

# Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg)

Juan Manuel Guzmán-Flores y Diana Patricia Portales-Pérez\*

Laboratorio de Inmunología y Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

## Resumen

Un punto importante de la inmunología es conocer cómo el sistema inmune es capaz de discriminar lo propio de lo no propio. Los linfocitos Treg suprimen activamente las respuestas inmunes patológicas y fisiológicas, y, por lo tanto, contribuyen al mantenimiento de la homeostasis. La caracterización de estas células reguladoras ha sido tema de gran controversia debido a la falta de marcadores exclusivos para su identificación y separación. Los mecanismos que utilizan los linfocitos Treg para mediar la supresión son: citocinas, citólisis, modulación del microambiente y receptores de superficie. El sistema inmune y las células Treg se han relacionado con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) mediante el proceso inflamatorio. En este trabajo revisamos los distintos marcadores propuestos para la identificación de las células Treg y los recientes avances en los mecanismos mediante los cuales estas células llevan a cabo su función primordial, la regulación del sistema inmune, y concluimos con el impacto de estas células sobre la obesidad y la DM2.

**PALABRAS CLAVE:** Sistema inmune. Células Treg. Tolerancia inmune. Diabetes mellitus tipo 2. Obesidad.

## Abstract

An important feature of immunology is understanding how the immune system is able to discriminate between self and non-self. Regulatory T-cells (Treg) actively inhibit immune responses involved in the pathological and physiological responses, and, in consequence, contribute to the maintenance of homeostasis. The characterization of these regulatory T-cells has been controversial due to the lack of exclusive markers for their identification and isolation. The mechanisms that regulatory T-cells use to function are: cytokines, death cells, modulation of the microenvironment, and surface receptors. The immune system and Treg cells have been related to obesity and type 2 diabetes mellitus through the inflammatory process. In this work, we review the proposed markers for Treg cells, recent data on the mechanism used for the main function of Treg cells, immune regulation, and we conclude with the impact of these cells on obesity and type 2 diabetes mellitus. (Gac Med Mex. 2013;149:630-8)

**Corresponding autor:** Diana Patricia Portales-Pérez, dportale@uaslp.mx

**KEY WORDS:** Immune system. Regulatory T cells. Immune tolerance. Type 2 diabetes mellitus. Obesity.

## Introducción

El sistema inmune es capaz de discriminar lo propio de lo no propio, inhibiendo las respuestas autoinmunes y permitiendo las respuestas efectivas contra

agentes infecciosos. Se han desarrollado diversos mecanismos para establecer y sostener la falta de respuesta a los antígenos propios mediante la eliminación o muerte y la inactivación funcional de los linfocitos auto-reactivos<sup>1</sup>. Los linfocitos Treg son una subpoblación de linfocitos T CD4+ que suprimen activamente las respuestas inmunes patológicas y fisiológicas, y, por lo tanto, contribuyen al mantenimiento de la autotolerancia inmunológica y a la homeostasis inmune<sup>1</sup>. La caracterización de estas células reguladoras ha sido tema de gran debate

### Correspondencia:

\*Diana Patricia Portales-Pérez  
Laboratorio de Inmunología y Biología Celular y Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Av. Dr. Manuel Nava, 6  
Zona Universitaria, C.P. 78210, San Luis Potosí, S.L.P.  
E-mail: dportale@uaslp.mx

Fecha de recepción en versión modificada: 26-06-2013

Fecha de aceptación: 19-09-2013

debido a la falta de marcadores exclusivos para su identificación y separación. Por otra parte, los mecanismos que utilizan los linfocitos Treg para mediar la supresión son un campo de investigación con progresos significativos. En este trabajo revisamos los distintos marcadores propuestos para la identificación de las Treg y los recientes avances en los mecanismos mediante los cuales estas células llevan a cabo su función primordial, la regulación del sistema inmune, y concluimos con el impacto de estas células sobre la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).

## Marcadores

El concepto de subpoblación de células T, capaces de suprimir la respuesta inmune, surgió en 1970, pero, debido a la falta de una tecnología apropiada que permitiera demostrar la presencia de estas células, fue olvidado. El tema de los linfocitos Treg fue retomado por Sakaguchi, et al. en 1995, cuando demostraron que la depleción de una población de células T CD4+ que coexpresaban CD25 (la cadena  $\alpha$  del receptor de la interleucina 2 [IL-2]) inducía un espectro de enfermedades autoinmunes cuando se transfería a ratones inmunocomprometidos y que estos efectos eran revertidos cuando se reconstituían con células CD4+CD25+, indicando que estas células participaban en el mantenimiento de la autotolerancia<sup>2</sup>. Sin embargo, los linfocitos T CD4+ expresan la molécula CD25 en distintos niveles, y aquellas células que muestran los niveles más altos de este marcador representan a la población de células Treg en un porcentaje del 1-2%.

La búsqueda de nuevos marcadores para definir las células Treg llevó a la identificación de Foxp3, un factor de transcripción de la familia *forkhead*. Foxp3 se considera un regulador importante de la homeostasis de las Treg, como se demuestra en la enfermedad autoinmune ligada a X, donde se presenta una alteración de las células T por una mutación en Foxp3 que es revertida cuando el gen de Foxp3 se transfiere a los ratones afectados<sup>3,4</sup>. La molécula de Foxp3, en presencia de la combinación de CD4 y CD25, ha sido muy utilizada para identificar las Treg en estudios de casos y controles. Sin embargo, la expresión de Foxp3 también puede ser inducida por estimulación a través del receptor de células T en las células T efectoras humanas, las cuales no tienen actividad supresora<sup>5</sup>. Por lo tanto, la expresión de Foxp3 es necesaria para su función, pero no suficiente para identificar a las Treg. Adicionalmente, se ha reportado la expresión del factor de transcripción Helios como un marcador de las células

Treg, pero solo el 70% de las Treg de sujetos sanos expresa Helios, en sangre periférica de humanos<sup>6</sup>.

