

Caracterización de las células T reguladoras por citometría de flujo: estado del arte y controversias

Carlos J. Montoya, Paula A. Velilla, María T. Rugeles

Grupo de Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
Institución: Sede de Investigación de la Universidad de Antioquia

La habilidad para mantener el equilibrio entre la activación y la inhibición de la respuesta inmune es un requisito necesario para evitar el desarrollo de procesos inmunopatológicos. Esto se logra gracias a la existencia de mecanismos efectores que permiten la eliminación de agentes extraños al organismo y a la presencia de un sistema regulador que limita las respuestas efectoras y mantiene la tolerancia de los antígenos propios.

Entre los mecanismos reguladores se destaca la función ejercida por los linfocitos T (LT) CD4⁺, en particular, por la subpoblación de LT reguladores naturales (nTreg). La caracterización fenotípica y funcional de estas células es compleja, por la ausencia de un marcador que permita su identificación específica por citometría de flujo, herramienta que ha hecho posible la caracterización de la gran mayoría de células del sistema inmune.

Actualmente, se propone que el uso combinado de anticuerpos monoclonales que permitan la identificación de LT CD4⁺/CD25^{alto}/Foxp3⁺/CD127^{bajo} es la alternativa más específica para determinar la frecuencia de estas células. Para estudios funcionales se requiere eliminar, de la combinación anterior; la detección de FoxP3 por ser una molécula intracelular cuya detección requiere la permeabilización celular. Una vez están purificadas las nTreg, la actividad funcional se evalúa por diferentes métodos que, en su mayoría, miden el efecto que tienen sobre la función de los LT efectoras.

Con base en estas limitaciones se continúa la búsqueda constante de nuevas moléculas que permitan una mejor caracterización de estas células por citometría de flujo; además, se ha propuesto la caracterización molecular (metilación de FoxP3) para refinar el estudio de esta subpoblación celular.

Palabras clave: citometría de flujo, subgrupos de linfocitos T, linfocitos T reguladoras

Characterization of regulatory T cells by flow cytometry: current status and controversies

The ability to maintain proper balance between immune activation and inhibition is required to develop an effective immune response without immunopathogenic processes associated. Different effector mechanisms that allow the elimination of exogenous agents and the presence of a regulatory system guarantee the physiological immune response and maintain the tolerance to self antigens.

Among the regulatory mechanisms, the function of CD4⁺ T lymphocytes, in particular, the regulation exerted by natural regulatory T cells (nTreg), is important to underline. The phenotypic and functional characterization of these cells is a complex process, due to the absence of a cell marker that allows their specific identification by flow cytometry, a tool that has made possible the characterization of most of the immune cells.

Currently, the combined use of monoclonal antibodies to identify CD4⁺/CD25^{high}/Foxp3⁺/CD127^{low} T lymphocytes has been proposed as the most specific alternative to determine the frequency of nTreg. For functional analysis, the identification of nTreg based on the expression of FoxP3 is not possible, since this is an intracellular molecule that requires the permeabilization of the cells for their identification. Once the cells are pure, their functional activity could be evaluated by different methods, including measuring their effect on the function of effector T lymphocytes.

Based on these limitations the search for new molecules that allow a better characterization of these cells by flow cytometry continues and most likely a combination of this powerful tool with recent molecular findings (FoxP3 gene methylation pattern) will give a more precise alternative to study this cell subpopulation.

Key words: flow cytometry, T-lymphocyte subsets, regulatory T cells

La respuesta inmune contra un antígeno puede potencialmente generar daño en los tejidos propios; sin embargo, en condiciones normales su magnitud está finamente controlada, tanto en intensidad como en duración. De esta manera, se mantiene un equilibrio entre la activación y la inhibición que permite que el sistema inmune conserve la capacidad de reconocer y eliminar los antígenos, a la vez que limita las repuestas efectoras potencialmente nocivas (1,2). Las alteraciones de esta regulación fisiológica se manifiestan como enfermedades con procesos inflamatorios crónicos, ya sea por una respuesta persistente contra los microorganismos, o contra antígenos no patogénicos (alergias) o antígenos propios (autoinmunidad); por otro lado, un exceso de regulación puede limitar la efectividad de la respuesta inmune permitiendo que se establezcan infecciones crónicas o se desarrollen procesos oncogénicos.

