

INTEGRANDO EL UNIVERSO DE CELULAS REGULATORIAS EN EL CANCER UN OBSTACULO CRITICO PARA EL EXITO DE ESTRATEGIAS DE INMUNOTERAPIA

**JUAN M. ILARREGUI, DIEGO O. CROCI, MARTA A. TOSCANO, GERMAN A. BIANCO,
 MARIANA SALATINO, GABRIEL A. RABINOVICH**

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET); Departamento de Química Biológica,
 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires*

Resumen La mayoría de las estrategias de inmunoterapia en cáncer focalizan su atención en la estimulación del sistema inmune. Sin embargo, recientes evidencias indican que la mayoría de dichas terapias se hallan amenazadas por una compleja red de mecanismos inmunosupresores que dominan el microambiente tumoral. Estas estrategias de inmunosupresión incluyen la expansión selectiva y el reclutamiento de una amplia diversidad de células regulatorias entre las cuales se destacan las células dendríticas tolerogénicas maduras e inmaduras, las células dendríticas plasmacitoides, las células T regulatorias naturales e inducibles, las células supresoras de origen mieloide, los macrófagos asociados a tumores y las células asesinas naturales-T (NKT). Estudios recientes utilizando modelos animales han demostrado que las células regulatorias inhiben en forma específica a las células T efectoras a través de mecanismos diversos y que la remoción de dichas células o su inactivación funcional resulta en un incremento del rechazo tumoral. Paralelamente, un número importante de estudios indica la acumulación de dichas células en pacientes con diversos tipos de tumores. En este artículo definiremos brevemente las características funcionales de esta red intrincada de células regulatorias destacando su papel en el escape tumoral y las posibles estrategias de inmunointervención basadas en la eliminación o inactivación funcional de dichos tipos celulares.

Palabras claves: células T regulatorias, células NK-T, células dendríticas tolerogénicas, células supresoras de origen mieloide, cáncer, escape tumoral, inmunosupresión

Abstract *Integrating the universe of regulatory cells in cancer. A major hurdle for successful immunotherapy.* While most cancer immunotherapy strategies have focused on activating the immune system, growing evidence suggests that these therapies are thwarted by a complex immunosuppressive network at the tumor microenvironment. These immunosuppressive strategies include the selective expansion and recruitment of a diversity of regulatory immune cells, including tolerogenic immature and mature dendritic cells (DCs), plasmacytoid dendritic cells (pDCs), naturally-occurring and inducible regulatory T cells (Tregs and Tr1), myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), tumor-associated macrophages (TAMs) and natural killer T (NKT) cells. Several studies using rodent models indicate that these regulatory cells may suppress tumor antigen-specific effector T cell responses through different, but partially overlapping mechanisms, and that their removal or functional inactivation promotes tumour rejection. In addition, the increasing number of studies of regulatory cells in patients with cancer also points to a role for these cells in disease progression. In this article we will briefly define the distinct role of different regulatory cell populations in tumor cell evasion of immune responses and will highlight potential avenues for immune intervention based on the removal and/or functional inactivation of these regulatory cell types.

Key words: regulatory T cells, NKT cells, tolerogenic dendritic cells, myeloid-derived suppressor cells, cancer, tumor-immune escape, immunosuppression

Los tumores han desarrollado durante su generación múltiples mecanismos inmunosupresores con el propósito de evadir el reconocimiento inmune o desactivar los mecanismos efectoras de células T anti-tumorales. Dichos mecanismos incluyen alteraciones en la presentación antigénica, defectos en señales intracelulares de células T, incremento de la secreción de factores inmuno-

supresores y/o pro-apoptóticos, activación de vías de señalización inhibitorias en células del sistema inmune y reclutamiento selectivo de poblaciones regulatorias¹. En conjunto, estos mecanismos conspiran en estados avanzados del cáncer a los fines de limitar la capacidad del sistema inmune de contener al tumor e inhibir estrategias de inmunoterapia¹. En esta revisión, nos concentraremos en la funcionalidad y papel que cumplen diversos tipos de células regulatorias en el desarrollo y progresión de tumores.

