

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>

[http://dx.doi.org/10.5209/rev\\_RCCV.2011.v5.n2.37330](http://dx.doi.org/10.5209/rev_RCCV.2011.v5.n2.37330)



*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2011 5(2):49-64*

**ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LAS ALTERACIONES FENOTÍPICAS DE LAS  
CÉLULAS TREG CAUSADAS POR LA INFECCIÓN VIH EN PACIENTES  
ADULTOS INFECTADOS**

**A PRELIMINARY STUDY ABOUT TREG CELLS PHENOTYPIC ALTERATION  
CAUSED BY HIV INFECTION IN ADULT PATIENTS**

**Jaramillo-Ruiz LD; Muñoz-Fernández, M<sup>a</sup>A y Correa-Rocha R.\***

Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular. Hospital Universitario Gregorio Marañón.

Madrid, España.

Correspondencia del autor: [rcorrear.hgugm@salud.madrid.org](mailto:rcorrear.hgugm@salud.madrid.org)

**RESUMEN**

Las células T reguladoras son una subpoblación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de gran importancia en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia y la homeostasis del sistema inmune. Muchos estudios han analizado la frecuencia de las Treg en pacientes infectados por VIH. Sin embargo, los resultados no son concluyentes y existe una gran controversia sobre el papel que juegan las Treg en el curso de la infección. Recientemente se ha demostrado que el VIH puede infectar las células Treg. Trabajos previos de nuestro grupo demuestran que las Treg son susceptibles de infección por el VIH disminuyendo la expresión del Foxp3 en las células infectadas. Este fenómeno produce una alteración en la capacidad supresora de las células Treg. El objetivo de éste estudio es corroborar dicho comportamiento *in vivo* y determinar el fenotipo de las Treg en pacientes infectados por VIH. Los resultados preliminares indican que efectivamente la frecuencia de células Foxp3<sup>+</sup> es inferior en los pacientes infectados por VIH que en los individuos sanos. El estudio sigue en curso para recopilar un número suficiente de muestras que permitan confirmar estos resultados. Este estudio permitirá conocer mejor el papel de las Treg en el curso de la infección por VIH.

**Palabras clave:** Células T reguladoras, VIH, Foxp3 y células Th-17

## SUMMARY

Regulatory T cells (Treg) are a subpopulation of CD4<sup>+</sup> T cells that play a crucial role in establishing and maintaining self-tolerance and immune homeostasis. Many studies have explored the frequency of Treg in HIV infected patients. However, there are controversial findings about the role of these cells in the HIV infection. Nowadays, different studies have showed that Treg cells are susceptible to the HIV infection. Our *in vitro* data has showed that HIV infects Treg and produces a downregulation of Foxp3 expression. This phenomenon also leads Treg cells to a loss of their immune suppressive capacity. The aim of this study is to corroborate if this behavior also occurs *in vivo* and determine the Treg phenotype in HIV-infected patients. Preliminary results indicate that frequency of Foxp3<sup>+</sup> cells is lower in HIV-infected patients than in healthy volunteers. At present, we are recovering enough number of samples to confirm these results. A better understanding of these cells could serve for the effective exploitation of their suppressive functions for clinical benefit.

**Keywords:** T regulatory cell, HIV, Foxp3, Th17 cells

## INTRODUCCIÓN

Las células T reguladoras (Treg) son una subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Tienen la capacidad de controlar la activación y la función de otras poblaciones celulares pertenecientes al sistema inmune (SI), y su función es clave para el mantenimiento de la homeostasis del SI (Fehervari and Kiyono, 2008; Sakaguchi et al., 2010; Zorn et al., 2006)

El término de células reguladoras se estableció en el año 1990, debido a los estudios funcionales *in vivo* realizados por Sakaguchi y colaboradores en ratones timectomizados de 13 días, en los cuales se determinó que la tiroiditis autoinmune que padecían se debía a la ausencia de una población especial de linfocitos T, los cuales conferían tolerancia a los antígenos propios producidos por los ratones (Sakaguchi et al., 1995). Las células Treg, se encuentran clasificadas en dos: Las Treg naturales que se originan directamente en el timo y las células Treg inducidas o adaptativas las cuales son generadas bajo estímulo antigénico fuera del timo (Fehervari and Kiyono, 2008).