Otro marcador de las células Treg funcionales es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  inducido por glucocorticoides (GITR). Adicionalmente, las Treg muestran niveles elevados de CD11a, CD44, CD54 y CD103 en ausencia de aparente estimulación antigénica. Estas células también presentan otros marcadores de superficie, como CD45RB, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), CD122, CD134, CD62L, altos niveles de receptores de quimiocinas y bajos niveles de CD127<sup>7-9</sup> (Tabla 1).

La gran diversidad de marcadores para los linfocitos Treg llevó a la conclusión de que estas células comprenden distintas poblaciones que regulan la respuesta inmune. Los dos principales tipos de linfocitos Treg son las células T reguladoras naturales (nTreg) y las células T reguladoras inducibles (iTreg)<sup>10-12</sup>. Los linfocitos nTreg se originan en el timo, se caracterizan por poseer el fenotipo CD4+CD25+Foxp3+ y poseen la capacidad de suprimir las células T CD4+, las células dendríticas (DC), las células T CD8+, las *natural killer* (NK), las *natural killer T cell* (NKT), los macrófagos/monocitos, las células B, los mastocitos, los basófilos, los eosinófilos y los osteoblastos<sup>11</sup>. Por su parte, los linfocitos iTreg se dividen en células T reguladoras de tipo 1 (Tr1) y células Treg de tipo T cooperadoras 3. Las células Tr1 se caracterizan por secretar interleucina 10 (IL-10), aunque también son capaces de secretar factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-2, interleucina 5 (IL-5) e interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Estas células no presentan un marcador específico; sin embargo, se ha sugerido el fenotipo CD4+CD25+Foxp3- como característica de esta población<sup>10,11</sup>. Las células T cooperadoras 3 secretan principalmente TGF- $\beta$ , aunque también son capaces de producir IL-10, son inducidas a partir de las células T CD4+ *naive* y, además de expresar CD4 y CD25, expresan Foxp3, por lo que no se pueden diferenciar a través de marcadores de las nTreg<sup>10,11</sup>.

Las células T CD4+ no son las únicas con propiedades reguladoras, pues existe una gran variedad de otros tipos celulares, como las células Treg CD8+, doble negativas, NKTreg, Breg y T $\gamma\delta$ , entre otras<sup>10,11</sup>. Los principales mecanismos de supresión de las células nTreg son a través de citocinas, citólisis, modulación del microambiente y receptores de superficie<sup>7,13</sup>, los cuales se describen a continuación (Fig. 1).

## Citocinas

Una característica principal de las células Treg es su baja producción de IL-2 y la expresión constitutiva

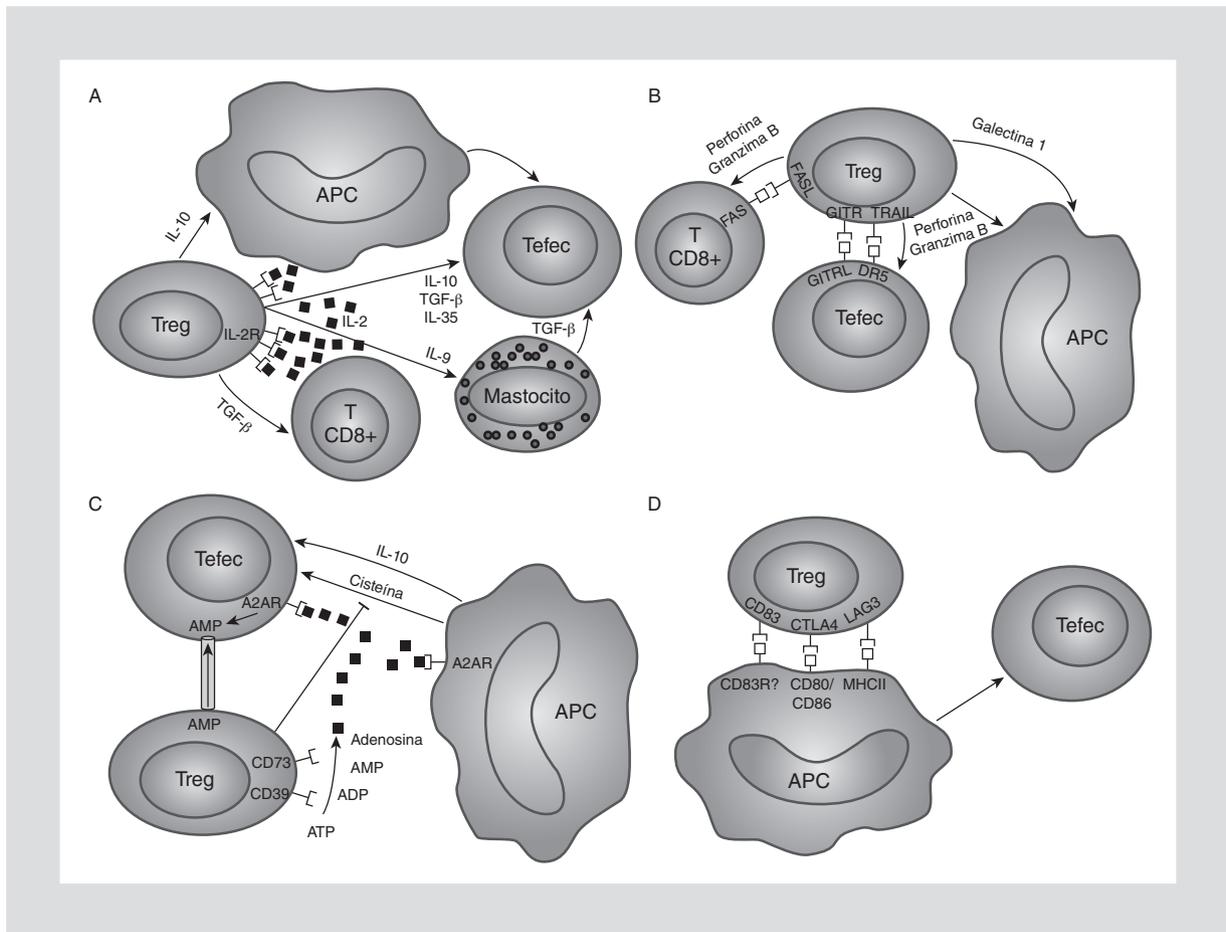
Tabla 1. Marcadores de los linfocitos Treg

