

MODELACIÓN MATEMÁTICA DEL PAPEL DE LA IL-2 EN LADINÁMICA DE LAS CÉLULAS T: ESTUDIO DEL EFECTO DE TRATAMIENTOS MODULADORES DE LA IL-2

Autoría principal: Karina García Martínez¹

Otros autores: Kalet León Monzón y Tania Carmenate Portilla

Centro de Inmunología Molecular (CIM). Calle 216, esq. 15, Atabey, Playa. La Habana 11600, Cuba. Telf. 2143126. Fax. 2720644

¹ Autor de correspondencia. Correo electrónico karina@cim.sld.cu

Karina García Martínez (40%). Trabajó en la fundamentación teórica y formulación del problema, en el diseño y la ejecución de la modelación matemática, así como en la evaluación y discusión de los resultados presentados en este trabajo. Participó en la elaboración y revisión de las publicaciones que avalan el presente trabajo, siendo el primer autor en ambas publicaciones científicas. Ha presentado el trabajo en varios eventos científicos en Cuba y el exterior.

Kalet León Monzón (40%). Líder del proyecto de Muteínas de la IL-2 del CIM. Concibió la hipótesis de este trabajo. Trabajó en la fundamentación teórica y formulación del problema, en el diseño de la modelación matemática, así como en la evaluación y discusión de los resultados presentados en este trabajo. Participó en la elaboración y revisión de las publicaciones que avalan el presente trabajo, siendo co-autor en ambas publicaciones científicas. Ha presentado el trabajo en varios eventos científicos en Cuba y el exterior.

Tania Carmenate Portilla (20%). Participó en las discusiones de los resultados presentados en este trabajo. Trabajó en la escritura de una de las publicaciones que avalan el presente trabajo. Jefa del grupo de Dinámica de la Regulación en el CIM, en el cual se lleva a cabo la validación experimental de las predicciones del modelo relacionadas con las Muteínas de la IL-2.

RESUMEN

Los resultados publicados en la literatura revelan efectos contradictorios, obtenidos al aplicar tratamientos de modulación de la IL-2 en experimentos pre-clínicos y en la clínica. Los mismos muestran como la misma terapia es capaz de promover indistintamente inmunidad o tolerancia, al expandir diferentes poblaciones de células T. En el trabajo que aquí se presenta, se explica esta complejidad en la respuesta a partir del papel dual de la IL-2 en la dinámica de las células T. En este sentido, se conoce que esta citosina es usada tanto para la proliferación y supervivencia tanto de las células T Efectoras CD4+CD25- y CD8+ de Memoria, que median la respuesta inmune, como por las células T Reguladoras Naturales CD4+CD25+Foxp3+ encargadas de inhibir esta respuesta. Para abordar teóricamente esta problemática, se presenta un modelo matemático que describe la dinámica de interacción de la IL-2 con las células T, basado en las evidencias experimentales de la literatura. Utilizando este modelo, se simula el efecto de diferentes terapias moduladoras de IL-2: inyección de IL-2, disminución de la señal por IL-2 usando AcMs anti-IL-2, inyección de inmunocomplejos de IL-2 y AcMs anti-IL-2, e inyección de muteínas de IL-2. Se estudian además las condiciones cualitativas y cuantitativas de dosis y esquema de tratamiento en el cual estas terapias son capaces de potenciar inmunidad o tolerancia. Los resultados obtenidos brindan explicaciones racionales a resultados existentes en pre-clínica y clínica, y proponen nuevos esquemas para optimizar la aplicación futura de estos tratamientos. Por último, se predice que la aplicación de un tratamiento novedoso, utilizando una muteína de IL-2 que tenga una capacidad reducida por unirse a la cadena α del IL-2R, resulta efectiva para inducir inmunidad en un sistema inicialmente tolerante, por ejemplo en escenarios tumorales. Recientemente, esta predicción del modelo se evaluó en experimentos llevados a cabo por nuestro grupo en el CIM, donde se comprobó la eficacia *in vivo* de esta muteína como terapia anti-tumoral.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