Este estudio centra su interés en la respuesta de las células Treg naturales, caracterizadas por ser CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, y corresponden aproximadamente al 5% de la población total de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y además, poseen un marcador especial conocido como Foxp3 (*siglas en inglés forkhead box protein 3*) y se expresa tanto en su fase activa como en reposo

el cual, codifica para una proteína llamada escurfina la cual confiere a las Treg la capacidad supresora (Yagi et al., 2004). Por lo tanto, su deficiencia genera la mala regulación del sistema inmune. Las Treg han sido estudiadas ampliamente en el control de efectos deletéreos causados por la respuesta inmune excesiva, como por ejemplo las alergias, procesos infecciosos, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes de órganos y tejidos; así como también, en el desarrollo de enfermedades como el cáncer

El papel que juegan las Treg en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) aún es controvertido. Por un lado, las Treg regulan la homeostasis del sistema inmune y limitan los fenómenos de hiperactivación del SI reduciendo la respuesta inflamatoria, y por otro, algunos estudios sugieren que las Treg también inhiben la respuesta antiviral específica y pueden acelerar la progresión de la infección a SIDA en los pacientes infectados (Kanwar et al., 2010). Un estudio previo *in vitro* realizado en nuestro grupo de investigación (datos no publicados) demuestra que el VIH es capaz de infectar a las células reguladoras. Además, se observa una disminución importante en los niveles de expresión del Foxp3 comparado con los niveles expresados en las células no infectadas. Posiblemente, la pérdida de expresión de Foxp3 y de la capacidad supresora de las Treg podría favorecer la hiperactivación del SI y una mayor respuesta inflamatoria en los pacientes infectados por VIH.

En este contexto, el objetivo del presente estudio es comprobar si los efectos observados en el estudio *in vitro* también pueden observarse en un estudio *in vivo*, de esta manera establecer el papel que juegan las Treg en la infección por VIH.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

Fueron realizadas distintas pruebas para la identificación adecuada de las poblaciones inmunitarias Treg y Th17. Para ello, se implementaron las técnicas de marcaje celular, primero realizadas en sangre total y posteriormente en PBMC (*siglas en inglés: peripheral blood mononuclear cell*), las técnicas y resultados son presentados en este estudio.

### **Muestras de estudio**

Se pretende incluir en el estudio 30 pacientes infectados con el VIH provenientes del Hospital Universitario Virgen del Rocío en Sevilla. También serán incluidos un total de 15

individuos sanos no infectados como grupo control. Hasta el momento han sido enrolados 12 pacientes seropositivos y 13 controles. Todas las muestras se procesaron en el BioBanco VIH del HGUGM dentro de las 24h siguientes a su extracción.

## **Procesamiento de muestras**

### **Obtención de *PBMC*: Técnica de Ficoll-Hypaque**

La sangre fue diluida 1:1 con PBS, y se procedió a la separación de células mononucleares de sangre periférica *PBMC* mediante gradiente de ficoll-hypaque en proporción con la sangre de 1:3 evitando alterar la interfase, de modo que la sangre quedó suspendida sobre la superficie del ficoll. Luego, se centrifugó a 1800 rpm por 30min. El halo de linfocitos que se encontraba entre el plasma y el ficoll-hypaque fue extraído. Las células fueron lavadas dos veces con PBS a 1500 rpm durante 10 min y finalmente, se dejaron en 2ml de medio RPMI 1640 suplementado con fitohemaglutinina al 1%, para ser usadas en el marcaje de las poblaciones Treg y Th17.

### **Análisis de las sub-poblaciones inmunes: linfocitos T, B, NK, naïve, activación y memoria.**

El marcaje de las poblaciones de células inmunes T, B y NK, se realizó añadiendo 50 µl de sangre total a cada uno de los paneles de citometría. Los anticuerpos utilizados para el panel TBNK1 fueron: CD45 (FITC), CD4 (PE), CD19 (ECD), CD3 (PC5), CD8 (PC7) y TBNK2: CD14 (FITC), CD56 (PE), CD45 (ECD), CD16 (PC5), CD3 (PC7). Las células naïve: CD4 (FITC), CD31 (PE), CD45-RA (ECD), CD27 (PC5), CD8 (PC7) y las células de activación y memoria: CD38 (FITC), HLA-DR (PE), CD45-RO (ECD), CD8 (PC5), CD4 (PC7). Finalmente, las muestras se incubaron por 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se llevaron a lisis en el Coulter TQ-prep, y se analizaron en el citómetro Cytomics FC500-Beckman Coulter.

### **Producción de citoquinas**

Se cultivaron  $1 \times 10^6$  células para la estimulación y producción de citoquinas durante 5 horas. Las células obtenidas se resuspendieron en medio R5 suplementado con 1ml de suero AB, la activación se realizó añadiendo 2ul de ionomicina (Sigma), diluida 1/10 para una concentración final de 1uM, y 2ul de PMA (Sigma) diluido 1/50 para una concentración final de 50ng/ml, las células se incubaron a 37° C en una placa (p24) durante una hora. Posteriormente, se añadió 7ul de BD Golg iPlug (e-Bioscience), diluido 1/10 para una concentración final de 1.0ug/ml, y se incubó a 37°C durante 4 horas,

### **Identificación de las poblaciones Th17 y Treg mediante citometría de flujo**

Después de la activación de las células se procedió a la identificación de las poblaciones celulares Th17 y Treg, realizando un marcaje intracelular mediante una fijación previa y permeabilización de las células. Las células Th17 se identificaron con los anticuerpos: IL-17A (FITC), CCR6 (PE), CD45-RA (ECD), CD4 (PC5), CCR4 (PC7), RORYT (APC), IFN $\gamma$  (PB). Las células Treg se identificaron con CD4 (FITC), Foxp3 (PE), CD45-RA (ECD), CD25 (PC7), y HLA-DR (PB). Posteriormente las células se analizaron en un citómetro Gallios (Beckman Coulter).