Marcador	Expresión	Comentario	Referencias
CD25	Alta/superficie	También se expresa en las células T efectoras activadas	Sakaguchi, et al. <sup>2</sup>
Foxp3	Alta/intracelular	También se expresa en las células T efectoras activadas	Hori, et al. <sup>3</sup> , Fontenot, et al. <sup>4</sup>
CTLA-4	Alta/superficie	También se expresa en las células T efectoras activadas y los niveles de expresión se correlacionan con la potencia inmunosupresora de las Treg	Wing, et al. <sup>45</sup> , Onishi, et al. <sup>46</sup>
GITR	Alta/superficie	El receptor de TNF inducido por glucocorticoides también es expresado en células T efectoras activadas	McHugh, et al. <sup>37</sup>
CD127	Baja/superficie	La cadena $\alpha$ del receptor a IL-7 también es expresada en células T efectoras activadas	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Chen, et al. <sup>9</sup>
CD62L	Alta/superficie	La L-selectina también se expresa en las células T efectoras vírgenes; las células de ratón con el fenotipo CD4+ CD25+ CD62L+ tienen una gran capacidad supresora	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Yi, et al. <sup>8</sup>
CD279	Alta/superficie	La proteína 1 de muerte celular programada diferencia las células Treg de las T efectoras recientemente activadas	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Yi, et al. <sup>8</sup>
CD39	Alta/superficie	En conjunto con CD73 produce adenosina, la cual tiene un efecto inmunosupresor	Deaglio, et al. <sup>39</sup>
CD44	Alta/superficie	La molécula de adhesión celular asociada al <i>homing</i> identifica una subpoblación de células Treg con una función supresora aumentada y mediada principalmente por la secreción de IL-10	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Yi, et al. <sup>8</sup>
CD26	Baja/superficie	Esta peptidasa extracelular puede ayudar a distinguir las células Treg de las T efectoras	Schmetterer, et al. <sup>7</sup>
MHCII/HLA-DR	Alta/superficie	Esta molécula identifica un subtipo de Treg con alta capacidad supresora parcialmente independiente de IL-10	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Chen, et al. <sup>9</sup>
LAP	Alta/superficie	El péptido asociado a latencia identifica un subtipo de Treg con alta capacidad supresora	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Chen, et al. <sup>9</sup>
CD103	Alta/superficie	Esta molécula tiene la capacidad de identificar un subtipo de Treg con alta capacidad supresora y alta producción de IL-10	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Chen, et al. <sup>9</sup>
CCR6	Alta/superficie	El receptor de quimiocina C-C de tipo 6 diferencia las células T efectoras de las Treg de memoria con gran secreción de IL-10	Yi, et al. <sup>8</sup> , Chen, et al. <sup>9</sup>
LAG3	Alta/superficie	El antígeno 3 de activación de linfocitos identifica un subtipo de Treg con alta capacidad supresora productora de IL-10 y TGF- $\beta$ en humanos	Camisaschi, et al. <sup>51</sup>
LRRC32	Alta/superficie	La molécula que contiene repeticiones ricas en leucina es diferencialmente expresada en las Treg y su expresión se correlaciona con su capacidad supresora	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Chen, et al. <sup>9</sup>
Galectina 1	Alta/superficie	Esta molécula parece inducir la producción de IL-10	Cedeno-Laurent, et al. <sup>34</sup> , Garin, et al. <sup>35</sup>
Galectina 10	Alta/intracelular	La galectina 10 parece participar en la función inmunosupresora de las Treg	Kubach, et al. <sup>36</sup>
Helios	Alta/intracelular	Se expresa en aproximadamente el 70% de las células Treg humanas	Thornton, et al. <sup>6</sup>
TNFR2	Alta/superficie	El receptor de tipo 2 del TNF participa en la activación, supervivencia y estabilidad funcional de las Treg	Schmetterer, et al. <sup>7</sup> , Yi, et al. <sup>8</sup> , Chen, et al. <sup>9</sup>

LAP: péptido asociado a latencia; CCR6: receptor de quimiocina C-C de tipo 6; LAG3: antígeno 3 de activación de linfocitos; LRRC32: molécula con repeticiones ricas en leucina; TNFR2: receptor de tipo 2 del TNF.

de CD25, por lo que dependen en gran medida de la IL-2 exógena para su proliferación y supervivencia<sup>14</sup>. Las células Treg suprimen las T efectoras, al privar a

estas últimas de la IL-2 mediante la unión a su receptor altamente expresado y subsecuente internalización; como consecuencia, las células T que son privadas de



**Figura 1.** Mecanismos de supresión utilizados por las células Treg. **A:** citocinas: este mecanismo es mediado por IL-10, TGF-β, IL-9 y la privación de la IL-2. **B:** citólisis: las moléculas de superficie Fas/FasL, TRAIL/DR5 y GITR/GITRL, así como la perforina, la granzima B y la galectina 1 inducen apoptosis en los linfocitos T CD8+, Tefec y APC. **C:** modulación del microambiente: la inmunosupresión se lleva a cabo por la adenosina generada por CD39 y CD73 y la interferencia con la cisteína. **D:** receptores de superficie: distintas moléculas de la superficie de las células Treg inducen un estado tolerogénico en las APC, las cuales suprimen a su vez los linfocitos Tefec.