La creciente investigación en el área de la regulación inmunológica ha permitido definir mecanismos muy complejos que involucran tanto factores solubles (humorales) como diversas células de origen hematopoyético con actividad inmunomoduladora. Se ha demostrado que tanto las células de la inmunidad innata (células dendríticas, células asesinas naturales, macrófagos y linfocitos de memoria natural, entre otros) como las de la inmunidad adaptativa (linfocitos T y B), tienen una actividad reguladora importante. Sin embargo, es muy particular que dentro de la regulación de la respuesta inmune adaptativa contra los antígenos extraños y los propios, estén involucrados varios subtipos de linfocitos T que expresan en su superficie la molécula CD4 (LT CD4⁺ o ayudadores). Esto indica que dentro del linaje de LT CD4⁺ existe una gran plasticidad fenotípica y funcional, determinada por la presencia de diversos programas de expresión génica durante la vida de estas células, que se desarrollan en respuesta a las condiciones microambientales durante la ontogenia, maduración y activación. Así, entre los LT CD4⁺ se pueden encontrar células vírgenes (Th0), células efectoras con un patrón de producción de citocinas tipo Th1, Th2 o Th17, células de memoria central, y células reguladoras.

Correspondencia:

Carlos Julio Montoya, Calle 62 N° 52-59, Torre 2, Laboratorio 532, Sede de Investigación, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
Teléfono: 210 6484; fax: 210 6481
cjmonto@une.net.co

Entre las principales subpoblaciones funcionales de células T reguladoras se destacan las T reguladoras naturales, las células T reguladoras inducidas, células reguladoras tipo Tr1 y células reguladoras tipo Th3. Estas diferentes subpoblaciones de células T reguladoras pueden ejercer su acción a través de mecanismos dependientes de contacto por moléculas de superficie, o independientes de contacto mediante la producción de citocinas inmunosupresoras como la interleucina (IL)-10 y el factor transformante del crecimiento beta (TGF- β); además, estas dos citocinas permiten la identificación diferencial entre las células Tr1 (IL-10>TGF- β) y las Th3 (TGF- β >IL-10) (3).

Infelizmente, debido a que muchos de esos patrones de expresión son transitorios, y no llevan a cambios fenotípicos exclusivos que se asocien siempre con una actividad funcional en particular, la caracterización de cada una de las subpoblaciones de LT CD4⁺ con actividad reguladora específica presenta muchas limitaciones para aquellas personas interesadas en su investigación.

En esta revisión mostramos con ejemplos prácticos cuáles son las limitaciones que existen actualmente para el estudio de las células T reguladoras naturales.

Células T reguladoras naturales (nTreg)

En 1995, Sakaguchi y colaboradores describieron en ratones la existencia de una subpoblación de LT CD4⁺ que prevenía el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes, al suprimir la activación y expansión de los LT autorreactivos, lo cual puso en evidencia su función crítica en la regulación de la tolerancia inmunológica (4). Esa subpoblación celular se caracterizó por la expresión constitutiva de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25) (5) y desde entonces se conocen como células T reguladoras naturales CD4⁺/CD25^{alto} (Treg naturales o nTreg). En el humano, la expresión en alta densidad de la molécula CD25 también se ha correlacionado con una actividad reguladora, aunque no de una manera tan restringida como en el modelo de ratón, pues las células T CD4⁺ de memoria efectora y activadas también expresan niveles altos de CD25 (6), lo que representa un obstáculo para la adecuada identificación de las células reguladoras naturales circulantes.