## **RESULTADOS**

### **Identificación de las poblaciones inmunes: linfocitos T, B, NK, naïve, activación y memoria.**

Conocer el estado inmunológico de los pacientes participantes en el estudio nos proporciona una amplia información sobre el estado inmunológico de los pacientes a causa de la infección viral. Para ello, se analizaron distintas sub-poblaciones de linfocitos: linfocitos T helper  $CD4^+$ , linfocitos T citotóxicos  $CD8^+$ , linfocitos B y células NK (Figura 1).

Los linfocitos T están definidos por el marcaje de CD3 en membrana y dentro de la población de linfocitos  $CD3^+$  se distinguieron células T helper y células T citotóxicas por la presencia en membrana de CD4 y CD8, respectivamente. En la Figura 2, se observan los datos preliminares obtenidos para el porcentaje y en la Figura 3 el número absoluto de células NK, células B, linfocitos  $CD8^+$  y  $CD4^+$ . En estas figuras puede observarse la diferencia entre los pacientes y el grupo control. Las demás poblaciones incluidas en el estudio (basófilos,

eosinófilos, neutrófilos, monocitos) así como las sub-poblaciones de linfocitos naïve, memoria, efectores y marcadores de activación se irán analizando a lo largo del estudio.

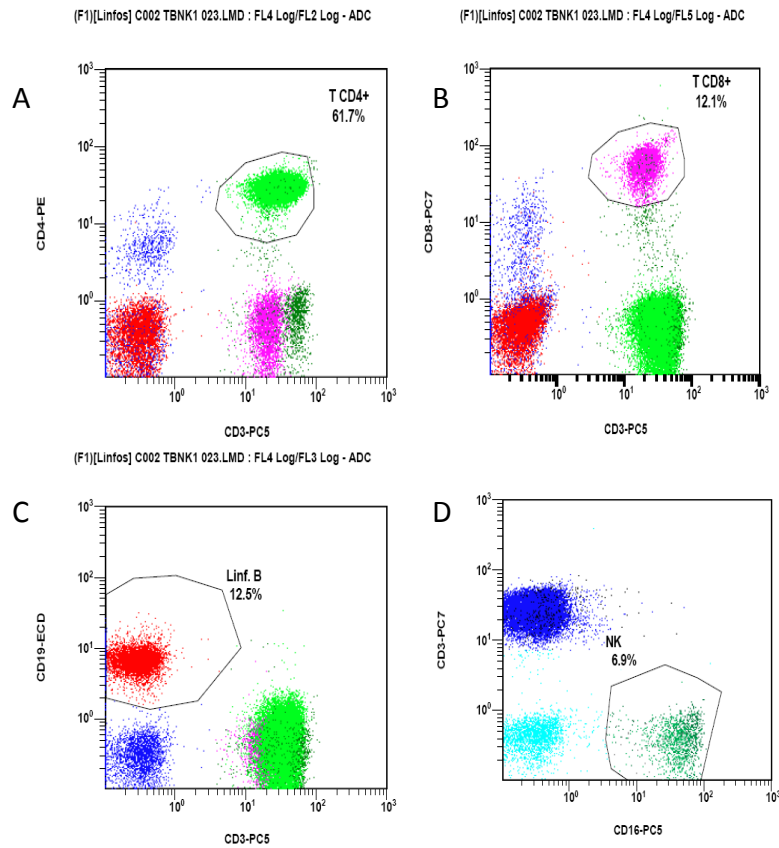


Figura 1. Citometría de flujo (CF) de la obtención de células: a) TCD4+ (CD4+CD3+); b) TCD8+ (CD8+CD3+); c) células B (CD19+CD3-); d) NK (CD3-CD16+). El porcentaje de cada población se observa en cada ventana.

