TGF- β , IL-2, IL-10 e IL-35 para su conversión

y mantenimiento a partir de otros linfocitos cooperadores. Además, el epitelio y CD produce ácido retinoico, que también es necesario³⁸⁻⁴⁰.

De esta forma, cuando las células neoplásicas aparecen en ese contexto inflamatorio ya hay una representación de Treg heredada de la inflamación preexistente. Así se puede resumir que existen 3 vías de incremento de Treg en el tumor: por reclutamiento de la circulación (nTreg), por inducción *in situ* (aTreg) y por interconversión de patrones fruto de la plasticidad celular⁴⁰.

La presión selectiva que el SI ejerce sobre las recién transformadas células malignas dependerá en buena medida del control que ejerzan las Treg. Por consiguiente, la progresión o no del tumor, en lo que depende del rol de SI, estará condicionada parcialmente por el protagonismo funcional de las Treg infiltrantes del tejido^{39,40}.

LAS Treg DENTRO DE LA INMUNOEDICIÓN DE LOS TUMORES

En la etapa de “eliminación” de la inmunomodulación, las Treg podrían poseer un rol equivalente al que exhiben en la inflamación, pues su función es de control de la respuesta en términos de homeostasis del sistema, aún con los 2 posibles desenlaces: la eliminación total de las células neoplásicas o el paso a la etapa de equilibrio. Se ha comprobado la existencia de patrones Treg híbridos con los convencionales Th1, Th2 y Th17 por coexpresión de los controladores maestros propios de cada patrón T-bet, IRF-4 y ROR γ t respectivamente, que son funcionales y condicionan la migración de las Treg hacia los sitios de inflamación, por expresión de receptores de quimiocinas que responden a señales de alojamiento provenientes de los focos inflamatorios. Además, esta coexistencia de otros factores transcripcionales junto con el FoxP3, permite la actividad reguladora en dependencia del sitio y el factor desencadenante de la inflamación²³.

No obstante, en este aspecto también se requieren más estudios que documenten el rol de las Treg en esta etapa, debido que su expresión en el tejido inflamado es mayor que en los normales, pero como se sabe, según su fenotipo y entorno pueden tener doble papel en la eliminación del tumor, favore-

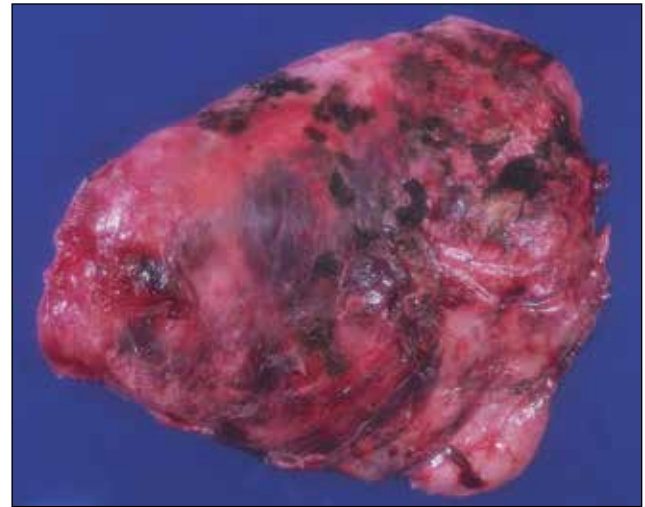


Foto: Yale Rosen

ciéndola o propiciando su progresión incluso de forma directa. Como ejemplo de este último caso, una de sus citocinas producida copiosamente, el TGF- β , favorece la angiogénesis y remodelación de los tejidos, por lo que podría favorecer la progresión.