1. Células dendríticas (DCs)

1.1. Presencia disminuida de DCs funcionalmente competentes en el microambiente tumoral

Las DCs pueden pertenecer al linaje mielóide (la gran mayoría), o al linaje linfóide, estas últimas conocidas como DCs plasmocitoides (pDCs). Las DCs que abandonan la médula ósea se definen como DCs inmaduras. Estas células no expresan tenores significativos de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 o CD40 en su superficie y producen cantidades muy reducidas de IL-12, citoquina imprescindible para montar una respuesta mediada por células Th1 y crítica en la inmunidad anti-tumoral². Distintos productos virales y microbianos o células necróticas inducen la maduración de las DCs. Las DCs maduras exhiben mayores tenores de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo-II y de moléculas co-estimuladoras, así como una mayor producción de IL-12 y capacidad incrementada de montar una respuesta antígeno-específica de linfocitos T².

Si bien se ha descrito que células tumorales pueden inducir la maduración de DCs inmaduras, datos obtenidos en los últimos años indican que defectos en el sistema de DCs se encuentran entre los principales factores responsables del escape tumoral, afectando fundamentalmente a la respuesta de células CD4⁺ Th1 y CD8⁺ T citotóxicas. En este sentido, se comprobó que ratones inoculados con diferentes tipos de tumores presentan una reducción marcada en el número y funcionalidad de DCs³.

Paralelamente, en un amplio número de pacientes con cáncer se han observado efectos similares. En este sentido, en un estudio realizado en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (HNSCC) se demostró que estos pacientes presentaban una reducción significativa sólo en la población de DCs mieloides, mientras que las pDCs no se encontraban afectadas⁴. Recientemente, la evaluación de DCs circulantes en una población de 136 pacientes con cáncer de mama, próstata y glioma maligno reveló que tanto las DCs mieloides como las pDCs se encuentran disminuidas⁵. La presencia de un número menor de DCs y su funcionalidad deteriorada en el microambiente tumoral trae como consecuencia una estimulación de la respuesta inmune menos efectiva.

1.2 Acumulación de DCs inmaduras en cáncer

Se ha demostrado claramente en pacientes que los tumores infiltrados por DCs con fenotipo inmaduro poseen un fenotipo más agresivo. Por ejemplo, Troy y colaboradores demostraron que las DCs son reclutadas en forma reducida en el microambiente de carcinomas renales, y que estas células exhiben un grado menor de activación y presentan una capacidad alo-estimuladora insuficiente⁶. Hallazgos similares se observaron en DCs aisladas

de metástasis de melanomas y carcinomas basocelulares⁷⁻⁹. Notablemente, la incorporación del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o de CD40 ligando (CD40L) a cultivos *in vitro* no promueve un incremento en la expresión de la molécula co-estimuladora CD80 en DCs infiltrantes de tumores⁷. Este fenómeno indica que la ausencia de expresión de CD80 y CD86 no es simplemente el resultado de una falta de activación de DCs en el microambiente tumoral, sino que podría constituir un defecto intrínseco en la diferenciación de las DCs. Las DCs inmaduras son incapaces de inducir una respuesta anti-tumoral efectora completa y, en cambio, pueden promover la tolerancia de linfocitos T. Se ha demostrado que si las células presentadoras de antígeno (APCs) fallan en proveer una apropiada señal co-estimuladora a los linfocitos T, éstos se volverán tolerantes o anérgicos². En este contexto, DCs provenientes de tejidos tumorales (ej.: cáncer de colon o melanoma) no sólo fueron incapaces de inducir proliferación de linfocitos T, sino que además indujeron anergia y un estadio de tolerancia en estos linfocitos⁷⁻⁹. Considerando que DCs no activadas se asemejan a las DCs inmaduras, es posible que mecanismos similares puedan operar en diversos estadios del crecimiento tumoral.