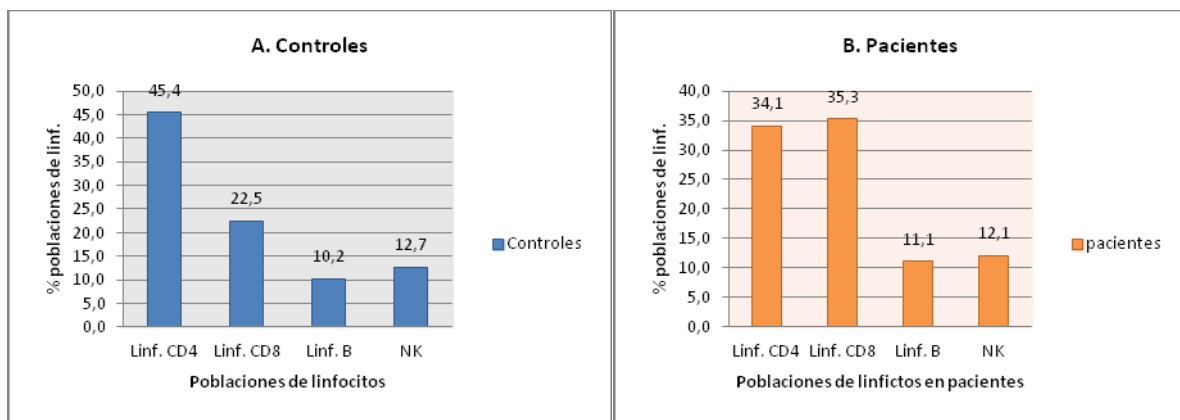


Figura 2. Distribución del porcentaje de las distintas poblaciones de linfocitos (A) en el grupo control y, (B) pacientes.

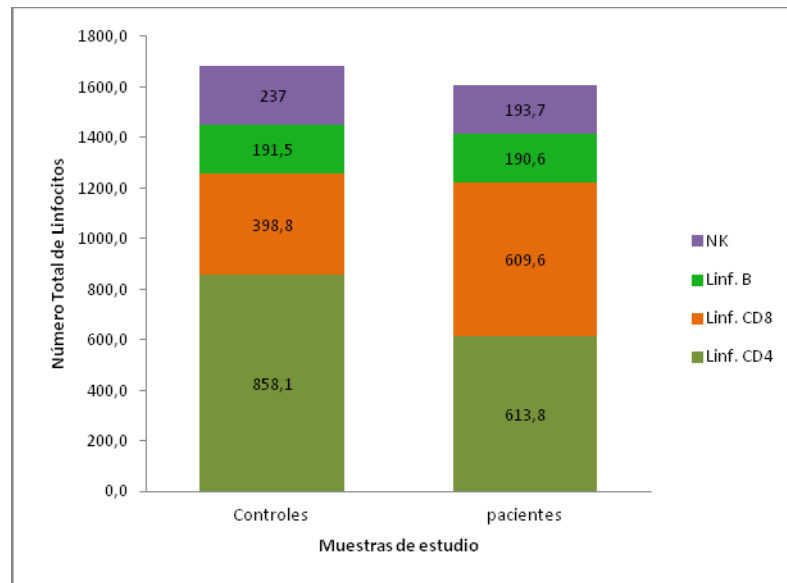


Figura 3. Comparativa de la distribución del número absoluto presentado en el grupo control frente al grupo estudio.

### Población de células Treg

Gran parte del desarrollo de este proyecto requería de la puesta a punto de los paneles de citometría que nos permitieran identificar las poblaciones Treg y las Th17 en las muestras de pacientes e individuos sanos. Las células Treg se pueden identificar mediante distintos marcajes, bien por marcadores de superficie, donde las células  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  definiría la población Treg (Seddiki et al., 2006), o bien por marcadores intracelulares como Foxp3 que además es clave en la función de estas células.

Recientemente se ha descrito que en los pacientes infectados por el VIH el marcaje  $CD4^+CD25^+CD127^{low}$  no se correlaciona con el marcaje Foxp3 y por tanto no valdría para identificar correctamente la población Treg en estos pacientes (Del Pozo-Balado Mdel et al., 2010). Por tanto, para este proyecto se puso a punto el marcaje intracelular de Foxp3 en células T que vendrían definidas por  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ . Además, dentro de la población Foxp3<sup>+</sup> se diferenciaron las células Treg naïve o activadas mediante los marcadores *CD45RA* y *HLA-DR*, (Figura 4).

