



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

## **“ESTUDIO DE AUTO-ANTICUERPOS CONTRA CITOCINAS Y QUIMIOCINAS EN MUESTRAS SÉRICAS DE CANINOS Y HUMANOS.”**

### **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

**PAULINA CORTES ACEVEDO**

DIRECTOR DE TESIS

**DRA. GABRIELA BÁRCENAS MORALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN IZCALLI, CAMPUS 1.

COMITÉ TUTOR

**DR. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN IZCALLI, CAMPUS 4.

**DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Cuatitlán Izcalli, Estado de México, Enero 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la **Universidad Nacional Autónoma de México** y en especial a la **Facultad de Estudios Superiores Cuautilán** por haberme recibido y permitido ser parte de su comunidad.

A mis profesores quienes continuamente ofrecieron sus conocimientos en mi formación y que constantemente me motivaron a seguir aprendiendo para no conformarme con la información que recibía.

A la **Dra. Gabriela Barcenas Morales** a quien admiro y respeto mucho, por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto con apoyo de su capacidad y experiencia; por haberme brindado la oportunidad de crecer tanto profesional como moralmente, por su tiempo, observaciones y consejos que constantemente me ofrecía y que ha inculcado en mi un sentido de responsabilidad, tolerancia, paciencia y seriedad con los cuales mi formación se ha visto enriquecida.

Al **comité tutor**: Dr. Juan Carlos del Río y Dr. Guillermo Avila por su orientación y aportaciones continuas que me permitieron mejorar como investigadora y como persona.

Al **Dr. Rainer Doffinger** por su apoyo y dedicación con equipo y reactivos al laboratorio de Inmunología de la FES-Cuautitlán, por su apoyo durante mi estancia en Inglaterra, por sus consejos y sugerencias en la realización de este proyecto, muchas gracias.

Al **jurado asignado**, quienes con sus comentarios, sugerencias y dudas permitieron el enriquecer el trabajo.

Investigación realizada gracias al Programa **UNAM-DGAPA-PAPIIT**, proyecto con clave **IN220815** y título *“Análisis de la actividad biológica neutralizante de autoanticuerpos específicos contra citocinas y quimiocinas, y su relación con inmunodeficiencias secundarias.”*

Al proyecto **PIAPI**, FES-Cuautitlán, UNAM. “Infección e inmunidad” con Clave **PIAP1642** y **PIAPI1811**

## DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a las personas más importantes en mi vida y a quienes les agradezco todo lo que soy:

A mi **Mamá**, gracias por tu apoyo constante en esta y en todas las etapas de mi vida, por motivarme continuamente a no rendirme, por ser el mejor modelo de superación que alguien podría tener, por inculcarme el amor a la ciencia y sobre todo por ser el pilar que nos fortalece.

A mis hermanas, **Teffy y Nanis**, por ser mis compañeras de risas, por apoyarme siempre y confiar en que superaría este reto, por escucharme cuando se presenta un problema y tolerarme cuando tengo extrañas teorías sobre mi proyecto.

A mi hermano **Pablito**, quien me apoya a diario a mejorar tanto en lo académico como en lo moral, por motivarme a superar cualquier reto que se te presente para ser en tu camino un buen modelo a seguir

A mis tías: **Rosita** por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuesta a ayudarnos en cualquier momento, **Bety** por haberme motivado a superar este reto y Martha por haber estado conmigo durante esta etapa de mi vida.

A mis tíos **José Luis Muñoz y Guillermo Ávila**, quienes me aconsejaban cuando lo necesitaba y que siempre que un problema se presentaba me ofrecían su apoyo incondicional.

A mi abuelita **Ricarda** por haberme ofrecido su profundo cariño, esperando siempre lo mejor de mí y motivándome a no detenerme hasta lograr superar cada reto que me proponga..

A mis amigos **Sandy, Armando, Pili, Mary y Lalo** que gracias a su apoyo moral me permitieron continuar con este proyecto, por ser mis compañeros en esta aventura, por estar en los grandes momentos de mi vida y por su motivación constante. Por todo eso y mucho más, muchas gracias.

A Lourdes, Olga y Sophie por su apoyo durante mi estancia en Inglaterra, por los conocimientos que me impartieron y por los retos que me ayudaron a superar, gracias

A **Dios** por haberme dado la voluntad de terminar este trabajo y por darme el mejor regalo que podría recibir mi familia y amigos.