La Interleucina-2 (IL-2) fue el primer factor de crecimiento de las células T en ser identificado a nivel molecular (Gillis y cols. 1978) y clonado (Devos y cols. 1983; Taniguchi y cols. 1983). En sus inicios, se identificó como una molécula capaz de promover la proliferación y supervivencia de las células T *in vitro* (Smith 1988), así como de potenciar la inmunidad mediada por las células T en experimentos pre-clínicos (Blattman y cols. 2003; Kudo-Saito y cols. 2007; Lin y cols. 2007). Igualmente, se ha observado que tratamientos de inyección de IL-2 en la clínica han resultado efectivos para potenciar una respuesta inmune originada por vacunas (Dudley y Rosenberg 2003; Fishman y cols. 2008; Rosenberg 2001). No obstante, la IL-2 ha mostrado tener una baja capacidad inmuno-estimuladora en otros escenarios. En particular, se ha observado que cuando se aplica como terapia individual para tratar el cáncer renal o de melanoma metastásicos, tiene una eficacia reducida donde sólo responden entre el 5% y el 20% de los pacientes

tratados (Atkins y cols. 2000; Chang y Rosenberg 2001; Fisher y cols. 2000; Klapper y cols. 2008; Yang y cols. 2003).

Experimentos en pre-clínica han mostrado que, contrario a lo que se esperaba en un inicio, la IL-2 puede resultar eficaz para reforzar estados de tolerancia mediados por la expansión de las células T Reguladoras CD4+CD25+Foxp3+. Este efecto tolerogénico de la terapia, se ha observado en experimentos pre-clínicos al prevenir el desarrollo de enfermedades autoinmunes como Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) (Montero y cols. 2007; Rouse y cols. 2013) y la diabetes en animales no-obesos propensos a desarrollar la enfermedad (animales NOD, de sus siglas en inglés) (Tang y cols. 2008).

En conjunto, estas evidencias muestran un comportamiento dual de las terapias moduladoras de IL-2, en experimentos pre-clínicos y en la clínica. En este sentido, los resultados experimentales muestran que el mismo tratamiento es capaz de inducir una respuesta inmune o de reforzar un estado de tolerancia.

Por otra parte, se ha observado que la IL-2 tiene un papel importante en la dinámica de diferentes poblaciones celulares, más allá de su función clásica de promotora de la respuesta de células T. En ratones deficientes de IL-2 o su receptor, se ha observado el desarrollo de enfermedades autoinmunes relacionadas con una expansión descontrolada de las células T (Setoguchi y cols. 2005). Estos experimentos han mostrado que esta citocina es un factor de crecimiento esencial in vivo para las células T Reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ (Almeida y cols. 2002), encargadas de inhibir la respuesta inmune. La IL-2 es secretada fundamentalmente por las células T Efectoras CD4+CD25- in vivo (Almeida y cols. 2006), mientras que las células T Reguladoras no son capaces de producir esta citocina (Papiernik y cols. 1997), por lo que este resultado sugiere que las células T Reguladoras utilizan la IL-2 secretada por las células T Efectoras. De esta manera, las células T Reguladoras compiten por esta citocina con las células T Efectoras, restringiendo a estas últimas de este factor de crecimiento. Adicionalmente, se conoce que las células T Reguladoras expresan el receptor de alta afinidad de la IL-2 constitutivamente, lo cual les aporta ventaja en la competencia por esta citocina (Kuniyasu y cols. 2000). Por otra parte, experimentos in vitro han mostrado que las células T Reguladoras inhiben la secreción de la IL-2 en las células T Efectoras, limitando de esta manera su propia fuente de factor de crecimiento (Takahashi y cols. 1998; Thornton y Shevach 1998).

Estas observaciones experimentales muestran la complejidad existente en la dinámica de las células T CD4+ y su interacción con la IL-2. Por un lado, la IL-2 es capaz de promover la proliferación de las células T Efectoras, potenciando una respuesta inmune y una producción descontrolada de esta citocina; pero, por otra parte, promueve la proliferación de las células T Reguladoras, lo cual provoca una inhibición de la respuesta inmune y de la producción de IL-2. Este papel dual de la IL-2 en la dinámica de las células T CD4+ pudiera estar relacionada con la compleja respuesta observada ante tratamientos que modulan esta citocina.