IL-2 experimentan apoptosis<sup>14</sup>. Sin embargo, otros reportes sugieren que las células Treg solo utilizan la IL-2 para salir del estado anérgico y activarse, pero no como un mecanismo de supresión<sup>15,16</sup>.

La IL-10 y el TGF-β han sido las principales citocinas inhibitorias relacionadas con los mecanismos de supresión de las Treg. La IL-10 es una potente citocina inmunorreguladora secretada por una gran cantidad de células inmunes, incluyendo monocitos, DC, células B, células T activadas y Treg, a la cual se le han atribuido propiedades antiinflamatorias. Esta citocina producida por las células Treg disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras en las DC, lo que induce un estado tolerogénico en ella<sup>17</sup> y suprime los linfocitos T efectoras (Tefec)<sup>16</sup>. Además, las células Treg de ratones *Knock-out* (KO) de IL-10 muestran una supresión disminuida comparada con las células Treg de ratones silvestres (*wildtype*)<sup>16,17</sup>. No obstante, la participación de la IL-10

en la función de la Treg aún es controversial, debido a que otros estudios muestran que la capacidad reguladora de las Treg es independiente de la IL-10<sup>15,18</sup>. Estos resultados nos llevan a suponer que la IL-10 juega una función especializada en subtipos de Treg o en algún tejido específico, pero no es esencial para su función.

El TGF-β es una citocina inmunosupresora con propiedades pleiotrópicas. Se ha reportado que el TGF-β se expresa a nivel de membrana y de forma secretada en las células Treg, tanto en modelos murinos como en humanos, y puede mediar la supresión de las Treg sobre las células T efectoras y de los linfocitos T CD8+ de una manera dependiente del contacto célula-célula<sup>19</sup>. En contraste, estudios con células T efectoras deficientes del receptor de TGF-β o utilizando agentes neutralizantes del TGF-β o de su receptor fracasaron al demostrar que el TGF-β unido a membrana participa en la función supresora de las Treg<sup>20</sup>. Además, otros estudios *in vitro* han

mostrado que esta citocina puede no ser esencial en la función supresora de las Treg<sup>15,18</sup>. Por otra parte, se ha sugerido que esta citocina participa en la inducción de la expresión de Foxp3 y de esta manera en el mantenimiento de las Treg y en la inducción de las mismas a partir de células T vírgenes<sup>21</sup>. Por lo tanto, aunque la importancia de la IL-10 y el TGF- $\beta$  como mediadores supresores es indiscutible, su contribución a la función supresora de las Treg aún se está investigando.

Adicionalmente, se reportó una citocina inhibitoria expresada preferencialmente en las Treg y que participa en su actividad supresora sobre los linfocitos Tefec, la interleucina 35 (IL-35)<sup>22,23</sup>. Esta citocina es un nuevo miembro de la familia de la interleucina 12 (IL-12), formada por el gen 3 inducido por el virus de Epstein-Barr (Ebi3), el cual normalmente se une con p28 para formar interleucina 27 (IL-27), y p35, también conocido como IL-12A, que se une normalmente a p40 para formar IL-12. La IL-35 no es expresada en células T efectoras activadas o en reposo, pero sí en células Treg Foxp3+<sup>16,22</sup>. Las células KO para IL-12A o Ebi3 muestran una grave reducción de la capacidad reguladora de la Treg *in vitro* e *in vivo*<sup>16,22</sup>, y el mecanismo de regulación propuesto para la IL-35 podría ser a través del contacto célula-célula<sup>16</sup>. Sin embargo, Bardel, et al. reportaron que las células Treg humanas (CD4+CD25+Foxp3+) parecen no expresar IL-35<sup>24</sup>, lo cual pone en discusión el papel de la IL-35 en la función de las Treg. En contraste, Chaturvedi, et al. demostraron que las células Treg humanas (CD4+CD25+) secretan IL-35 y que participa de manera importante en la función supresora de las Treg<sup>25</sup>. Los resultados anteriores podrían indicar que las Treg humanas pueden producir IL-35 bajo ciertas circunstancias o que se analizaron distintas poblaciones de células Treg. Se ha propuesto llamar a este tipo de células Treg iT<sub>R</sub>35<sup>23</sup>. Aunque el descubrimiento de la IL-35 como parte del repertorio de supresión de las Treg es de gran interés, falta definir su función en otras células, como por ejemplo si la IL-35 suprime el desarrollo o función de las DC o de los macrófagos.

Otra citocina implicada en el mecanismo de supresión de las Treg es la interleucina 9 (IL-9), molécula a la que se ha atribuido una función en la regulación de la inflamación. Esta citocina se expresa principalmente en las células T cooperadoras 2, 9 y 17, los mastocitos y las NKT. La expresión de IL-9 en las Treg ha sido tema de discusión, ya que datos en ratones y humanos han mostrado que estas células expresan IL-9<sup>26,27</sup> y que el mecanismo de supresión de las Treg y la IL-9 es a través del reclutamiento de mastocitos<sup>26</sup>. En cambio, otro grupo de investigación no encontró que las células

Treg secretaran IL-9, pero sí demostró su participación en la función supresora sobre las células T efectoras<sup>28</sup>.