1.3 Acumulación de DCs tolerogénicas y regulatorias en cáncer

Al mismo tiempo que se informaba acerca de la acumulación de DCs inmaduras en cáncer, se reportaban casos de subtipos de DCs con fenotipo maduro y con potencial inmunosupresor sobre linfocitos T. Las más prominentes fueron las DCs plasmocitoides (pDC)¹⁰. Como se describió previamente, en contraste con las DCs mieloides, se ha observado que en pacientes con tumores de distintos orígenes, el número de pDCs circulantes no cambia. Sin embargo, en pacientes con carcinoma de ovario se observó una acumulación de pDCs en el tejido tumoral. Esta acumulación se atribuyó a la producción incrementada de la quimioquina CXCL12, también llamada factor derivado de estroma tipo-1 (SDF-1) la cual es secretada por ciertos tipos de células malignas¹¹. Las pDCs también se observaron incrementadas en el infiltrado del tejido tumoral en pacientes con HNSCC; sin embargo, su capacidad de producir IFN- α se hallaba significativamente disminuida. La regulación negativa del receptor *Toll-like-9* (TLR)-9 inducida por el tumor podría ser el mecanismo responsable de inhibir las funciones de las pDCs dentro del microambiente tumoral¹². Además, se encontró acumulación de pDCs en el área peritumoral de melanomas primarios¹³. Se demostró que los ganglios linfáticos drenantes de tumores de ratón, contienen una subclase de pDCs que expresan constitutivamente la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO),

enzima que metaboliza el aminoácido esencial triptofano, inhibiendo la expansión clonal de linfocitos T y promoviendo su apoptosis¹⁴. Aunque sólo comprenden el 0.5% de las células de ganglios linfáticos, las pDCs suprimen en forma sustancial la respuesta efectora antígeno-específica mediada por células T. En este sentido, la transferencia adoptiva de pDCs en receptores vírgenes logró promover una profunda anergia de linfocitos T locales¹⁴. Por lo tanto, DCs de origen mielóide y/o linfóide pueden contribuir a crear o potenciar los mecanismos inmunosupresores imperantes en el microambiente tumoral.

2. Células supresoras de origen mielóide en cáncer

Las células supresoras de origen mielóide (MDSC) constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras compuesta por macrófagos, granulocitos, DCs y otras poblaciones de origen mielóide en estadios tempranos de diferenciación que ejercen una actividad inmunosupresora en el microambiente tumoral. En ratones, las MDSC se definen como células con un fenotipo Gr-1⁺CD11b⁺ (Ref 15) que se acumulan en el bazo, y en algunos casos en ganglios linfáticos de animales portadores de tumor¹⁶⁻¹⁹. Las MDSC expresan tenores normales de CMH-I, pero niveles significativamente reducidos de CMH-II y de moléculas co-estimuladoras. La actividad funcional de las MDSC se manifiesta a través de su capacidad de inhibir la producción de IFN- γ producida por linfocitos T CD8⁺ en respuesta a péptidos provenientes de antígenos tumorales presentados en la superficie de las MDSC¹⁷. Este efecto depende de la expresión de CMH-I por las MDSC y no es mediado por factores solubles sino que requiere del contacto célula-célula. Además se ha observado que la actividad de MDSC es dependiente de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂)²⁰. Estudios recientes *in vivo* demostraron que las MDSC también pueden ser responsables de inducir tolerancia antígeno-específica de linfocitos T²¹. Las MDSC son capaces de endocitar proteínas solubles *in vivo*, procesarlas y luego presentar los epitopes antigénicos e inducir anergia en los linfocitos T que reconocieron al antígeno²¹. La subpoblación de células MDSC Gr-1⁺CD115⁺, además de ser capaces de inhibir *in vitro* la proliferación de linfocitos T, promueven la expansión de células T regulatorias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tregs) *in vivo*²². Se ha reportado que el incremento de Tregs inducido por MDSC es dependiente de la presencia de IFN- α e IL-10²². Llamativamente, mientras que las MDSC suprimen la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos a través de una vía dependiente de óxido nítrico (NO), la inhibición de la respuesta alógena inducida por estas células es mediada por la enzima arginasa-1²³. Se ob-

servó además que las células MDSC Gr-1⁺ se diferencian *in vitro* e *in vivo* a macrófagos F4/80⁺, que en el interior del microambiente tumoral producen niveles sustanciales de NO, pudiendo inducir en forma directa la apoptosis de linfocitos T. Se ha demostrado que el factor de transcripción responsable de este efecto es el factor transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)-1²⁴.