Resultados

Desarrollo de un modelo matemático nuevo, para describir la dinámica de interacción de la IL-2 con las células T:

En este trabajo se desarrolló un modelo matemático nuevo, que describe la dinámica de interacción de la IL-2 con las células T, basado en las evidencias experimentales de la literatura. Esta resultó ser una herramienta útil para abordar el estudio de este tipo de sistemas mediados por interacciones no-lineales. La utilización del modelo permitió dar una explicación al efecto de los tratamientos moduladores de la IL-2, en dependencia de la dosis y el contexto en que estos se aplican. Además, permitió realizar predicciones cualitativas y cuantitativas acerca de las condiciones óptimas para la aplicación de estos tratamientos, con el objetivo de guiar la experimentación futura reduciendo el espacio de posibilidades a probar. (García-Martínez, K. y León, K. (2010). Modeling the role of il-2 in the interplay between cd4+ helper and regulatory t cells: Assessing general dynamical properties. *Journal of Theoretical Biology*, 262(4), 720-732.; León, K. y García-Martínez, K. (2011). Book "Mathematical models and immune cell biology". Chapter 15: "Modeling the role of il-2 in the interplay between cd4+ helper and regulatory t cells." Editorial Springer Berlag; García-Martínez, K. y León, K. (2012). Modeling the role of il-2 in the interplay between cd4+ helper and regulatory t cells: studying the impact of il2 modulation therapies. *International Immunology*, 24(7), 427-446.)

Resultados obtenidos en el modelo, simulando tratamientos de inyección de IL-2, son compatibles con observaciones clínicas y pre-clínicas:

Los resultados del modelo predicen que la terapia de inyección de IL-2 siempre va a reforzar el estado de equilibrio preexistente en el sistema. En este caso, se tiene que la terapia refuerza un estado tolerante preexistente, al expandir preferencialmente las células Reguladoras en el sistema mientras dure el tratamiento; o refuerza una respuesta autoinmune inicial, expandiendo las células Efectoras y de Memoria.

Este resultado del modelo es compatible con observaciones experimentales, y provee una guía para la futura aplicación práctica de este tipo de tratamiento. (León, K. y García-Martínez, K. (2011). Book "Mathematical models and immune cell biology". Chapter 15: "Modeling the role of il-2 in the interplay between cd4+ helper and regulatory t cells." Editorial Springer Berlag; García-Martínez, K. y León, K. (2012). Modeling the role of il-2 in the interplay between cd4+ helper and regulatory t cells: studying the impact of il2 modulation therapies. *International Immunology*, 24(7), 427-446.)

Resultados obtenidos en el modelo, simulando tratamientos de disminución de la señal por IL-2, predicen su eficacia para tratar desórdenes autoinmunes:

En el modelo, las simulaciones de tratamientos de disminución de la señal por IL-2 usando AcMs anti-IL2, predicen que este tipo de terapia es capaz de inducir la transición de un estado de equilibrio a otro en el sistema. En este sentido se obtiene que, esta terapia es capaz de romper un estado tolerante preexistente, induciendo una respuesta autoinmune; o revertir un estado autoinmune inicial, induciendo tolerancia. Estos resultados le confieren un papel dual a este tipo de tratamiento.

La capacidad de tratamientos que bloquean la actividad de la IL-2 de promover autoinmunidad en las simulaciones del modelo, es compatible con observaciones experimentales. En este caso el modelo predice una mayor eficacia, en cuanto a dosis mínimas necesarias, de AcMs que bloqueen la interacción de la IL-2 con la cadena α del IL-2R (AcM cara α).

Las simulaciones del modelo predicen además la capacidad de tratamientos bloqueadores de la señal de IL-2 de reestablecer tolerancia en el contexto de autoinmunidad, usando AcMs anti-IL2 que impiden la unión de la IL-2 al IL-2R α , IL-2R β (AcM cara β) o totalmente la unión al receptor (AcM bloqueador total). Esta capacidad de los AcMs anti-IL2 de revertir un estado autoinmune no ha sido probada experimentalmente; por lo que se propone su comprobación en experimentos futuros. Para esto, de las simulaciones se predicen el esquema de tratamiento y el tipo de AcM (en cuanto a la afinidad y la interfase de unión que bloquea en la IL-2) óptimos para la implementación de esta terapia. (León, K. y García-Martínez, K. (2011). Book "Mathematical models and immune cell biology". Chapter 15: "Modeling the role of il-2 in the interplay between cd4+ helper and regulatory t cells." Editorial Springer Verlag; García-Martínez, K. y León, K. (2012). Modeling the role of il-2 in the interplay between cd4+helper and regulatory t cells: studying the impact of il2 modulation therapies. International Immunology, 24(7), 427-446.)