En estudios más recientes se identificó el factor de transcripción FoxP3 (*forkhead box protein 3*) como el principal regulador del desarrollo y la función de las células nTreg (7,8), a la vez que se constituyó en el más importante marcador fenotípico de esta

subpoblación celular (9). Las mutaciones en este gen conducen en el humano a una enfermedad autoinmune fatal conocida como IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), mientras que en los ratones llevan a un trastorno linfoproliferativo conocido como fenotipo *scurfy* (10); los LT CD4⁺ provenientes de ratones con esta mutación presentan una disminución del umbral de activación *in vitro*, y son menos dependientes de la coestimulación.

Las bases moleculares de la actividad de FoxP3 aún no están claramente definidas; sin embargo, sus funciones pueden ser mediadas en gran parte por la represión en la transcripción del factor NF-AT, inhibiendo de esta manera la producción de interleucina 2; además, el FoxP3 también puede regular positivamente la expresión de otras moléculas asociadas con la función supresora (11). Una de las pruebas más importantes para asociar la expresión y la función de FoxP3 con la actividad reguladora de las células nTreg es que la expresión ectópica de FoxP3 en células T CD4⁺/CD25⁻ las transforma en células Treg funcionales (12).

En la actualidad, se sabe que las células nTreg CD4⁺/CD25^{alto}/FoxP3⁺ se originan durante el proceso normal de maduración de los linfocitos T en el timo y que constituyen, aproximadamente, entre el 5% y el 10% de las células T CD4⁺ de sangre periférica. A diferencia de lo observado para los linfocitos T efectoras convencionales, la selección tímica de las nTreg requiere interacciones de mayor avidéz entre su TCR y el complejo péptido/CMH expresado en las células del estroma del timo; además, las células nTreg son dependientes de la vía de señalización del receptor de la IL-2 para su desarrollo, expansión y función en la periferia.

Las células nTreg deben diferenciarse de los linfocitos Treg inducidos (iTreg, CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺), que se generan por estimulación policlonal (con anticuerpos contra CD3 y CD28) o específica de antígeno a partir de los linfocitos T CD4⁺/CD25⁻/FoxP3⁻ (13,14). Aunque las células nTreg y las iTreg parecen tener la misma función y fenotipo, tanto su origen como el nivel y duración de la expresión de FoxP3 es diferente; en el caso de las iTreg, la expresión de este factor es transitoria y de menor intensidad.

Pese a que sigue existiendo un gran interés en encontrar otras moléculas de superficie celular que sean específica y exclusivamente expresadas por las células nTreg FoxP3⁺, hasta la fecha tal molécula no ha podido ser identificada.

Recientemente se describió que la expresión del factor de transcripción Helios, de la familia de Izaros, puede ayudar a la discriminación entre células nTreg y las iTreg, ya que su expresión está confinada a la población de nTreg derivadas del timo, además del hecho de que este factor es blanco de FoxP3 (15). Sin embargo, se debe tener en cuenta que los estudios de la expresión del factor Helios en las nTreg apenas se están iniciando, y los hallazgos que han aparecido recientemente se deben analizar con mesura pues, al igual que lo sucedido con otras moléculas que se han propuesto para la caracterización de las nTreg, no se puede descartar que la expresión de Helios también se encuentre en otras subpoblaciones de linfocitos o esté condicionada por factores particulares diferentes a la regulación de la respuesta inmune, como la activación.

Más recientemente se ha propuesto un método diferente para caracterizar en forma específica estas células; se basa en el análisis del patrón de metilación de una región del gen que codifica para FoxP3 (región TSDR, *TReg-cell-specific demethylated region*). En las células nTreg, pero no en las iTreg la región TSDR del gen FoxP3 se encuentra desmetilada, lo que permite diferenciar estas dos subpoblaciones, a través de una reacción de PCR en tiempo real o por otros métodos de análisis de ADN (16).

Caracterización de las nTreg por citometría de flujo

Como sucede para otras líneas celulares, la citometría de flujo puede ser una herramienta muy valiosa a la hora de estudiar y caracterizar las células nTreg, con dos objetivos principales:

- i. determinar su frecuencia y características fenotípicas (expresión de moléculas intracelulares y en la superficie) en preparados de muestras derivadas de sangre periférica o tejidos, tanto en condiciones basales como luego de la manipulación *ex vivo*, y
- ii. separarlas para su análisis funcional.