En la etapa de “equilibrio”, donde las características principales son el balance dinámico ante la respuesta inmunitaria y la producción de células neoplásicas, así como la inducción de una latencia en dichas células. Existen evidencias científicas de que el responsable de este estado es el SI, ya que si en esta fase se induce inmunodepresión el cáncer aparece clínicamente. La inmunidad adaptativa a través de células CD4⁺ y CD8⁺ y citocinas como la IL-12 y el INF- γ garantizan el equilibrio a expensas fundamentalmente de la eliminación de células neoplásicas inmunogénicas produciendo la “presión selectiva” antes mencionada. En este caso, las Treg presentes en el tejido, pueden contribuir con sus funciones a la inducción de la latencia del tumor:

1. En este momento, proporcionalmente las Treg se colocan con una distribución más accesibles a las células tumorales, y algunos de sus mecanismos de acción pueden ayudar a detener el crecimiento del tumor, aunque las células neoplásicas no sean el blanco. Por ejemplo, la adenosina, el cAMP, las perforinas y granzimas, entre otras, pueden tener ese efecto. Esta accesibilidad se pierde con el crecimiento anárquico del tumor³⁸⁻⁴⁰.

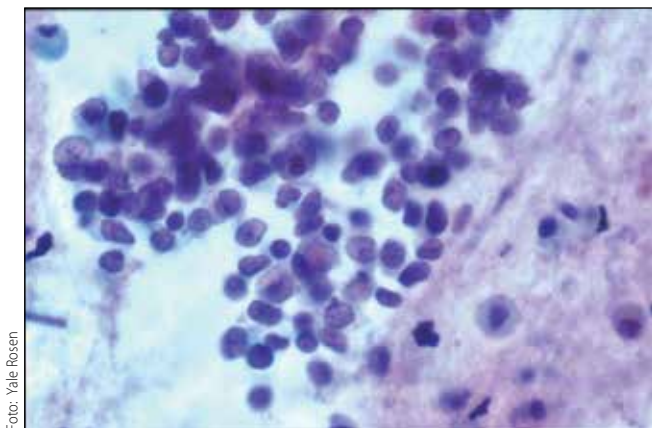


Foto: Yale Rosen

2. La existencia de patrones mixtos de Treg con T cooperadores de tipo efector que favorecen la respuesta desde el control²³.
3. TGF- β , que es pleiotrópico y posee varias isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), contribuye en algunos casos a la función de los linfocitos T citolíticos y al surgimiento de patrones Th1, por lo que es otro ejemplo de la complejidad del SI a través de roles duales²⁶.

La aparición de células tumorales pobremente inmonogénicas y con capacidad de supresión (variantes de escape) comienzan a modificar la relación entre SI y el cáncer en la etapa de equilibrio de Schrieber. No sólo son poco inmunogénicas sino que, además, son capaces de remodelar el medio inflamatorio. Por ejemplo, producen diferentes citocinas y quimiocinas que “manipulan” al SI. Como resultado, se incrementan los macrófagos asociados a tumores (TAM), CD inmaduras, linfocitos, MDSC y Treg. Como se menciona anteriormente, desde la inflamación preexistente ya en el tejido involucrado, hay Treg tanto naturales como inducidas y con fenotipos CD4⁺ y CD8⁺, con o sin expresión de FoxP3, la composición dependerá del tipo de tejido, etiología y tiempo de la inflamación. Por tal motivo, con la aparición de las células malignas que liberan quimiocinas reclutadoras de más Treg, su número se incrementará considerablemente. El tumor libera, entre otras, las quimiocinas CCL22, CCL17 que atraen Treg al tejido neoplásico, a través de receptores de tráfico CCR4 expresados en

las Treg. También produce IL-16, que mediante el receptor CD4 de las Treg las atrae a su entorno. De esta forma se incrementan inicialmente las nTreg en el microambiente del tumor.³⁸