Resultados obtenidos en el modelo, simulando tratamientos con inmunocomplejos, son compatibles con observaciones pre-clínicas recientes:

Los resultados obtenidos predicen diferentes propiedades de los inmucomplejos, dependiendo del tipo de AcM usado. Los complejos basados en AcMs cara α son eficientes en romper la tolerancia pre-existente, promoviendo autoinmunidad al expandir las células Efectoras y de Memoria; mientras, los basados en AcMs cara β o bloqueadores totales, refuerzan tolerancia expandiendo a las células Reguladoras. El tratamiento con estos inmunocomplejos se predice además que tiene una mayor eficacia que la aplicación de las terapias individuales.

La capacidad de los inmunocomplejos basados en AcMs cara α de promover inmunidad, es compatible con resultados experimentales expuestos en la literatura. Para la aplicación óptima de este tratamiento, de las simulaciones del modelo se predice que se deben utilizar AcMs con la mayor afinidad posible. Esta relación con la afinidad no ha sido explorada experimentalmente, por lo que resultaría interesante su comprobación en la práctica para optimizar el efecto de esta terapia.

Por otra parte, la capacidad de los inmunocomplejos basados en AcMs cara β o bloqueadores totales, de reforzar estados tolerantes establecidos ha sido igualmente descrita en la literatura. Adicionalmente, de los resultados del modelo se recomienda que para obtener un efecto óptimo, se deben usar AcMs con afinidad entre 10^9 M^{-1} y 10^{11} M^{-1} . La comprobación experimental de esta predicción podría resultar útil para aumentar la eficacia de este tipo de tratamiento. Otra predicción importante del modelo es que tratamientos con estos inmunocomplejos son útiles para reforzar un estado tolerante pre-existente, previniendo la inducción de autoinmunidad; no así para tratar un desorden autoinmune pre-establecido. (García-Martínez, K. y León, K. (2012). Modeling the role of il-2 in the interplay between cd4+ helper and regulatory t cells: studying the impact of il2 modulation therapies. *International Immunology*, 24(7), 427-446.)

El modelo predice el uso de una muteína no- α , como un tratamiento eficaz para inducir respuesta inmune:

Las simulaciones de un tratamiento novedoso, utilizando una muteína de IL-2 que tenga una capacidad reducida por pegarse a la cadena α del IL-2R, predicen una mayor capacidad de estas moléculas para inducir inmunidad en comparación con los tratamientos de inyección de IL-2. Utilizando el modelo se predice que este tipo de terapia pudiera resultar en una estrategia eficaz para inducir una respuesta inmune en estados inicialmente tolerantes, por ejemplo en escenarios tumorales. Este tipo de tratamiento se predice óptimo si la muteína tiene disminuida en más de dos órdenes su afinidad por el IL-2R α . Adicionalmente, mientras mayor sea el tiempo de vida media de la muteína en sangre, menor será la dosis mínima necesaria a aplicar para que el tratamiento sea eficaz. (León, K., García-Martínez, K. y Carmenate, T. Manuscrito aceptado para publicación en la revista *Frontiers in T Cell Biology*.)

Conclusiones

1. Los modelos matemáticos desarrollados, que incluyen las interacciones básicas conocidas entre las diferentes poblaciones de células T y la IL-2, mantienen las principales propiedades dinámicas del modelo original de Regulación Cruzada y permiten explicar observaciones experimentales, clínicas y pre-clínicas, del efecto aparentemente contradictorio de tratamientos moduladores de IL-2.
2. El modelo predice, como la mejor estrategia para tratar un desorden autoinmune restableciendo tolerancia, el uso de AcMs que bloquean de manera

individual o simultáneamente la interacción de la IL-2 con las cadenas α y β del receptor.

3. El modelo predice, como la mejor estrategia para reforzar la tolerancia preexistente, el uso de inmunocomplejos formados por AcMs con afinidad entre 10^9M^{-1} y 10^{11}M^{-1} y que bloquean la interacción de la IL-2 sólo con la cadena β o con las cadenas α y β simultáneamente.