## Citólisis

La citólisis mediada a través de granzimas ha sido considerada un mecanismo básico de los linfocitos T CD8+ y de las NK. Sin embargo, otras células como los linfocitos T CD4+ también muestran actividad citotóxica, tales como los Treg, los cuales expresan perforina y granzima A y B. Al respecto, se ha reportado que células Treg de ratones deficientes de granzima B presentan actividad supresora disminuida y que esta actividad supresora se realiza a través de la apoptosis de los linfocitos Tefec CD4+CD25-, la cual es independiente de la perforina<sup>29</sup>, lo que indica que los linfocitos Treg utilizan la granzima B pero no la perforina como un mecanismo de supresión. Adicionalmente, se ha demostrado que las células Treg pueden poseer actividad citolítica sobre las células B preferentemente presentadoras de antígenos a través de perforina y granzima B<sup>30</sup>, así como en linfocitos T CD8+ citotóxicos y NK involucrados en la eliminación de tumores a través de una manera dependiente de granzima B y perforina<sup>31</sup>. Sin embargo, la supresión de células Treg deficientes de perforina o células Treg incubadas con un inhibidor de granzima B no muestra diferencias con respecto a las células Treg silvestres o incubadas sin el inhibidor<sup>14</sup>, lo que indicaría que ni la perforina ni la granzima B participan en el mecanismo de supresión de las células Treg mediadas por citólisis.

Otro estudio ha sugerido que las células Treg inducen apoptosis de células T efectoras tanto *in vitro* como *in vivo* a través de una vía dependiente de *tumor-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-death receptor 5* (TRAIL-DR5)<sup>32</sup>. La interacción de CD95-CD95L (Fas-FasL) también parece jugar un papel en la función supresora de las células Treg, pero solo en los linfocitos T CD8+, en donde se observó supresión de estas células por apoptosis<sup>33</sup>.

Una molécula que posiblemente juegue una función importante en las interacciones Treg con las DC o Treg con las células T efectoras es la galectina 1, la cual es secretada como un homodímero y se une a diversas glicoproteínas, incluyendo CD45, CD43 y CD7. La unión de galectina 1 a su receptor genera arresto del ciclo celular, apoptosis e inhibición de citocinas proinflamatorias<sup>34</sup>. El bloqueo de la galectina 1 reduce significativamente los efectos inhibitorios de las células Treg de ratón y humanas<sup>34,35</sup>. También se ha descrito que la galectina 1 puede actuar sobre las células presentadoras de antígenos (APC) y en ellas inducir la síntesis de

IL-27, la cual actúa sobre los Tr1 promoviendo la producción de IL-10, que suprime a su vez los linfocitos Tefec<sup>34</sup>. Otro miembro de la familia de las galectinas, denominado galectina 10, se identificó, mediante un enfoque proteómico, como una proteína expresada selectivamente por células Treg humanas. El tratamiento con ARN pequeño de interferencia (siARN) específico a galectina 10 revierte el estado anérgico y la supresión producida por las células Treg, por lo que esta molécula podría ser esencial para que las células Treg lleven a cabo sus funciones de supresión y anergia<sup>36</sup>. Por otra parte, se ha reportado que la molécula GITR se encuentra sobreexpresada en las células Treg y que la neutralización de esta molécula mediante el uso de anticuerpos monoclonales revierte la supresión mediada por las células Treg sobre las células T efectoras, lo que indicaría que GITR también podría participar en la función supresora de los linfocitos Treg<sup>37</sup>. Sin embargo, las células Treg son capaces de suprimir la proliferación de células T convencionales, que son resistentes a la apoptosis en la misma intensidad que las células T sensibles a ella<sup>38</sup>, lo que ha puesto en entredicho la importancia de la inducción de apoptosis en la supresión mediada por las Treg.

## Modulación del microambiente

Distintos factores bioquímicos en el microambiente de las células T efectoras regulan en gran medida su capacidad de proliferar y de inducir una respuesta inmune eficaz. Un mecanismo de regulación mediante las células Treg es la generación de adenosina con la participación de las ectonucleotidasas CD73 y CD39, expresadas en la superficie de las células Treg, las cuales degradan el trifosfato de adenosina (ATP) y el difosfato de adenosina (ADP) hasta adenosina<sup>39</sup>. La adenosina se une a cuatro distintos subtipos de receptores de adenosina de superficie acoplados a proteínas G llamados A1, A2A, A2B y A3. El receptor A2A es el principal receptor de adenosina asociado a linfocitos T, mientras que las APC expresan A2A y/o A2B. La adenosina regula la función de las células T reduciendo la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-12 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>40</sup>, y, por el contrario, estimula la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en las APC<sup>40,41</sup>. El papel de CD39 y la adenosina en la función reguladora de las células Treg se ha demostrado utilizando ratones KO de CD39, en donde se observó una proliferación de células T efectoras, a diferencia de los ratones silvestres, que muestran una inhibición de estas células por las Treg<sup>39</sup>. El hecho de que las Treg produzcan y

respondan a la adenosina implica que esta molécula actúa como un factor autocrino para optimizar la respuesta antiinflamatoria. La adenosina lleva a cabo estas funciones uniéndose a los receptores A2A de otro tipo de células o de las mismas Treg, y de esta manera cataliza la producción de AMP cíclico intracelular, el cual también aumenta la capacidad supresora de las Treg<sup>42</sup> e inhibe la expresión de moléculas coestimuladoras en las DC<sup>17</sup>. Por otra parte, experimentos interesantes han sugerido que el AMP cíclico intracelular también puede ser transferido desde las células Treg hasta las células T efectoras a través de uniones gap<sup>42</sup>.