La expresión de alta densidad de CD25 por las células T CD4⁺ (LT CD4⁺/CD25^{alto}) fue la característica originalmente utilizada para la identificación fenotípica de las nTreg (figuras 1A y 1B); sin embargo, el hecho que CD25 está también expresado en alta densidad en la superficie de las células efectoras activadas luego de una respuesta inmune, hace que esta combinación de marcadores sobreestime la frecuencia de las células

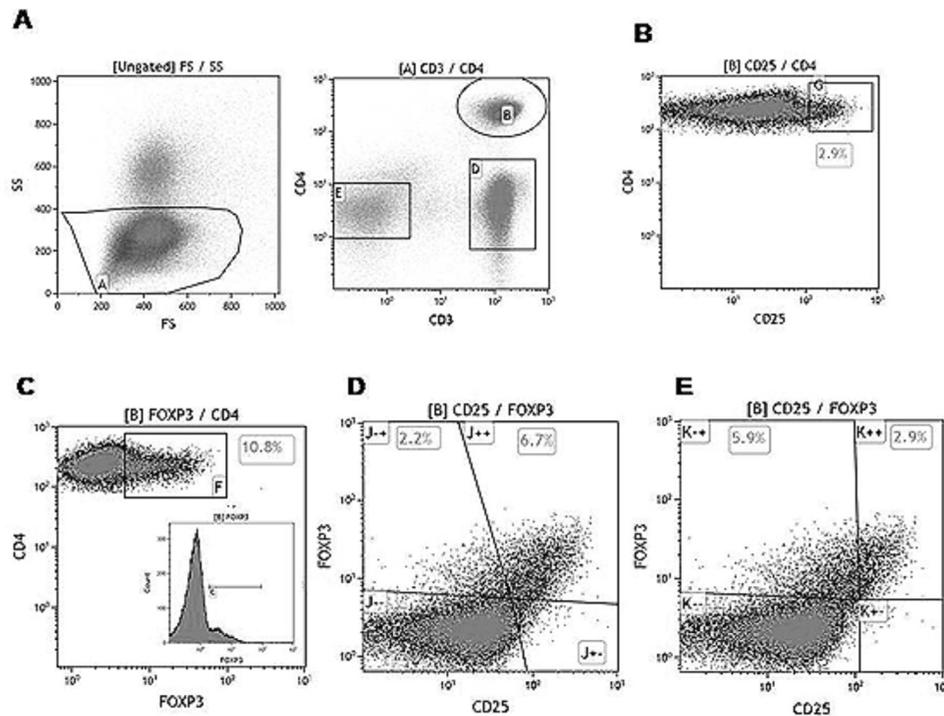


Figura 1. Paneles representativos de la identificación de células nTreg a partir de células mononucleares de sangre periférica de adultos sanos, aisladas por gradientes de densidad (Ficoll), con base en la expresión de CD3, CD4, CD25 y FoxP3 determinada por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales contra estas moléculas (CD3-PECY7, CD4-Pacific blue, CD25-PECY5, FoxP3-FITC). La adquisición se realizó en un citómetro FACSCANTO II (Becton Dickinson); para los análisis se utilizó el software Kaluza (Beckman Coulter).

A) Selección de LT CD4⁺ en la región de los linfocitos. **B)** Porcentaje de células T CD4⁺/CD25^{alto}. **C)** Porcentaje de células T CD4⁺/FoxP3⁺ e histograma de la expresión de FoxP3. **D)** Porcentaje de células T CD4⁺/CD25^{total}/FoxP3⁺ (que expresan CD25, así sea en diferentes niveles de intensidad). **E)** Porcentaje de células T CD4⁺/CD25^{alto}/FoxP3⁺; como se puede observar al comparar las figuras D y E, hay un porcentaje apreciable de células T reguladoras con un fenotipo FoxP3⁺/CD25^{bajo}.

nTreg en algunas circunstancias (17). Además, el hecho de que la expresión de esta molécula se encuentre disminuida en células nTreg que han experimentado expansión *in vivo*, hace que esta forma de identificación sea poco apropiada.