4. El modelo predice, como la mejor estrategia para inducir inmunidad, el uso de inmunocomplejos formados por AcMs con la mayor afinidad posible y que bloquean la interacción de la IL-2 sólo con la cadena α del receptor.

5. El modelo predice, como una estrategia novedosa para inducir inmunidad, el uso de muteínas de la IL-2 que no reconozcan la cadena α del receptor. Estas muteínas pueden tener una eficacia comparable con los inmunocomplejos si se les incrementa el tiempo de vida media en sangre.

Consideraciones finales

La **novedad científica** de los resultados que aquí se presentan radica en que se desarrolla y calibra un modelo matemático nuevo que permite entender el efecto de las interacciones no-lineales, mediadas por la IL 2, en la dinámica de las células T. Utilizando este modelo, se propone el desarrollo de una muteína de la IL-2 que tenga afectada la unión a la cadena α del IL-2R, como un tratamiento novedoso que se predice más eficaz que la IL-2 para expandir una respuesta inmune.

El **aporte al conocimiento** que brinda este trabajo consiste en que se da una explicación racional a los resultados contradictorios obtenidos en la aplicación de terapias moduladoras de la IL-2 en pre-clínica y clínica, utilizando un modelo matemático nuevo para la dinámica de interacción de la IL-2 con las células T. Igualmente, el análisis de los resultados obtenidos en el modelo permite dar una explicación cualitativa del funcionamiento de diferentes terapias, en dependencia de la dosis y del contexto en que se apliquen; así como de la interfase de unión al IL-2R que bloquea el AcM utilizado, en el caso de la utilización de AcMs anti-IL2.

Los **aportes prácticos** de este trabajo radican primero en la predicción del uso de AcMs anti-IL2 como una terapia que debe resultar eficaz para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En particular, se predice la aplicación óptima de esta terapia al usar AcMs de baja afinidad que bloquean la interacción de la IL-2 sólo con la cadena α del receptor o AcMs de afinidad intermedia-alta que sólo bloquean la interfase con la cadena β . Adicionalmente, se predice el uso de una muteína de IL-2, que tenga disminuida la unión al IL-2R α , como un tratamiento novedoso y eficaz para inducir una respuesta inmune mediada por las células T. Esta predicción del modelo ha dado lugar al desarrollo de una nueva línea experimental en el CIM, donde se ha validado el uso eficaz de esta muteína de IL-2 como terapia anti-tumoral.

El **aporte metodológico** de este trabajo radica en que el mismo está insertado en un proyecto de trabajo multidisciplinario donde se combina teoría y

experimentación. Debe resaltarse que es la primera vez en el CIM que un trabajo de modelación matemática ha llevado a la construcción y evaluación experimental de nuevas moléculas. Varios de los resultados del modelo ya han sido evaluados experimentalmente, y en experimentos futuros se continuarán evaluando otras predicciones del modelo encaminadas a mejorar la eficacia de las moléculas desarrolladas.

Referencias bibliográficas

- (1) Almeida, A. R., Legrand, N., Papiernik, M., y Freitas, A. A. (2002). Homeostasis of peripheral cd4+ tcells: Il-2r_α and il-2 shape a population of regulatory cells that controls cd4+ t cell numbers. *The Journal of Immunology*, 169(9), 4850-4860.
- (2) Almeida, A., Zaragoza, B., y Freitas, A. (2006). Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of cd4+ cd25+ regulatory t cells is indexed to the number of il-2-producing cells. *The Journal of Immunology*, 177(1), 192-200.
- (3) Atkins, M. B., Kunkel, L., Sznol, M., y Rosenberg, S. A. (2000). High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update. *The Cancer Journal from Scientific American*, 6, S11.
- (4) Blattman, J. N., Grayson, J. M., Wherry, E. J., Kaech, S. M., Smith, K. A., y Ahmed, R. (2003). Therapeutic use of il-2 to enhance antiviral t-cell responses in vivo. *Nature Medicine*, 9(5), 540-547.
- (5) Chang, E. y Rosenberg, S. A. (2001). Patients with melanoma metastases at cutaneous and subcutaneous sites are highly susceptible to interleukin-2-based therapy. *Journal of Immunotherapy*, 24(1), 88-90.
- (6) Devos, R., Plaetinck, G., Cheroutre, H., Simons, G., Degraeve, W., Tavernier, J., Remaut, E., y Fiers, W. (1983). Molecular cloning of human interleukin 2 cDNA and its expression in e.coli. *Nucleic Acids Research*, 11(13), 4307-4323.
- (7) Dudley, M. E. y Rosenberg, S. A. (2003). Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(9), 666-675.
- (8) Fisher, R., Rosenberg, S. A., Fyfe, G., y cols. (2000). Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *The Cancer Journal from Scientific American*, 6, S55.
- (9) Fishman, M., Hunter, T. B., Soliman, H., Thompson, P., Dunn, M., Smilee, R., Farmelo, M. J., Noyes, D. R., Mahany, J. J., Lee, J.-H., y cols. (2008). Phase ii trial of b7-1 (cd-86) transduced, cultured autologous tumor cell vaccine plus subcutaneous interleukin-2 for treatment of stage iv renal cell carcinoma. *Journal of Immunotherapy*, 31(1), 72-80.