En humanos, las MDSC expresan el marcador común mielóide CD33 pero no poseen otros marcadores de células mieloides o linfoides, ni HLA-DR²⁵. En estadios avanzados de cáncer se observó la acumulación de estas células en sangre periférica, mientras que la remoción quirúrgica del tumor reduce marcadamente el número de estas células inmaduras²⁶. En concordancia con los datos obtenidos en modelos tumorales en ratón, las MDSC de pacientes lograron inhibir la producción de IFN- γ por linfocitos T CD8⁺ autólogos estimulados con DCs pulsadas con péptidos específicos²⁵. En pacientes con distintos tipos de cáncer, se observó un número inusualmente alto de células mieloides de fenotipo granulocítico en circulación. Estas células activadas fueron capaces de inhibir la producción de citoquinas por parte de linfocitos T²⁷. Esta acción fue inhibida por la adición de la catalasa, enzima responsable de degradar el H₂O₂, implicando a este agente como potencial molécula efectora de la actividad inmunosupresora de MDSC humanas. Estos resultados son consistentes con los hallazgos de Kuznetsov y colaboradores, en los cuales el H₂O₂ producido por las MDSC es el responsable central de la actividad inmunosupresora de estas células²⁰.

3. Macrófagos asociados a tumores

La exposición de macrófagos a productos microbianos o IFN- γ conduce a su activación clásica (macrófagos clásicos o M1). Estos macrófagos se caracterizan por una producción incrementada de NO y ROS, una capacidad potenciada de presentar antígenos y producción sostenida de IL-12 e IL-23, lo cual conduce a la activación de respuestas de tipo Th1 o Th17. Por lo tanto, los macrófagos M1 se consideran generalmente como potentes células efectoras que eliminan microorganismos y células tumorales a la vez que producen tenores importantes de citoquinas pro-inflamatorias²⁸. Opuestamente, los macrófagos M2 (activados en forma alternativa) producen tenores menores de IL-12 y cantidades sustanciales de IL-10, lo cual se traduce en una polarización de la respuesta inmune adaptativa hacia un fenotipo dominante del tipo Th2. Los macrófagos M2 también tienen la capacidad de eliminar desechos celulares, promover la angiogénesis y reparar y remodelar los tejidos²⁸.

A fines de la década de 1970, se observó un incremento en la frecuencia de un cierto tipo de leucocitos

asociados a diversos tumores, a los cuales se los denominó macrófagos asociados a tumores (TAM). Estas células se encuentran en un gran porcentaje de tumores humanos, y un incremento en la acumulación de este tipo de macrófagos se halla asociado a un pronóstico negativo para el paciente²⁸. Los TAM realizan varias funciones pro-tumorales asociadas a M2 incluyendo promoción de la angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular y supresión de la respuesta inmune anti-tumoral efectora.

Los TAM se acumulan preferentemente en regiones pobremente vascularizadas de tumores, y por lo tanto, con baja tensión de oxígeno. Estas células se adaptan a este ambiente mediante el incremento en la expresión de genes inducibles por hipoxia y afectan la proliferación de células tumorales y la angiogénesis. Dichos genes inducibles incluyen el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) e IL-8 (CXCL8). La falta de oxígeno o hipoxia lleva también a los TAM a aumentar la expresión de enzimas glicolíticas, cuya transcripción es regulada por los factores de transcripción HIF-1 y HIF-2²⁹. Los TAM expresan además metaloproteasas de la matriz (MMP), como MMP-2 y MMP-9, favoreciendo la degradación del tejido conectivo y de esta forma facilitando la invasión y migración de células tumorales³⁰. En tumores ya establecidos, los trabajos publicados demuestran que los TAM poseen un fenotipo M2 caracterizado por baja producción de IL-12 y niveles incrementados de IL-10 y TGF- β , favoreciendo el escape tumoral mediante la supresión de la respuesta inmune específica²⁸.