La naturaleza del tejido tumoral, con o sin la existencia de agentes biológicos, es una fuente constante y creciente de señales de peligro al SI. Fundamentalmente se generan señales de daño y estrés celular, a la par que los detritus celulares provenientes de células neoplásicas que mueren por necrosis, exponen otros tipos de patrones de señales de peligro. Las células tumorales proliferan destruyendo la arquitectura y homeostasis del tejido que las alberga. Esto provoca una estimulación de un número mayor de estos receptores reconocedores de patrones (RRP). La combinación específica de estimulación de estos RRP, dirigen y condicionan el tipo de respuesta. La intensidad de las señales provocadas por las alarminas incrementa la llegada, activación y proliferación, *in situ*, de leucocitos y linfocitos. Pero el aporte de los mecanismos supresores de las variantes de escape son críticos para transformar la inflamación de efectora a supresora. Estas células transformadas producen directamente TGF- β e IL-10, que contribuyen a la inducción y activación de Treg tanto CD4⁺ como CD8⁺. En este sentido, contribuyen también el ácido retinoico que abunda en el medio proveniente de nTreg, CD inmaduras que no migran y aumentan en el medio. La IL-10 junto con el TGF- β promueve la aparición de Treg FoxP3⁺ (Tr1). En resumen, la persistencia y crecimiento del tumor, unido al esfuerzo del SI por eliminarlo, dispara paralelamente numerosos mecanismos de regulación y control que perjudican el éxito de nuestro sistema de defensa frente al cáncer. De esta forma lo que se observa es esa inflamación supresora^{8,38}.

Cuando las citocinas y mecanismos supresores de las Treg y de las propias células neoplásicas sobrepasan cierto umbral, comienzan a incrementarse otras poblaciones supresoras en el microambiente como MDSC, los TAM, células B reguladoras y linfocitos T con patrones mixtos (regulador/proinflamatorio) que conducen a la inflamación supresora. Se ha comprobado por diferentes estudios que ciertos tumores reclutan más Treg cuando aparecen otras células supresoras como las MDSC y los TAM,

por diversificación del fenotipo de receptor de quimiocina expresado en la Treg. Por ejemplo, en tumores de ovario se reclutan por el CXCR3, en colon y recto por CCR6 mediante la CCL20 proveniente de los TAM, en cáncer de piel por CCR5 mediante ligandos CCL3, CCL4 y CCL5 provenientes de las MDSC. A estos se le suman otros receptores con sus quimiocinas como el CXCR4 para CXCL12 y CCR10 para CCL28, creándose mecanismos redundantes de incorporación de nuevas Treg como linfocitos infiltrantes del tumor. Como se puede apreciar, 2 vías sinérgicas adicionales garantizan el incremento de las poblaciones de Treg dentro del tumor, por reclutamiento de la circulación y por inducción *de novo* dentro del tejido tumoral³⁸⁻⁴¹.

Los resultados de esta composición celular heterogénea que varía de un tumor a otro y dentro del mismo tumor son:

1. Destrucción de algunas variantes de células tumorales inmunogénicas que siguen apareciendo gracias a una pobre respuesta inmunitaria en un escenario de linfocitos “exhaustos” y con exceso de señales de control.
2. Remodelación tisular excesiva, atípica y con angiogénesis, debido al incremento de varios mediadores de regulación promotores de la reparación tisular como el TGF- β .
3. Robustez de los mecanismos reguladores/supresores, por redundancia y sinergismo de sus componentes celulares y moleculares.
4. Disregulación del SI por coexistencia en el tiempo de señales crecientes de alarma, de activación y control al mismo tiempo.

Siguiendo la dinámica de la respuesta contra el tumor, varias de la CD y las Treg llegan a los linfonodos regionales y orquestan una respuesta inmunitaria sistémica originando células Treg con fenotipos efectores y de memoria que recirculan y contribuyen a incrementar aún más su representación en el tumor y muchas veces a nivel periférico. Este incremento periférico de Treg está compuesto por células con TCR específicos para antígenos del microambiente tumoral, pero también contiene Treg no específicas para antígenos relacionados

Las Treg representan alrededor del 10% de los linfocitos T. Con base en el sitio de inducción, los linfocitos Treg CD4+ se dividen en 2 grupos: las Treg naturales (nTreg) o “naturalmente inducidas” porque desde su origen poseen la función reguladora, y las adaptativas (aTreg), que no se originan con función reguladora pero la adquieren por inducción, dependiendo del microambiente donde estén. Ambos grupos ontogenéticamente se originan del progenitor linfoide común en la médula ósea y maduran en el timo, donde sufren la selección de un repertorio útil y alcanzan su competencia funcional. Estas características no son las que deciden su división taxonómica, pues es el sitio donde se diferencian hacia Treg el que decide su fenotipo. Las nTreg contribuyen a la autotolerancia, y las aTreg, del control de las respuestas inmunitarias.

con el tumor, pero que se expanden por el influjo de citocinas imperante. Debido a estos es que se puede detectar un incremento de Treg en sangre en muchos de los pacientes con cáncer³⁹.