- (10) Gillis, S., Ferm, M. M., Ou, W., y Smith, K. A. (1978). T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *The Journal of Immunology*, 120(6), 2027-2032.
- (11) Klapper, J. A., Downey, S. G., Smith, F. O., Yang, J. C., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Sherry, R. M., Royal, R. E., Steinberg, S. M., y Rosenberg, S. (2008). High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*, 113(2), 293-301.
- (12) Kudo-Saito, C., Garnett, C. T., Wansley, E. K., Schlom, J., y Hodge, J. W. (2007). Intratumoral delivery of vector mediated il-2 in combination with vaccine results in enhanced t cell avidity and anti-tumor activity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(12), 1897-1910.
- (13) Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., y Sakaguchi, S. (2000). Naturally anergic and suppressive cd25+ cd4+ t cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory t cell subpopulation. *International Immunology*, 12(8), 1145-1155.
- (14) Lin, C.-T., Tsai, Y.-C., He, L., Yeh, C.-N., Chang, T.-C., Soong, Y.-K., Monie, A., Hung, C.-F., y Lai, C.-H. (2007). Dna vaccines encoding il-2 linked to hpv-16 e7 antigen generate enhanced e7-specific ctl responses and antitumor activity. *Immunology Letters*, 114(2), 86-93.
- (15) Montero, E., Alonso, L., Perez, R., y Lage, A. (2007). Interleukin-2 mastering regulation in cancer and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1107(1), 239-250.
- (16) Papiernik, M., Pontoux, C., Joret, A., Rocha, B., Penit, C., Dy, M., y cols. (1997). T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a cd25-positive, il-10-producing t cell population with infectious capacity. *The Journal of Immunology*, 158(10), 4642-4653.
- (17) Rosenberg, S. A. (2001). Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411(6835), 380-384.
- (18) Rouse, M., Nagarkatti, M., y Nagarkatti, P. (2013). The role of il-2 in the activation and expansion of regulatory t-cells and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology*, 218, 674-82.
- (19) Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., y Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural foxp3+ cd25+ cd4+ regulatory t cells by interleukin (il)-2 and induction of autoimmune disease by il-2 neutralization. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(5), 723-735.

- (20) Smith, K. A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, 240(4856), 1169-1176.
- (21) Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., y Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by cd25+ cd4+ naturally anergic and suppressive t cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology*, 10(12), 1969-1980.
- (22) Tang, Q., Adams, J. Y., Penaranda, C., Melli, K., Piaggio, E., Sgouroudis, E., Piccirillo, C. A., Salomon, B. L., y Bluestone, J. A. (2008). Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*, 28(5), 687-697.
- (23) Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., Hamuro, J., y cols. (1983). Structure and expression of a cloned cdna for human interleukin-2. *Nature*, 302(5906), 305-310.
- (24) Thornton, A. M. y Shevach, E. M. (1998). Cd4+ cd25+ immunoregulatory t cells suppress polyclonal t cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 287-296.
- (25) Yang, J. C., Sherry, R. M., Steinberg, S. M., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., White, D. E., y cols. (2003). Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(16), 3127-3132.