La importancia de los TAM en la progresión tumoral se halla demostrada por un trabajo reciente de Luo y colaboradores en el cual usaron una vacuna a DNA a los fines de gatillar una respuesta contra la legumina, una endopeptidasa de asparagina que se expresa en forma incrementada en los TAM. Los autores lograron disminuir la densidad de los TAM en el tejido tumoral mediante una respuesta T CD8⁺ específica, la cual fue acompañada por una marcada reducción de la angiogénesis, disminución del volumen del tumor y supresión de la metástasis en modelos de carcinoma mamario, carcinoma de colon y de pulmón³¹.

Un reciente trabajo de nuestro laboratorio demostró que galectina-1 (Gal-1), una lectina endógena implicada en la homeostasis del sistema inmune y el escape tumoral³², regula la fisiología de monocitos humanos y macrófagos de ratones promoviendo un fenotipo M2 supresor³³. Queda por esclarecer si galectina-1 podría ser un nuevo factor que utilizarían los tumores a los fines de eludir las funciones anti-tumorales de macrófagos.

Como hemos mencionado ya en los párrafos anteriores, los tumores emplean un abanico de estrategias para

alterar las funciones de las células presentadoras de antígeno. Una gran variedad de factores derivados de tumores afectan los procesos normales de diferenciación y maduración de células mieloides, resultando en el bloqueo de la diferenciación de DCs maduras y la consecuente acumulación de DCs inmaduras y pDCs. El microambiente tumoral puede también afectar las DCs inmaduras convirtiéndolas en células regulatorias con potencial inmunosupresor y tolerogénico. Estas células pueden inducir defectos en los linfocitos T mediante diferentes mecanismos que incluyen la degradación de triptofano mediante la enzima IDO y la producción de IL-10. Además, diversos factores tumorales estimulan la generación, expansión y reclutamiento de MDSC que probablemente, mediante la producción incrementada de ROS y el contacto célula-célula, inducen tolerancia de linfocitos T efectores. Es importante destacar que la mayoría de los datos disponibles fueron obtenidos en sistemas *in vitro*, y por lo tanto, el papel biológico de estas células regulatorias *in vivo* queda aún por ser dilucidado.

4. Linfocitos T regulatorios en el establecimiento del privilegio inmune

Durante la última década, se ha confirmado la hipótesis de que los tumores pueden alterar la inmunidad anti-tumoral promoviendo la expansión, reclutamiento y activación de distintas poblaciones de linfocitos T regulatorios^{34,35}. Los linfocitos T regulatorios CD4⁺CD25⁺ (Tregs) fueron identificados por Sakaguchi y colaboradores como un subtipo natural de linfocitos T CD4⁺ (aproximadamente 5-10% de los linfocitos T presentes en sangre periférica) que constitutivamente expresan la molécula CD25 y que suprimen respuestas de linfocitos T efectores (CD4⁺ y CD8⁺) *in vivo*³⁶. Se ha sugerido que el factor de transcripción *forkhead box P3* (Foxp3) representa un marcador intracelular confiable de estas células en combinación con otros marcadores como el CTLA-4 (CD152), el receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR), el gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3) y la neuropilina³⁴. Recientes estudios utilizando microarreglos de genes identificaron la expresión incrementada de transcritos para galectina-1 y galectina-10 en la superficie de células T regulatorias^{37,38}. El estudio de la funcionalidad de galectinas-1 y -10 en estas células reveló la capacidad de estas lectinas de mediar la actividad inmunosupresora de células T regulatorias. Estos nuevos hallazgos confirman nuestros resultados previos acerca de la capacidad inmunosupresora de galectina-1 en diversos modelos experimentales de autoinmunidad y cáncer³⁹⁻⁴².