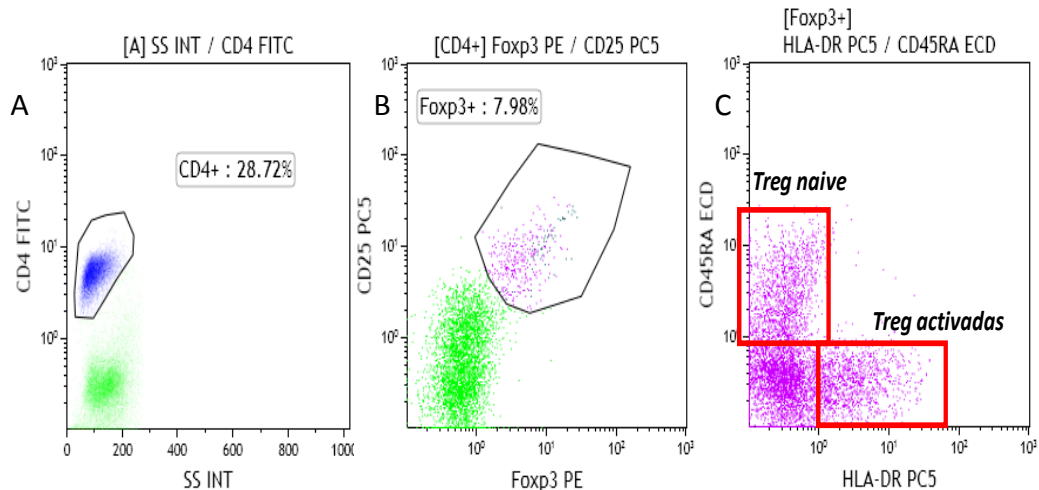


Figura 4. Identificación de las poblaciones celulares Treg A) CD4+CD25+; B) Foxp3+CD25+; C) Treg naïve (CD45RA+HLA-DR-) y Treg activadas (CD45RA-HLA-DR+).

### Expresión del Foxp3

Los datos obtenidos hasta el momento, nos indican que el porcentaje de expresión del Foxp3 de las Treg en pacientes infectados por VIH es menor que en el grupo control. No obstante, esta comparación es preliminar ya que, aún falta completar el tamaño de muestra propuesto para el estudio y así poder obtener datos más concluyentes (Figura 5).

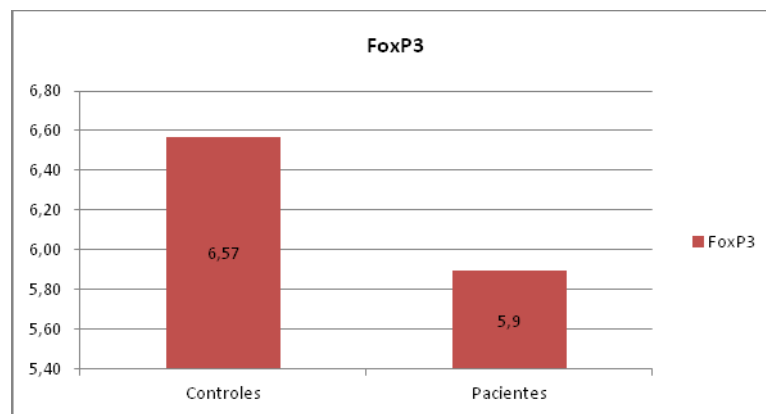


Figura 5. Niveles de expresión del Foxp3 de la población estudio frente al grupo control.

En la actualidad se siguen procesando las muestras a medida que van llegando al laboratorio para realizar el estudio de células Th17 y Treg. Además de los datos de citometría se están almacenando muestras de plasma para la determinación de citoquinas plasmáticas, y muestras de ARN para los estudios de expresión génica. Sin embargo, estas muestras no se



procesarán hasta completar el estudio para poder analizar todas las muestras en paralelo y evitar las diferencias inter-ensayo que puedan darse.

### Población de células Th17

Las células Th17 están implicadas en respuestas inflamatorias y activación, por lo que podrían jugar un papel clave en la infección por el VIH donde la activación inmune e inflamación favorece la destrucción de células inmunes así como la progresión de la enfermedad. Además existe un delicado equilibrio entre la población Treg y Th17, ya que las células Treg pueden suprimir las respuestas Th17, y las citoquinas inflamatorias producidas por Th17 puede inhibir la diferenciación de células Treg (Kanwar et al., 2010).

Las poblaciones de células Th17 fueron identificadas como: CD4+ CCR6+ CCR4+. Además, se verificó la presencia intracelular de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-17A (Figura 6). Se realizaron distintas pruebas para obtener las condiciones óptimas, en un principio, se probó el marcaje celular en sangre total pero los resultados obtenidos no fueron los esperados; tal y como se muestra en la (Figura 6B). La activación era deficiente y no se observaba apenas producción de IFN- $\gamma$  o IL-17. Sin embargo, usando PBMC purificadas y un protocolo de activación de 5 horas con ionomycina y PMA se consiguieron valores marcados de ambas citoquinas (Figura 6C).