La etapa de escape exhibe un microambiente totalmente inflamatorio y paradójicamente supresor, con abundancia de Treg en la mayoría de los casos. El microambiente del tumor es el responsable de la expresión sistémica de las Treg, pues en esta fase casi siempre hay una concordancia entre la concentración de Treg en circulación con la infiltrante del tejido. Pudiera considerarse el tumor como un órgano linfoide terciario. El incremento del número de Treg en la mayoría de los cánceres ha sido motivo de controversias pues se ha encontrado que unos tumores poseen más infiltrado de estas células que otros. En unos caso el hecho de tener incremento de Treg es de mal pronóstico como en el cáncer de ovario, mama y melanomas, y en otros es de mejor pronóstico como en el de cabeza y cuello, así como

Cuando las citocinas y mecanismos supresores de las Treg y de las propias células neoplásicas sobrepasan cierto umbral, comienzan a incrementarse otras poblaciones supresoras en el microambiente como MDSC, los TAM, células B reguladoras y linfocitos T con patrones mixtos (regulador/proinflamatorio) que conducen a la inflamación supresora. Ciertos tumores reclutan más Treg cuando aparecen otras células supresoras como las MDSC y los TAM, por diversificación del fenotipo de receptor de quimiocina expresado en la Treg.

en el linfoma de Hodgkin. Recientemente Sakaguchi y cols. han planteado que esta inconsistencia puede deberse a que la composición fenotípica de Treg en el tumor es diferente; por ejemplo, en el melanoma las Treg que abundan son efectoras y las vírgenes en reposo aparecen en muy baja concentración así como otras células FoxP3⁺ no reguladoras. En cambio, en los cánceres de colon predominan las Treg efectoras FoxP3⁺ y otras células FoxP3⁺ no reguladoras, que liberan citocinas proinflamatorias que posibilitan una mejor respuesta y se asocian a un mejor pronóstico, aun cuando se encuentra un total de FoxP3⁺ alto. En este sentido, una explicación plausible es que en la mayoría de los estudios la fenotipificación de las Treg se hace por los marcadores CD4, CD25 y FoxP3 solamente. Por tal motivo la población así caracterizada no es homogénea ni posee las mismas funciones, por lo tanto los resultados son aparentemente contradictorios. Es necesario utilizar marcadores más específicos para las distintas Treg³⁸⁻⁴⁰.

CONSIDERACIONES FINALES

A la luz de los conocimientos actuales, continúa siendo necesario ahondar más en los estudios referidos a la Treg en el cáncer. Debido a la complejidad del SI todavía no es posible describir completamente los factores que delinean las funciones de estas células en la iniciación, promoción y progresión del

cáncer. Sin embargo, tampoco existen evidencias científicas que nieguen su participación y repercusión en el tejido inflamado antes de la transformación maligna.