Un número incrementado de células CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ se encontró en pacientes con tumores de pulmón, páncreas, mama, ovario y piel, tanto en circulación como en infiltrados peri- e intra-tumorales³⁶. Reciente-

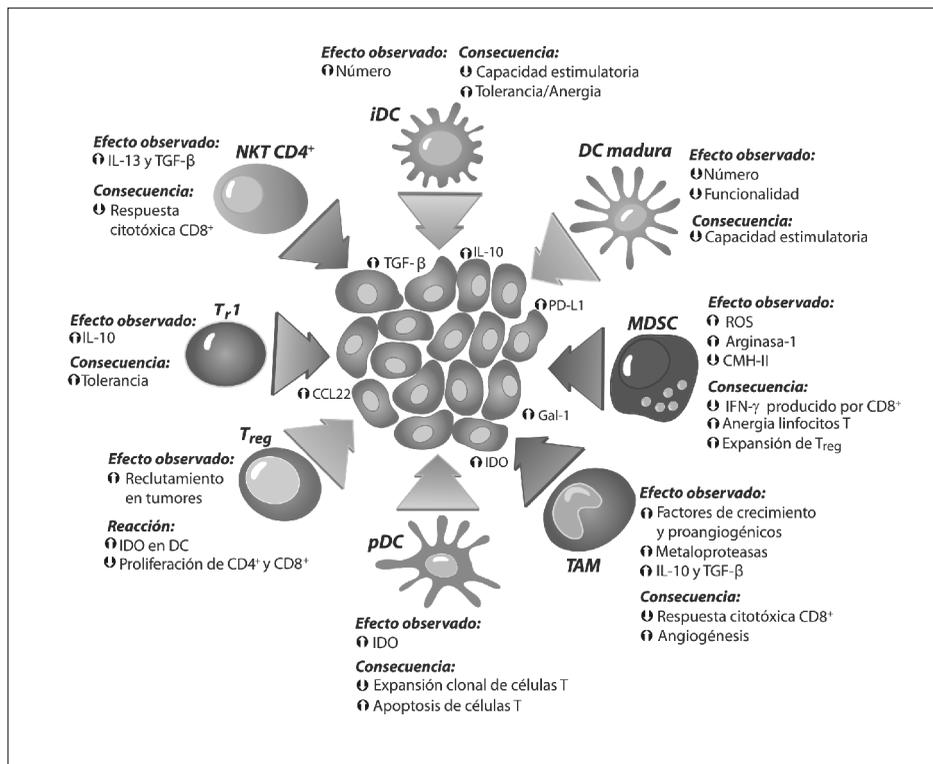


Fig. 1.– **Universo de células reguladoras involucradas en el escape tumoral.** Diferentes tipos de células reguladoras contribuyen al escape y progresión tumoral a través de diferentes mecanismos inmunosupresores. Este amplio abanico incluye células dendríticas (DCs) inmaduras (iDCs), DCs maduras tolerogénicas, células supresoras de origen mielóide (MDSC), células dendríticas plasmocitoides (pDCs), macrófagos asociados a tumores con un fenotipo M2 (TAM), células T regulatorias naturales CD4+CD25+ FoxP3+ (Tregs), células reguladoras inducibles productoras de IL-10 (Tr1) y células CD4+ NKT productoras de IL-13 y TGF-β. La comprensión de los mecanismos a través de los cuales actúan estas células provocando inmunosupresión es crítica para el diseño de nuevas estrategias de inmunoterapia. *Abreviaturas:* ROS: especies reactivas del oxígeno;IDO: enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa.

mente, Curiel y colaboradores suministraron información acerca del mecanismo a través del cual las células Tregs confieren *status* de privilegio inmunológico a tumores³⁶. Los autores observaron que el número de Tregs en tumores malignos y sus ascitis se correlaciona en forma inversa con la malignidad de dichos tumores. Además, se observó que las células Tregs son reclutadas al sitio del tumor por la influencia de la quimioquina CCL22³⁶.