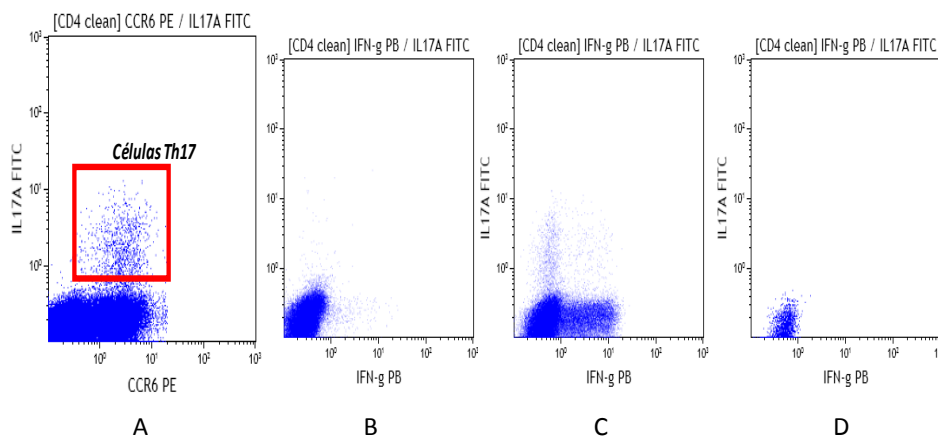


Figura 6. Identificación de las poblaciones Th-17 A) células Th-17 (IL-17A+CCR6+); B) Análisis de citoquinas en sangre total; C) Análisis de citoquinas en PBLs activadas (5 horas) y D) Ausencia de citoquinas en células NO activadas (control negativo).

## DISCUSIÓN

Las reacciones de hiperactivación crónica celular son una de las consecuencias que más sufren los pacientes con VIH, este hecho se atribuye a que existe una mayor proporción de linfocitos T activados, y sugiere que probablemente haya un número reducido de Treg en estos pacientes lo que puede estar influenciando negativamente en el equilibrio del SI, y desarrollando una hiperactivación crónica celular que termina con el desgaste del SI (Temesgen and Beri, 2004).

Estudios previos han mostrado que las células Treg son un objetivo potencial de la infección por el VIH *in vitro* (Moreno-Fernandez et al., 2009; Oswald-Richter et al., 2004). Sin embargo, el papel exacto de las Treg en el curso de la infección por VIH aún se desconoce, debido a que no existen datos consistentes sobre la determinación de los subtipos de células Treg y la frecuencia en pacientes infectados.

Por un lado, diversos estudios indican que los pacientes infectados por VIH presentan unos valores elevados de Treg que estarían inhibiendo las respuestas específicas frente al VIH, limitando el control de la infección por el sistema inmune (Bi et al., 2009; Epple et al., 2006; Nilsson et al., 2006; Suchard et al., 2010). Por otro lado, diversos estudios indican que las Treg se encuentran disminuidas en pacientes infectados (Apoil et al., 2005; Brandt et al., 2011; Eggena et al., 2005; Oswald-Richter et al., 2004), lo cual podría comprometer el papel homeostático que juegan estas células favoreciendo la hiperactivación generalizada del SI y la progresión de la enfermedad asociada a el mayor daño tisular y alteraciones inmunes que provoca esta hiperactivación. La discordancia entre los resultados obtenidos por los distintos estudios en el establecimiento de la frecuencia de las Treg presentes durante la infección con el VIH, puede atribuirse a la utilización de los distintos métodos para la cuantificación e identificación de los fenotipos de las poblaciones Treg (Holmes et al., 2008) o también a la distribución de las células Treg en los distintos tejidos y a las diferencias de carga viral existentes en las poblaciones estudio.

Los resultados previos del estudio *in vitro* realizados en nuestro grupo de investigación indican que las células Treg son infectadas por el VIH, esta infección fue confirmada midiendo la presencia de proteína viral p24 en el sobrenadante celular. Por otra parte, los resultados muestran que el Foxp3 disminuye en las células Treg infectadas por el VIH, y dicha pérdida es directamente proporcional a la concentración viral suministrada.

Los resultados preliminares obtenidos en este estudio *in vivo* coinciden con los resultados observados *in vitro*, ya que los pacientes infectados muestran un porcentaje de Treg Foxp3+ inferior al observado en el grupo control. Dentro del grupo VIH, observamos una gran variabilidad en los niveles de expresión del Foxp3 entre los pacientes, esta diferencia entre los niveles de expresión de Foxp3 observados puede estar asociada a la carga viral, y que dependen de las diferencias en la adherencia al tratamiento antirretroviral u otros factores clínicos de los pacientes. Sin embargo, no podemos obtener conclusiones definitivas hasta que no se obtengan datos de la población de estudio completa, y se analicen de forma conjunta todos los posibles factores que afecten a la interacción entre células Treg y la infección por el VIH.

No obstante, estos resultados preliminares aportan datos muy interesantes sobre la influencia del VIH en el fenotipo de las células Treg, y el desarrollo completo de nuestro estudio contribuirá a dar respuestas a las relaciones existentes de los mecanismos de inmunosupresión por parte de las Treg, respuesta inmune, y procesos inflamatorios ante la infección por el VIH. Además, como hemos mencionado anteriormente en este estudio se pretende observar la interacción existente entre las células Treg y Th17. Estudios previos sugieren que existe una relación entre el incremento de células Th-17 y el curso de la infección por VIH. Se ha demostrado que las células Treg Foxp3+ cumplen función anti-inflamatoria y controlan las respuestas de otras células T, incluyendo las células Th1, Th2 y Th17 (Chen et al., 2007; Sakaguchi et al., 2010). Sin embargo, este papel de las Treg Foxp3+ en las fases de la infección por VIH aún no está esclarecido.