Posteriormente, se propuso adicionar la detección de la expresión intracelular de la proteína FoxP3, para incrementar la especificidad al evaluar la frecuencia y el fenotipo de las células nTreg (LT CD4⁺/CD25^{alto}/FoxP3⁺; figuras 1C, D y E). Sin embargo, se observó que la molécula FoxP3 también se podía expresar transitoriamente en un pequeño porcentaje de células T CD4⁺ efectoras activadas humanas (iTreg) (14), haciendo más complejo el análisis preciso de las nTreg al usar para su identificación la detección combinada de los marcadores CD4, CD25 y FoxP3 en humanos. Además, la ventaja de especificidad conferida por el uso de anticuerpos contra FoxP3 tiene otra limitación debido a que la detección de este factor de transcripción requiere de la permeabilización

celular, lo que imposibilita el uso posterior de las células nTreg, identificadas de esta manera, para estudios funcionales.

Por lo anterior, se propuso utilizar en forma alternativa la detección de la molécula de superficie CD127 (cadena alfa del receptor de la IL-7), en combinación con anticuerpos contra CD4 y CD25 o FoxP3, para estudiar las células nTreg (figura 2) (18). La detección de los LT CD4⁺/CD25^{total}/CD127^{bajo} (figura 2A) permite, además, la separación específica por citometría de flujo, de células nTreg viables que se pueden utilizar en estudios funcionales. A favor de este método, se ha demostrado que la ausencia o baja expresión de CD127 en los LT CD4⁺ se correlaciona muy bien con la expresión de FoxP3 y con la actividad inmunorreguladora (19).

Otra alternativa de estudio es la identificación de las células nTreg como LT CD4⁺/FoxP3⁺/CD127^{bajo} (figura 2B); como se anotó anteriormente, esta estrategia requiere de la permeabilización celular

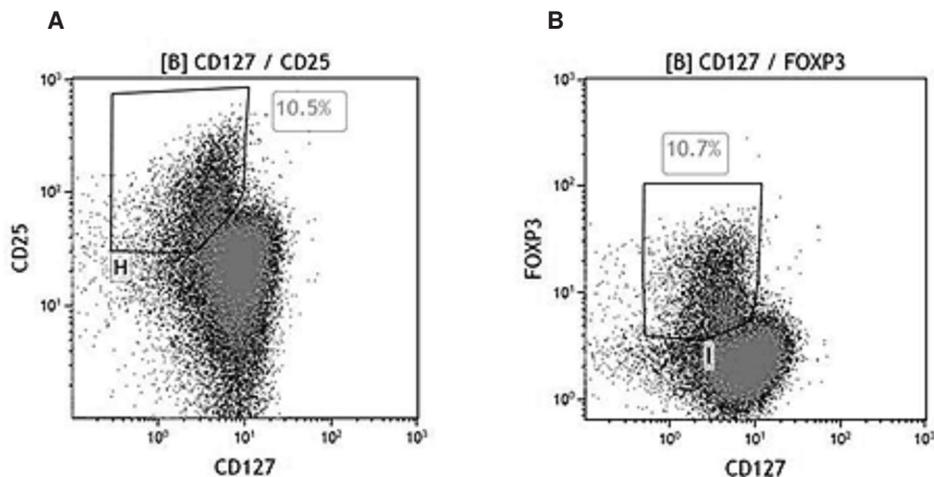


Figura 2. Paneles representativos de la identificación de células nTreg en células mononucleares de sangre periférica de adultos sanos, aisladas por gradientes de densidad (Ficoll), con base en la expresión de CD3, CD4, CD127 y CD25 o FoxP3, determinada por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales contra estas moléculas (CD3-PECY7, CD4-Pacific blue, CD127-PE, CD25-PECY5, FoxP3-FITC). La adquisición se realizó en un citómetro FACSCANTO II (Becton Dickinson); para los análisis se utilizó el software Kaluza (Beckman Coulter).