Estudios pioneros en el campo, revelaron que la eliminación de las células Tregs usando anticuerpos monoclonales contra CD25, es capaz de promover el rechazo tumoral mediado por linfocitos T citotóxicos^{43, 44}. Además, el tratamiento con anticuerpos agonistas anti-GITR puede revertir la tolerancia hacia antígenos tumorales, ya sea por atenuación de la actividad inmunosupresora de las células Tregs o por co-estimulación de las funciones efectoras de los linfocitos T⁴⁵. Una alternativa terapéutica al uso de anticuerpos monoclonales consiste en la utilización de una inmunotoxina compuesta

por una molécula de IL-2 fusionada a la toxina diftérica activa (Ontak). Este complejo es internalizado por células CD25+, en las cuales esta molécula quimérica logra inhibir la síntesis de proteínas y provocar la apoptosis de células Treg³⁵. Investigaciones recientes describieron un nuevo mecanismo por el cual la activación de distintos TLRs, especialmente TLR-8, puede revertir las funciones de células Tregs^{46, 47}. Estas investigaciones sugieren que los ligandos de TLR podrían actuar como potenciales drogas con el fin de anular las funciones de las células Tregs. Al mismo tiempo, se ha demostrado que el tratamiento con dosis bajas de ciclofosfamida, una droga alquilante, inhibe a las células Tregs mediante la eliminación selectiva de células CD4+CD25+ en división⁴⁸. En este contexto, recientemente demostramos que la administración de ciclofosfamida en un modelo de linfoma es capaz de regular la expresión y funcionalidad de galectina-1 con implicancias sobre su actividad inmunosupresora en células Tregs⁴⁹.

Conjuntamente a las células Tregs convencionales, existen otras poblaciones regulatorias que podrían contribuir a mecanismos de escape tumoral. En este sentido, se ha observado la participación de linfocitos T regulatorios productores de IL-10 (Tr1) en este fenómeno^{50,51}. Artículos recientes proponen que, la exposición de DCs a lisados de células de mieloma resulta en un incremento en la producción de IL-10, lo cual favorece la expansión de linfocitos Tr1⁵². Además, se ha observado que células NKT CD4⁺ (linfocitos que co-expresan el TCR junto con marcadores de células *natural killer*), son capaces de suprimir las funciones citotóxicas de los linfocitos T CD8⁺ mediante la secreción de IL-13 y TGF- β ⁵³. De este modo, diferentes poblaciones celulares regulatorias, podrían ser reclutadas y activadas en el microambiente tumoral a los fines de dismantelar los mecanismos efectores de la respuesta inmune efectora.

Conclusiones generales

La identificación del amplio universo de células regulatorias es crucial para lograr comprender los mecanismos de inmunosupresión que impiden el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral y obstaculizan el éxito de estrategias de inmunoterapia. Diferentes tipos celulares son capaces de promover un estado de inmunosupresión local incluidas CDs inmaduras, CDs maduras tolerogénicas, células supresoras de origen mieloide (MDSC), macrófagos TAM, células T regulatorias (Tregs o Tr1) y células NKT. Aún quedan por resolverse ciertos interrogantes: ¿Cómo se reclutan en forma diferencial dichas células al sitio tumoral? ¿Existe interacción o sinergismo entre diferentes tipos de células regulatorias? ¿Qué tipos de terapias logran eliminar o inactivar funcionalmente diferentes poblaciones regulatorias? Sin duda, un apasionante campo para la investigación científica con claras implicancias en el éxito de protocolos clínicos de inmunoterapia.

Agradecimientos: El trabajo en nuestro laboratorio es financiado actualmente por un programa de la Fundación Salles/CONICET y por subsidios del Cancer Research Institute (Elaine R. Shepard Investigador Award), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2003-05-13787), Universidad de Buenos Aires (M091) y Fundación Fiorini. G.A.R. es actualmente becario de "John Simon Guggenheim Memorial Foundation".