En este contexto, hay dos posibles mecanismos que pueden estar ocurriendo en la infección por el VIH, por ejemplo, es posible que las Treg disminuyan la activación crónica inmune, por consiguiente el progreso de la enfermedad sea más lento (Kinter et al., 2004). Contrario a esta hipótesis, las Treg podrían inhibir las respuestas inmunes antivirales, por consiguiente, el progreso de la enfermedad se aceleraría (Nilsson et al., 2006). El desconocimiento sobre el verdadero mecanismo se debe principalmente a la falta de una correcta identificación de las poblaciones Treg y de su función supresora *in vivo*. Basado en esto, si nuestra hipótesis se cumple, entonces es probable que exista un incremento de las células Th-17 por la disminución de la función supresora de las células Treg Foxp3+ (Moreno-Fernandez et al., 2009) que aumentarían la activación y la degradación del sistema inmune.

En cuanto a los datos obtenidos tanto para porcentaje como número absoluto de las poblaciones inmunitarias: linfocitos T ( $CD4+$ , y  $CD8+$ ), linfocitos B y NK. El porcentaje de linfocitos T  $CD4+$ , fue muy homogéneo entre los distintos pacientes, esto puede ser debido a que los pacientes incluidos hasta la fecha son pacientes con carga viral indetectable (Epple et al., 2006). Sólo para algunos casos se observan algunos porcentajes mucho menor con respecto a los demás datos obtenidos, que corresponderían a pacientes que responden mal al tratamiento o que se encuentran en fases más avanzadas de la enfermedad.

Aunque los resultados de número absolutos para células CD4 muestren una pequeña diferencia con respecto al grupo control, estos datos aún no pueden ser analizados de forma definitiva, ya que se debe completar el tamaño muestra. De momento sugieren que el número absoluto de  $CD4+$  es menor en los pacientes VIH que en el grupo control salvo en algunos casos donde se observa un número normal o mayor que puede deberse a la eficacia del tratamiento antirretroviral en el control de la carga viral y el mantenimiento de las frecuencias de CD4 en estos pacientes. La pérdida de linfocitos CD4 obedece a la acción directa del virus sobre estas células que constituyen su diana principal y a la desregulación a nivel de citoquinas provocada por la infección, tal y como se ha indicado por otros estudios (Fleury et al., 1998; Kaufmann et al., 1998).

El porcentaje y el número absoluto de linfocitos CD8 en pacientes infectados, es mucho mayor con respecto al grupo control, esto corresponde a lo observado en una infección viral debido a que los CD8 tiene la capacidad de destruir células específicas infectadas por virus. Por lo tanto, el alto porcentaje de TCD8 nos indica la presencia viral en las muestras (Pantaleo et al., 1990; Pantaleo et al., 1994).

Las alteraciones en las poblaciones TCD4 y TCD8 observadas son habituales en pacientes infectados por el VIH como se muestra en diversos estudios. Para el resto de las poblaciones celulares Linfocitos B y NK, observamos una heterogeneidad en los resultados muy posiblemente asociada a los cambios en la respuesta inmunitaria asociados a la desregulación generalizada del sistema inmune por el VIH.

## CONCLUSIONES

La infección por el VIH disminuye la expresión de Foxp3 en las células Treg de los pacientes infectados. Esta disfunción en las células Treg podría correlacionarse con la mayor hiperactivación del sistema inmune en pacientes con mayor progresión de la enfermedad. Por

otro lado, los resultados obtenidos indican que factores como la carga viral, expresión de Foxp3 y análisis de función supresora deben ser tenidos en cuenta en el estudio de Treg en pacientes infectados.

## AGRADECIMIENTOS

A todos los participantes del estudio, al doctor Manuel Leal del Hospital Universitario Virgen del Rocío por su colaboración en la obtención de la población de estudio, Marjorie Pion por la asesoría técnica, y a los integrantes del grupo de investigación de Inmunobiología Molecular del Hospital Universitario Gregorio Marañón por vuestro apoyo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Apoil, P. A., Puissant, B., Roubinet, F., Abbal, M., Massip, P., and Blancher, A.** (2005). FOXP3 mRNA levels are decreased in peripheral blood CD4+ lymphocytes from HIV-positive patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 39(4), 381-5.
- Bi, X., Suzuki, Y., Gatanaga, H., and Oka, S.** (2009). High frequency and proliferation of CD4+ FOXP3+ Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts. *Eur J Immunol* 39(1), 301-9.
- Brandt, L., Benfield, T., Mens, H., Clausen, L. N., Katzenstein, T. L., Fomsgaard, A., and Karlsson, I.** (2011). Low level of regulatory T-cells and maintenance of balance between regulatory T-cells and TH17 cells in HIV-1-infected Elite Controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr*.
- Chen, X., Vodanovic-Jankovic, S., Johnson, B., Keller, M., Komorowski, R., and Drobyski, W. R.** (2007). Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 110(10), 3804-13.
- Del Pozo-Balado Mdel, M., Leal, M., Mendez-Lagares, G., and Pacheco, Y. M.** (2010). CD4(+)CD25(+/-hi)CD127(lo) phenotype does not accurately identify regulatory T cells in all populations of HIV-infected persons. *J Infect Dis* 201(3), 331-5.
- Eggena, M. P., Barugahare, B., Jones, N., Okello, M., Mutalya, S., Kityo, C., Mugenyi, P., and Cao, H.** (2005). Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol* 174(7), 4407-14.