A) Porcentaje de células T $CD4^+/CD25^{alto}/CD127^{bajo}$, determinada en las células T $CD4^+$ obtenidas de la región de los linfocitos totales; **B)** Porcentaje de células T $CD4^+/FoxP3^+/CD127^{bajo}$, determinada en las células T $CD4^+$ obtenidas de la región de los linfocitos totales.

para detectar FoxP3, descartando la posibilidad de obtener células nTreg para realizar estudios funcionales. Algunos estudios han señalado la presencia de una pequeña subpoblación de células T FoxP3⁺ que expresan en mayor densidad la molécula CD127; no se sabe todavía si estas últimas células corresponden a células nTreg o a células T activadas con expresión transitoria de FoxP3.

Además de ser útil para identificar y purificar las células nTreg, la citometría de flujo también permite caracterizar la expresión de marcadores intracelulares y de superficie, asociados con el estado de maduración y la actividad funcional de las células nTreg (20-22). En general, la mayoría de las nTreg del humano adulto exhiben un fenotipo de células de memoria/activadas definido por la expresión de la molécula CD45RO, de la integrina $\alpha 4\beta_1$ (ligando de la molécula VCAM-1), y de las moléculas OX40 y HLA-DR, todas en una proporción mayor que la observada en las células T efectoras (3,6). No obstante, una pequeña proporción de las células nTreg también pueden tener un fenotipo de células vírgenes, aunque con similar actividad supresora, caracterizado por la expresión de CD45RA, CD62L, CCR7 y de CD27 (la cual se mantiene en las nTreg inclusive después de su activación) (6,20).

Además de la presencia de estos marcadores, las nTreg también expresan otras moléculas de las

cuales algunas están asociadas con su actividad funcional reguladora; entre éstas se encuentra la expresión en la membrana citoplasmática de las moléculas CTLA-4, TGF- β , PD-1, CD103 (cadena alfa de la cadherina E), y de una proteína perteneciente a la familia del receptor de TNF inducida por glucocorticoides (denominada GITR), entre otras (22,23). En los humanos, las células nTreg activadas también expresan preferencialmente la granzima A (la figura 3B muestra la expresión de algunos de estos marcadores en la población de células T $CD4^+FoxP3^+$).

Con base en la expresión de estos diferentes marcadores, se puede decir que existen subpoblaciones de células nTreg con fenotipo y función distinta (3); así, la subpoblación de nTreg que exhibe la mayor actividad supresora es aquella que expresa las moléculas CD103, CD62L y HLA-DR. Además, la expresión de altos niveles de GITR en las nTreg se ha asociado con la resistencia de ellas a la apoptosis inducida por señales derivadas desde su TCR.

Papel de la citometría de flujo en la valoración funcional de las nTreg

Para la evaluación funcional de las células nTreg, inicialmente se utilizó la separación por medios magnéticos de las células mononucleares o los linfocitos T $CD4^+$ purificados que fueran $CD25^+$.