Bibliografía

- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267-96.
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 621-67.
- Ishida T, Oyama T, Carbone D, Gabrilovich DI. Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hematopoietic progenitors. *J Immunol* 1998; 161: 4842-51.
- Hoffmann TK, Muller-Berghaus J, Ferris RL, Johnson JT, Storkus WJ, Whiteside TL. Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1787-93.
- Pinzon-Charry A, Ho CS, Laherty R, et al. A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia* 2005; 7: 1112-22.
- Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 585-93.
- Chaux P, Favre N, Martin M, Martin F. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. *Intern J Cancer* 1997; 72: 619-24.
- Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Intern J Cancer* 1997; 73: 309-16.
- Nestle FO, Burg G, Fah J, Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 1997; 150: 641-51.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 1219-26.
- Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001; 7: 1339-46.
- Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 6478-87.
- Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, et al. Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 2003; 200: 255-68.
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004; 114: 280-90.
- Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 293-8.
- Bronte V, Wang M, Overwijk W, et al. Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol* 1998; 161: 5313-20.
- Gabrilovich DI, Velders M, Sotomayor E, Kast WM. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* 2001; 166: 5398-406.
- Li Q, Pan PY, Gu P, Xu D, Chen SH. Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity. *Cancer Res* 2004; 64: 1130-9.
- Terabe M, Matsui S, Park JM, et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 2003; 198: 1741-52.
- Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by

- immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 2004; 172: 989-99.
21. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* 2005; 175: 4583-92.
 22. Huang B, Pan PY, Li Q, *et al.* Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 2006; 66: 1123-31.
 23. Bronte V, Serafini P, De Santo C, *et al.* IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2003; 170: 270-8.
 24. Kusmartsev S, Gabrilovich D. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* 2005; 174: 4880-91.
 25. Almand B, Clark JI, Nikitina E, *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients. A mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001; 166: 678-89.
 26. Danna EA, Sinha P, Gilbert M, Clements VK, Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Surgical removal of primary tumor reverses tumor-induced immunosuppression despite the presence of metastatic disease. *Cancer Res* 2004; 64: 2205-11.
 27. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 4756-60.
 28. Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 315-22.
 29. Talks KL, Turley H, Gatter KC, *et al.* The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000; 157: 411-21.
 30. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23: 549-55.
 31. Luo Y, Zhou H, Krueger J, *et al.* Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest* 2006; 116: 2132-41.
 32. Toscano MA, Ilarregui JM, Bianco GA, *et al.* Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity? *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 57-71.
 33. Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, Ilarregui JM, *et al.* A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol* 2007; 178: 436-45.
 34. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-62.
 35. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 263-74.
 36. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-9.
 37. Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 2007; 109: 2058-65.
 38. Kubach J, Lutter P, Bopp T, *et al.* Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 2007; in press.
 39. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, *et al.* Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med* 1999; 190: 385-98.
 40. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, *et al.* Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004; 5: 241-51.
 41. Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, *et al.* Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1381-94.
 42. Toscano MA, Commodaro AG, Ilarregui JM, *et al.* Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol* 2006; 176: 6323-32.
 43. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999; 59: 3128-33.
 44. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163: 5211-8.
 45. Shevach EM, Stephens GL. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 613-8.
 46. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299: 1033-6.
 47. Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, *et al.* Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005; 309: 1380-4.
 48. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, *et al.* Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med* 2005; 201: 1591-602.
 49. Zacarias Fluck MF, Rico MJ, Gervasoni SI, *et al.* Low-dose cyclophosphamide modulates galectin-1 expression and function in an experimental rat lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 237-48.
 50. O'Garra A, Vieira PL, Vieira P, Goldfeld AE. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest* 2004; 114: 1372-8.
 51. Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* 2006; 118: 1-9.
 52. Fiore F, Nuschak B, Peola S, *et al.* Exposure to myeloma cell lysates affects the immune competence of dendritic cells and favors the induction of Tr1-like regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2005; 35: 1155-63.
 53. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, *et al.* NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol* 2000; 1: 515-20.