- Epple, H. J., Loddenkemper, C., Kunkel, D., Troger, H., Maul, J., Moos, V., Berg, E., Ullrich, R., Schulzke, J. D., Stein, H., Duchmann, R., Zeitz, M., and Schneider, T.** (2006). Mucosal but not peripheral FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. *Blood* 108(9), 3072-8.
- Fehervari, Z., and Kiyono, H.** (2008). The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends Immunol* 29(11), 503-4.
- Fleury, S., de Boer, R. J., Rizzardi, G. P., Wolthers, K. C., Otto, S. A., Welbon, C. C., Graziosi, C., Knabenhans, C., Soudeyns, H., Bart, P. A., Gallant, S., Corpataux, J. M., Gillet, M., Meylan, P., Schnyder, P., Meuwly, J. Y., Spreen, W., Glauser, M. P., Miedema, F., and Pantaleo, G.** (1998). Limited CD4<sup>+</sup> T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med* 4(7), 794-801.
- Holmes, D., Jiang, Q., Zhang, L., and Su, L.** (2008). Foxp3 and Treg cells in HIV-1 infection and immuno-pathogenesis. *Immunol Res* 41(3), 248-66.
- Kanwar, J., Mohammad, I., Yang, H., Huo, C., Chan, T. H., and Dou, Q. P.** (2010). Computational modeling of the potential interactions of the proteasome beta5 subunit and catechol-O-methyltransferase-resistant EGCG analogs. *Int J Mol Med* 26(2), 209-15.
- Kaufmann, D., Pantaleo, G., Sudre, P., and Telenti, A.** (1998). CD4-cell count in HIV-1-infected individuals remaining viraemic with highly active antiretroviral therapy (HAART). Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 351(9104), 723-4.
- Kinter, A. L., Hennessey, M., Bell, A., Kern, S., Lin, Y., Daucher, M., Planta, M., McGlaughlin, M., Jackson, R., Ziegler, S. F., and Fauci, A. S.** (2004). CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 200(3), 331-43.
- Moreno-Fernandez, M. E., Zapata, W., Blackard, J. T., Franchini, G., and Chougnnet, C. A.** (2009). Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain. *J Virol* 83(24), 12925-33.
- Nilsson, J., Boasso, A., Velilla, P. A., Zhang, R., Vaccari, M., Franchini, G., Shearer, G. M., Andersson, J., and Chougnnet, C.** (2006). HIV-1-driven regulatory T-cell

- accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood* 108(12), 3808-17.
- Oswald-Richter, K., Grill, S. M., Leelawong, M., and Unutmaz, D.** (2004). HIV infection of primary human T cells is determined by tunable thresholds of T cell activation. *Eur J Immunol* 34(6), 1705-14.
- Pantaleo, G., De Maria, A., Koenig, S., Butini, L., Moss, B., Baseler, M., Lane, H. C., and Fauci, A. S.** (1990). CD8<sup>+</sup> T lymphocytes of patients with AIDS maintain normal broad cytolytic function despite the loss of human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(12), 4818-22.
- Pantaleo, G., Demarest, J. F., Soudeyns, H., Graziosi, C., Denis, F., Adelsberger, J. W., Borrow, P., Saag, M. S., Shaw, G. M., Sekaly, R. P., and et al.** (1994). Major expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with a pre-dominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 370(6489), 463-7.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., and Hafler, D. A.** (2010). FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10(7), 490-500.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M.** (1995). 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* 155(3), 1151-64.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., Kelleher, A., and Fazekas de St Groth, B.** (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203(7), 1693-700.
- Suchard, M. S., Mayne, E., Green, V. A., Shalekoff, S., Donninger, S. L., Stevens, W. S., Gray, C. M., and Tiemessen, C. T.** (2010). FOXP3 expression is upregulated in CD4<sup>+</sup>T cells in progressive HIV-1 infection and is a marker of disease severity. *PLoS One* 5(7), e11762.
- Temesgen, Z., and Beri, G.** (2004). HIV and drug allergy. *Immunol Allergy Clin North Am* 24(3), 521-31, viii.
- Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., and Sakaguchi, S.** (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol* 16(11), 1643-56.

**Zorn, E., Nelson, E. A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E., Canning, C., Soiffer, R. J., Frank, D. A., and Ritz, J. (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* 108(5), 1571-9.**