La diversidad y plasticidad morfofuncional de las Treg han explicado, parcialmente, las discordancias halladas en torno a su contribución al desenlace anátomo-patológico y clínico de los tumores. Tampoco pueden existir dudas de su participación en estas enfermedades durante todo el proceso etio-patogénico, pues son células que regulan la función del único sistema homeostático del organismo que es capaz de controlar la arquitectura de los tejidos por eliminación física de sus componentes. La utilidad de estos conocimientos se basa en que si se esclarece mejor la dinámica de actuación de estas células se podrá utilizar como un marcador de utilidad diagnóstica, para estudiar o clasificar, pronosticar, así como continuar encontrando blancos terapéuticos atractivos y claves en la lucha contra una de las enfermedades más viejas de la historia de la humanidad. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siachoque H, Satisteban N, Iglesias Gamarra A. Linfocitos T reguladores: subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Rev Colomb Reumatol*. 2011;18(3):203-20.
2. Beltran Garate B. Rol de las células T reguladoras en cáncer. *Rev Fac med Hum*. 2008;8(1):58-60.
3. Gershon K, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970;18:723.
4. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155:1151-64.
5. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T Cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30:899-911.
6. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, et al. Human CD8⁺ CD25⁺ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4⁺ CD25⁺ regulatory thymocytes. *Blood*. 2003;102:4107-14.
7. Sharafieh R, Lemire Y, Powell S, et al. Immune amplification of murine CD8 suppressor T cells induced via an immune-privileged site: quantifying suppressor T cells functionally. *PLoS One*. 2011;6:e22496.

8. Liu L, Lan Q, Lu L, Chen M, Xia Z, Ma J, et al. Phenotypic and functional characteristic of a newly identified CD8⁺ Foxp3⁺ CD103⁺ regulatory T cells. *J Mol Cell Biol*. 2013;6:81-92.
9. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci*. 1898;105:487-511.
10. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010;140:883-899.
11. Smith MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immune surveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*. 2001;4:293-9.
12. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer. *Science*. 2011;331:1565-70.
13. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21:309-22.
14. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. 2004 [citado: 7 enero 2014]. Disponible en: <http://www.nature.com/naturemedicine/10.1038/nm1093>.
15. Wing K, Fehervari Z, Sakaguchi S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol*. 2006; 18(7):991-1000.
16. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and Adaptive Foxp3⁺ Regulatory T
17. Cells: More of the Same or a Division of Labor? *Immunity*. 2009;30:626-35.
18. Horwitz, D.A., Zheng, S.G., and Gray, J.D. Natural and TGF-beta-induced Foxp3⁺ CD4⁺ CD 25⁺ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol*. 2008;29:429-35.
19. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531-64.
20. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4⁺ Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:733-58.
21. Miyara M, Sakaguchi S. Human FoxP3⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their knowns and unknowns. *Immunol Cell Biol*. 2011;89:346-51.
22. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Rev Immunol*. 2010;10:490-500.
23. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 Control over Foxp3⁺ Regulatory T Cell Function. *Science*. 2008;322:271-5.
24. Wing JB, Sakaguchi S. Multiple Treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol*. 2012;3:1-6.
25. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*. 2009;21(10):1105-11.
26. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature Rev Immunol*. 2008;8:523-32.
27. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T Cell-Produced Transforming Growth Factor- β controls T Cell tolerance and regulates Th1- and Th17- Cell differentiation. *Immunity*. 2007;26:579-91.
28. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*. 2007;8(9):931-41.
29. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity*. 2008;28:546-58.
30. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.
31. Portaa C, Larghib P, Rimoldic M, Totarob MG, Allavenac P, Mantovanic A, et al. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*. 2009; 214:761-77.
32. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovanic A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009; 30(7):1073-81.
33. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8⁺ T cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:107-19.
34. Suffia JJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Bekkaid Y. Infected site restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med*. 2006;203:777-88.
35. Suttmuller R, Garritsen A, Adema GJ. Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(Suppl):91-5.
36. Ahlers JD, Belyakov IM. Memories that last forever: strategies for optimizing vaccine T cell memory. *Blood*. 2010; 115(9):1678-89.
37. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumors: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:298-306.
38. Hyun-Tak J, Yun Hee J, Hyo Jin P, Sang-Jun H. Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB Reports*. 2011;44:217-31.
39. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol*. 2013;4:1-14.
40. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:1-7.
41. Oleinika K, Nibbs RJ, Graham GJ, Fraser AR. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clin Exp Immunol*. 2012;171:36-45.
42. Klinker MW, Lundy SK. Multiple Mechanisms of Immune Suppression by B Lymphocytes. *Mol Med*. 2012;18: 123-137.