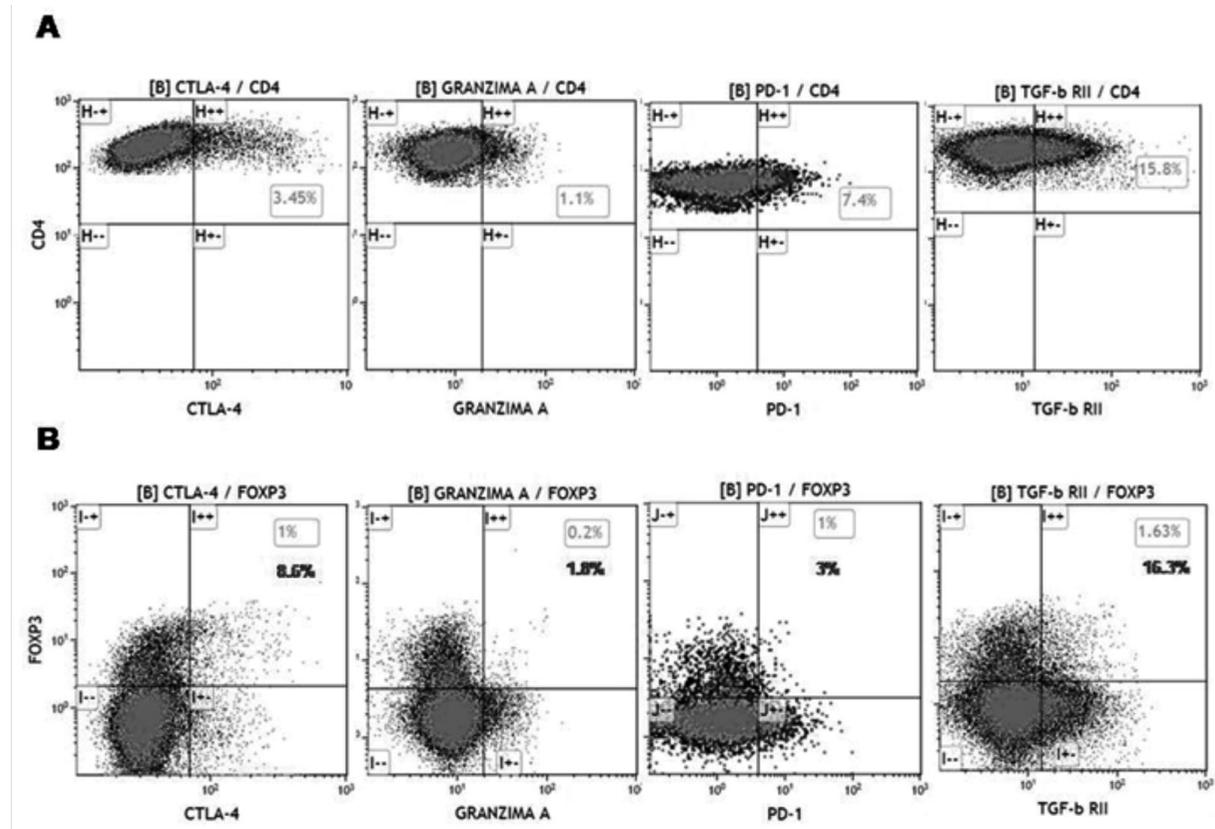


Figura 3. Paneles representativos de la expresión de marcadores fenotípicos de las células nTreg, evaluados en la región de los LT CD4⁺ (desde mononucleares de sangre periférica de adultos sanos, aisladas por gradientes de densidad). Esta expresión fue determinada por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales contra estas moléculas (CD3-PECY7, CD4-Pacific blue, CD25-PECY5, FoxP3-FITC, CTLA4-PE, Granzima A-PE, PD-1-PE, TGF-bRII-PE). La adquisición se realizó en un citómetro FACSCANTO II (Becton Dickinson); para los análisis se utilizó el software Kaluza (Beckman Coulter).

A) Porcentaje de células T CD4⁺ totales que expresan CTLA-4, Granzima A, PD-1 y TGF-bRII. **B)** Porcentaje de células T CD4⁺ que co-expresan FoxP3 y CTLA-4, Granzima A, PD-1, TGF-bRII; entre paréntesis aparece el porcentaje de células FoxP3⁺ que son positivas para cada molécula. Como se observa en la figura, no todas las células FOXP3⁺ expresan estas moléculas, las cuales se han asociado no solo con el fenotipo sino con su actividad funcional; esto indica que pueden existir una diversidad de subpoblaciones dentro de las células nTreg.

Sin embargo, teniendo en cuenta los problemas previamente descritos, actualmente se promueve la separación por citometría de flujo de las células T CD4⁺ /CD25^{alto}/CD127^{bajo} para obtener una población más pura de nTreg que se pueda utilizar para estudios funcionales.