Un factor limitante de importancia crucial para la supervivencia celular es la disponibilidad de cisteína. Las células T no pueden tomar cisteína de forma extracelular y, en consecuencia, dependen en gran medida de la secreción de la misma por las DC colocalizadas<sup>43</sup>. A este respecto, ha sido reportado que las células Treg intervienen en este proceso al inhibir indirectamente los linfocitos Tefec a través de la cisteína<sup>43</sup>. Adicionalmente, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa derivada de especies reactivas de oxígeno y producidas por linfocitos Treg parece participar en la supresión de las células T efectoras<sup>44</sup>. Los trabajos mencionados anteriormente parecen indicar que la modificación del entorno redox por los linfocitos Treg puede ser un nuevo mecanismo inmunosupresor de estas células.

## Receptores de superficie

Dentro de los mecanismos de supresión de las Treg se encuentran los procesos dependientes de contacto, en los cuales las moléculas de la superficie celular (receptores de membrana) son responsables de los efectos supresores de las células Treg.

La importancia de la molécula CTLA-4 fue puesta de manifiesto por el reporte de ratones deficientes de CTLA-4 en las células Treg que desarrollaron una enfermedad autoinmune, así como una baja expresión de moléculas coestimuladoras en las DC y disminución en la función supresora de las células Treg<sup>45,46</sup>. El CTLA-4 se une a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 presentes en las APC; de igual manera lo hace CD28, que se encuentra en los linfocitos T vírgenes para inducir una señal coestimuladora requerida para su activación y proliferación. Sin embargo, CTLA-4 muestra una mayor afinidad por CD80 y CD86 en comparación con CD28, por lo que bloquea la señal coestimuladora e inhibe a los linfocitos Tefec a través de las APC. Esta inhibición se lleva a cabo a través de la disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras, aun en

presencia de diversos estímulos de la maduración de las DC, tales como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y lipopolisacárido (LPS)<sup>45,46</sup>. Aunque este mecanismo se presenta principalmente entre las células Treg y las APC, un estudio también reporta que los linfocitos Treg pueden suprimir a los linfocitos Tefec a través de la molécula de CTLA-4<sup>47</sup>.

Aparte de CTLA-4, otras moléculas contribuyen a la función supresora de las Treg, entre ellas el «gen 3 de activación de linfocitos» (LAG3), también llamado CD223, el cual es una molécula de adhesión homóloga a CD4 que se une a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) con una afinidad muy alta<sup>48</sup>. El LAG3 ha sido implicado en la función supresora de las Treg a través de una interacción directa entre las Treg y las T efectoras y a través de la modulación de la función de las APC<sup>48</sup>. Respecto a esto último, se ha reportado que la unión de LAG3 de las células Treg al MHC II en las DC resulta en inhibición de la maduración y capacidad inmunoestimuladora de las DC<sup>49</sup>. Por otra parte, ratones KO de LAG3 muestran alteraciones graves en la capacidad supresora de las Treg, pero la transducción retroviral de LAG3 en las células T CD4+ es suficiente para restaurar su función reguladora<sup>50</sup>. Además, al estudiar a las células Treg infiltrantes de tumores de pacientes con melanoma o cáncer colorrectal, se observó que las células Treg LAG3+ forman una subpoblación distinta que produce grandes cantidades de IL-10 y TGF- $\beta$ <sup>51</sup>. Sin embargo, al investigar la capacidad supresora *in vitro* de las células Treg LAG3+, se observó que fue dependiente de contacto y no mediada por estas citocinas, por lo que la posible contribución de la IL-10 y el TGF- $\beta$  todavía queda por aclararse<sup>51</sup> en estas células.

Otra molécula involucrada en la función reguladora de las células Treg es CD83, la cual se expresa en la superficie de las Treg y contribuye directamente a la supresión dependiente de contacto por estas células<sup>52</sup>. Interesantemente, la transducción retroviral de CD83 en las células T CD4+ no solo reestablece la función reguladora, sino que también conduce a una sobrerregulación de CTLA-4 y Foxp3<sup>52</sup>. No obstante, el receptor para CD83 aún no ha sido identificado, por lo que la función reguladora de las células Treg a través de CD83 sigue en investigación.

## Obesidad y DM2

Los linfocitos Treg han sido asociados a una gran variedad de enfermedades, como enfermedad inflamatoria intestinal, alergia, asma, diabetes *mellitus* de tipo «1» (DM1) y «2» (DM2), esclerosis múltiple, cáncer

e infecciones<sup>12,53</sup>, entre otras. Sin embargo, en los últimos años, la obesidad y la DM2 han sobresalido por su prevalencia a nivel mundial, así como por su relación con el proceso inflamatorio e inmune, en el cual resalta la participación de las células Treg<sup>54,55</sup>.

Distintos grupos de investigación han reportado niveles disminuidos de células Treg en el tejido adiposo de ratones obesos con respecto a ratones con peso normal<sup>56,57</sup>; uno de ellos encontró altos niveles de células Treg en el bazo<sup>56</sup>, pero el otro grupo de investigación no encontró diferencias entre los dos grupos de ratones en el mismo órgano<sup>57</sup>. Un trabajo adicional encontró también una disminución de estas células y propuso que las células B podían ser reguladoras de los linfocitos T, entre ellos los Treg<sup>58</sup>. Interesantemente, las células Treg residentes del tejido adiposo expresaron altos niveles de IL-10 y presentaron un perfil del receptor de células T distinto, comparado con las Treg del bazo o de los ganglios linfáticos o las células T convencionales, lo que sugiere que los linfocitos Treg del tejido adiposo pueden experimentar selección antigénica<sup>57</sup>. Los niveles disminuidos de linfocitos Treg en el tejido adiposo posiblemente sean una consecuencia de los altos niveles de leptina, la cual se encuentra en concentraciones elevadas durante la obesidad e inhibe la proliferación de las Treg<sup>59</sup>. Otra razón por la cual los linfocitos Treg se encontrarían disminuidos en la obesidad es a consecuencia de las señales inflamatorias producidas por los macrófagos<sup>56</sup>.