Una vez purificadas, la actividad inmunorreguladora se evalúa midiendo el efecto que tienen las células nTreg sobre la actividad funcional de las células CD25⁻. Entre las técnicas que se utilizan para medir la actividad inmunorreguladora se destacan las siguientes:

i. cultivo simultáneo de las células nTreg con otras células mononucleares estimuladas con mitógenos o antígenos;

ii. bloqueo de la actividad del TGF-β mediante anticuerpos monoclonales contra esta citocina o utilizando el LAP recombinante; el LAP en condiciones naturales se une y bloquea a TGF-β;

iii. impedir las señales inhibitorias de superficie mediante anticuerpos monoclonales que bloqueen la molécula CTLA-4, y

iv. utilizando RNA de interferencia (iRNA) para neutralizar los transcritos del gen FoxP3 e impedir la expresión de este factor de transcripción.

En todas estas aproximaciones experimentales, después de terminar el período de incubación con las células efectoras, se puede utilizar la citometría

de flujo para evaluar el resultado de la actividad reguladora analizando la proliferación celular (dilución de CFSE), la expresión de moléculas de superficie y la producción de citocinas.

Conclusiones

La citometría de flujo constituye una herramienta muy productiva a la hora de determinar la frecuencia, el fenotipo y la actividad funcional de las células nTreg, tanto en sangre periférica total y en células mononucleares de sangre periférica, como en células obtenidas a partir de muestras de tejidos.

Con la disponibilidad de anticuerpos contra FoxP3 y contra CD127, se ha mejorado la especificidad de las células nTreg caracterizadas por citometría; sin embargo, persisten limitaciones importantes como el hecho de que no existe una molécula que sea expresada en forma exclusiva por esta subpoblación celular y la limitación técnica de la necesidad de permeabilizar las células para la detección de la molécula FoxP3.

El hallazgo de opciones novedosas, como las estrategias de silenciamiento de la expresión génica utilizando ARN de interferencia contra FoxP3 u otras moléculas relacionadas con la función inmunorreguladora, así como el estudio de la metilación del gen FoxP3, continúan en la agenda de los investigadores y, muy probablemente, permitirán refinar aún más la caracterización fenotípica y funcional de esta interesante subpoblación de linfocitos T CD4⁺.

Declaración de conflictos de interés

Los autores manifiestan que no se presentaron conflictos de interés durante el desarrollo de esta revisión.

Fuentes de financiación

Esta revisión fue realizada en el marco de un proyecto de investigación financiado por Colciencias (Proyecto 111540820490-1).

Referencias

1. **Belkaid Y.** Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev.* 2007;7:875-88.
2. **Belkaid Y, Tarbell K.** Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Ann Rev Immunol.* 2009;27:551-89.
3. **Shevach EM.** From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.* 2006;25:195-201.
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. **Aandahl EM, Michaelsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF.** Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol.* 2004;78:2454-9.
6. **Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, et al.** Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life. *Blood.* 2006;107:2830-8.
7. **Hori S, Nomura T, Sakaguchi S.** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-61.
8. **Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al.** Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Internat Immunol.* 2004;16:1643-56.
9. **Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL, et al.** Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol.* 2005;35:1681-91.
10. **Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al.** X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001; 27:18-20.
11. **Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al.** Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2004;4:1206-12.
12. **Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos 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;198:1875-86.
13. **Wohlfert E, Belkaid Y.** Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections. *J Clin Immunol.* 2008;28:707-15.
14. **Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, van Landeghen M, Buckner JH, et al.** Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest.* 2003;112:1437-43.
15. **Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al.** Expression of helios, an ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol.* 2010;24 (on line).
16. **Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, et al.** Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res.* 2009;69:599-608.
17. **Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, Rossi P, Manavalan JS, Kim-Schulze S, et al.** Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and antigen specific CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T suppressor cells. *Hum Immunol.* 2004;65:1297-306.
18. **Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al.** Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203:1693-700.

19. **Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al.** CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
20. **Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, Suri-Payer E.** Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology*. 2002;106:190-9.
21. **Fehervari Z, Sakaguchi S.** CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* 2004;114:1209-17.
22. **Gavin M, Rudensky A.** Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr Opin Immunol* 2003;15:690-6.
23. **Nakamura K, Kitani A, Strober W.** Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 2001;194:629-44.