Con respecto a los resultados encontrados en humanos, los estudios han sido controversiales<sup>56,60</sup>, debido a que se reporta tanto una disminución como un aumento en la expresión de Foxp3. Sin embargo, solo se evaluó a nivel de ARNm, por lo que faltaría comprobar sus resultados a nivel de proteína. También ha sido demostrado que la alta expresión de Foxp3 en tejido adiposo se correlaciona con marcadores de inflamación sistémica, tales como proteína C reactiva e interleucina 6 (IL-6), lo que confirmaría una función potencial de las células Treg en la inflamación relacionada con la obesidad, pero no apoyaría la idea de una pérdida de protección por parte de las células Treg que contribuiría a la inflamación del tejido adiposo en pacientes con obesidad, como se sugiere en estudios realizados en animales<sup>60</sup>. Por otro lado, en sangre periférica estos linfocitos se han reportado aumentados en sujetos con obesidad<sup>61</sup> pero en infantes no se encontraron diferencias<sup>62</sup>. Una posible explicación para las discrepancias en los estudios en humanos podría ser la variabilidad en la expresión de Foxp3 en las células Treg humanas, por lo que el empleo de

otros marcadores, como Helios, podría ayudar a aclarar esta cuestión.

En relación con la diabetes, las células Treg han sido encontradas disminuidas en pacientes con DM2<sup>63,64</sup>, y esto puede ser debido a una mayor susceptibilidad a la apoptosis de las células de los pacientes<sup>64</sup>. Los linfocitos Treg también muestran una buena correlación con el índice de masa corporal, lo que podría indicar que con el aumento de la obesidad en pacientes con DM2 la función protectora de los linfocitos Treg disminuiría debido al cambio hacia un fenotipo proinflamatorio en estos pacientes<sup>63</sup>. Por otra parte, el número de linfocitos Treg y la resistencia a la insulina también se han encontrado correlacionados<sup>57</sup>, por lo que la inmunoterapia basada en estas células podría ser un blanco para el tratamiento de la DM2 y la obesidad. Esto se demostró con la expansión de las células Treg, lo cual resultó en una mejoría de la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en una forma dependiente de IL-10 en ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasa<sup>57,65</sup>, mientras que la depleción de las células Treg agrava la función metabólica, incluso en ratones no obesos<sup>57,66</sup>. De la misma manera, un tratamiento oral con anti-CD3 y  $\beta$ -glucosilceramida en ratones diabéticos *ob/ob* restauró los niveles de las células Treg asociadas a tejido adiposo visceral y mejoró los niveles de glucosa sanguínea, la inflamación del tejido adiposo y el daño hepático<sup>67</sup>; además, la transferencia de Treg a ratones diabéticos *db/db* previene la nefropatía diabética<sup>66</sup>. Por otra parte, la administración de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) reduce la ganancia de peso en ratones alimentados con una dieta rica en grasa, junto con una mejoría de los niveles de glucosa y resistencia a la insulina, así como un aumento del número de linfocitos Treg<sup>68</sup>. También se ha evaluado un compuesto del té verde, el epigallocatequina-3-galato (EGCG), que induce un aumento de las células T expresando Foxp3, así como una potencialización de su funcionalidad a través de la secreción de IL-10 y supresión de NF- $\kappa$ B por la inducción de cambios epigenéticos<sup>69</sup>.

## Conclusiones

Se ha reportado una gran variedad de marcadores para la identificación de células Treg, tanto en ratón como en humano. Los mecanismos básicos mediante los cuales las células Treg llevan a cabo su función son: síntesis de citocinas, citólisis, modulación del microambiente y mediante receptores de superficie. Aunque la mayoría de los reportes muestran que estos mecanismos participan de manera importante en la

función reguladora de las células Treg, otros muestran lo contrario. La polémica en los resultados puede ser debida a la presencia de distintas subpoblaciones y a la metodología utilizada para la identificación y purificación de las células Treg.

Los estudios de células Treg relacionados con la obesidad parecen mostrar una disminución de estas células en el tejido adiposo, lo que indicaría una pérdida de protección por parte de las células Treg que conduciría a un estado inflamatorio. En DM2, se han reportado niveles disminuidos de células Treg y una correlación con la resistencia a la insulina y los niveles de glucosa; además, su expansión revierte las alteraciones metabólicas, lo que indicaría una función primordial en esta enfermedad. En resumen, las células Treg tienen una participación muy activa en la regulación del sistema inmune y en la fisiopatología de la obesidad y la DM2, por lo que podrían ser un blanco terapéutico para el tratamiento de estas enfermedades; sin embargo, es necesario realizar más estudios para corroborar esta propuesta.

## Agradecimientos

Juan Manuel Guzmán-Flores es becario posdoctoral CONACYT (registro 162015).

## Bibliografía

1. Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol.* 2011;23(6):424-30.
2. 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(3):1151-64.
3. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057-61.
4. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6.
5. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* 2007;19(4):345-54.
6. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2010;184(7):3433-41.
7. Schmetterer KG, Neunkirchner A, Pickl WF. Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB J.* 2012;26(6):2253-76.
8. Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol.* 2006;3(3):189-95.
9. Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(10):1489-96.
10. Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.* 2006;25(2):195-201.
11. Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol.* 2012;40(2):186-204.
12. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(16):2603-22.

13. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007;13(3):108-16.
14. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1353-62.
15. Oberle N, Eberhardt N, Falk CS, Krammer PH, Suri-Payer E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4+CD25 T cells by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF-beta, and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol.* 2007;179(6):3578-87.
16. Collison LW, Pillai MR, Chaturvedi V, Vignali DA. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol.* 2009;182(10):6121-8.
17. Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, et al. Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol.* 2010;265(2):91-6.
18. Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol.* 2001;31(4):1122-31.
19. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10878-83.
20. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med.* 2002;196(2):237-46.
21. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198(12):1875-86.
22. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007;450(7169):566-9.
23. Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat Immunol.* 2010;11(12):1093-101.
24. Bardel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Hermine A, Devergne O. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol.* 2008;181(10):6898-905.
25. Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DA. Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol.* 2011;186(12):6661-6.
26. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature.* 2006;442(7106):997-1002.
27. Putheti P, Awasthi A, Popoola J, Gao W, Strom TB. Human CD4 memory T cells can become CD4+IL-9+ T cells. *PLoS One.* 2010;5(1): e8706.
28. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):12885-90.
29. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005;174(4):1783-6.
30. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood.* 2006;107(10):3925-32.
31. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 2007;27(4):635-46.
32. Ren X, Ye F, Jiang Z, Chu Y, Xiong S, Wang Y. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death Differ.* 2007;14(12):2076-84.
33. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 2009;182(3):1469-80.
34. Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clin Immunol.* 2012;142(2):107-16.
35. 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(5):2058-65.
36. 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 energy and suppressive function. *Blood.* 2007;110(5):1550-8.
37. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* 2002;16(2):311-23.
38. Szymczak-Workman AL, Delgoffe GM, Green DR, Vignali DA. Cutting edge: regulatory T cells do not mediate suppression via programmed cell death pathways. *J Immunol.* 2011;187(9):4416-20.
39. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1257-65.
40. Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 2000;14(13):2065-74.
41. Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, et al. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol.* 2005;175(12):8260-70.
42. Bopp T, Becker C, Klein M, et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1303-10.
43. Yan Z, Garg SK, Kipnis J, Banerjee R. Extracellular redox modulation by regulatory T cells. *Nat Chem Biol.* 2009;5(10):721-3.
44. Efimova O, Szankasi P, Kelley TW. Ncf1 (p47phox) is essential for direct regulatory T cell mediated suppression of CD4+ effector T cells. *PLoS One.* 2011;6(1):e16013.
45. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008;322(5899):271-5.
46. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(29):10113-8.
47. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(28):10398-403.
48. Okamura T, Fujio K, Sumitomo S, Yamamoto K. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann Rheum Dis.* 2012;71 Suppl 2:i96-100.
49. Liang B, Workman C, Lee J, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol.* 2008;180(9):5916-26.
50. Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 2004;21(4):503-13.
51. Camisaschi C, Casati C, Rini F, et al. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol.* 2010;184(11):6545-51.
52. Reinwald S, Wiethe C, Westendorf AM, et al. CD83 expression in CD4+ T cells modulates inflammation and autoimmunity. *J Immunol.* 2008;180(9):5890-7.
53. Garcia-Hernandez MH, Alvarado-Sanchez B, Calvo-Turrubiarres MZ, et al. Regulatory T Cells in children with intestinal parasite infection. *Parasite Immunol.* 2009;31(10):597-603.
54. Guzman-Flores JM, Lopez-Briones S. Cells of innate and adaptive immunity in type 2 diabetes and obesity. *Gac Med Mex.* 2012;148(4):381-9.
55. Sell H, Habich C, Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(12):709-16.
56. Deilius J, Shah Z, Shah N, et al. Visceral adipose inflammation in obesity is associated with critical alterations in tregulatory cell numbers. *PLoS One.* 2011;6(1):e16376.
57. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med.* 2009;15(8):930-9.
58. Defuria J, Belkina AC, Jagannathan-Bogdan M, et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(13):5133-8.
59. Matarese G, Procaccini C, De Rosa V, Horvath TL, La Cava A. Regulatory T cells in obesity: the leptin connection. *Trends Mol Med.* 2010;16(6):247-56.
60. Zeyda M, Huber J, Prager G, Stulnig TM. Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(4):743-8.
61. van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes.* 2012;61(2):401-8.
62. Svec P, Vasarhelyi B, Paszthy B, et al. Do regulatory T cells contribute to Th1 skewness in obesity? *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007;115(7):439-43.
63. Jagannathan-Bogdan M, McDonnell ME, Shin H, et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. *J Immunol.* 2011;186(2):1162-72.
64. Zeng C, Shi X, Zhang B, et al. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berl).* 2012;90(2):175-86.
65. Winer S, Chan Y, Paltser G, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 2009;15(8): 921-9.
66. Eller K, Kirsch A, Wolf AM, et al. Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2011;60(11):2954-62.
67. Ilan Y, Maron R, Tukpah AM, et al. Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9765-70.
68. Tian J, Dang HN, Yong J, et al. Oral treatment with gamma-aminobutyric acid improves glucose tolerance and insulin sensitivity by inhibiting inflammation in high fat diet-fed mice. *PLoS One.* 2011;6(9):e25338.
69. Yun JM, Jialal I, Devaraj S. Effects of epigallocatechin gallate on regulatory T cell number and function in obese v. lean volunteers. *Br J Nutr.* 2010;103(12):1771-7.