## CONTENIDO

ÍNDICE DE ESQUEMAS .....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Citocinas y quimiocinas .....	4
1.3 Transductor de señal y activador de transcripción (STAT).....	10
1.4. Autoanticuerpos contra citocinas y susceptibilidad a infecciones.....	12
1.5. Ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bioplex .....	14
1.5.1. Activación de microesferas y acoplamiento proteico.....	17
1.6. Cromatografía por afinidad.....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3. HIPÓTESIS .....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo general. ....	23
4.2. Objetivos específicos.....	23
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	24
5.1. Muestras séricas .....	24
5.2. Citocinas, quimiocinas y microesferas.....	26
5.3. Obtención de los sistemas de citocinas o quimiocinas acopladas a microesferas y evaluación de la especificidad, integridad antigénica e interferencias entre los sistemas	26
5.3.1. Amino acoplamiento de proteínas (citocinas y quimiocinas) a microesferas carboxiladas .....	28
5.4. Evaluación de los sistemas de citocinas acopladas a las microesferas empleando el sistema mono-Plex (Luminex) .....	33
5.5. Determinación de las interferencias entre los sistemas de acoplamiento.....	34

5.6. Detección de la presencia de autoanticuerpos contra quimiocinas y citocinas en muestras séricas caninas y humanas mediante el ensayo de arreglo de partículas en suspensión múltiple.....	34
5.7. Técnica de cromatografía por columna de afinidad.....	35
5.7.1. Preparación del material .....	36
5.7.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína .....	36
5.7.3. Procedimiento general para la purificación por afinidad.....	39
5.7.4. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad.....	41
5.8. Determinación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-citocinas (IL-6 y IL-10) sobre la actividad biológica de éstas en ensayos de inhibición <i>in vitro</i> .....	42
5.8.1. Líneas Celulares .....	42
5.8.2. Ensayo de inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10 empleando la técnica de Luminex, para evaluar la función biológica de autoanticuerpos anti-IL-10.....	43
5.8.3. Ensayo de inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex, para evaluar la función biológica de autoanticuerpos anti-IL-6. ....	46
5.9. Análisis estadístico.....	46
6. RESULTADOS .....	47
6.1. Evaluación del acoplamiento proteico, la integridad antigénica y la especificidad de cada sistema citocina- o quimiocina-microesfera empleando anticuerpos específicos para cada citocina .....	47
6.2. Determinación de las interferencias entre los diferentes sistemas de citocinas- o quimiocinas-microesferas elaborados.....	47
6.3. Análisis serológico para la detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas de caninos y humanos mediante el ensayo de arreglo de partículas en suspensión múltiple .....	50
6.3.1. Análisis serológico en muestras caninas.....	50
6.3.2. Análisis serológico en muestras humanas .....	58
6.5. Estandarización de la purificación de autoanticuerpos contra IL-10 e IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna.....	65
6.6. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina en la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10.....	69

6.7 Actividad neutralizante de auto-Ac's anti-citocina en la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6.....	71
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	73
8. CONCLUSIONES.....	81
9. REFERENCIAS .....	83
11. APENDICES.....	91
11.1. Apéndice 1 (Tablas) .....	91
10.2. Apéndice 2 (Preparación de Soluciones).....	104

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	<b>Página</b>
<b>Esquema 1.</b> Atributos de las citocinas.	5
<b>Esquema 2.</b> Representación esquemática de las diversas acciones de las citocinas.	6
<b>Esquema 3.</b> Citocinas, quimiocinas y sus receptores.	9
<b>Esquema 4.</b> Modelo general de transducción de señales mediada por la mayor parte de los receptores de citocina clases I y II.	11
<b>Esquema 5.</b> Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex).	16
<b>Esquema 6.</b> Acoplamiento proteico entre las microesferas y las quimiocinas	18
<b>Esquema 7.</b> Cromatografía por afinidad.	19

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Número de muestras séricas caninas colectadas, ordenadas por grupo de pacientes especificando su padecimiento y de controles negativos.	25
<b>Cuadro 2.</b> Número de muestras séricas humanas colectadas y analizadas, ordenadas por grupo de pacientes especificando su padecimiento y de controles negativos	25
<b>Cuadro 3.</b> Homología entre citocinas o quimiocinas de caninos y humanos.	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Evaluación de los sistemas de citocinas-microesferas acoplados	48
<b>Figura 2.</b> Determinación de las interferencias entre los diferentes sistemas citocinas acopladas a las microesferas.	49
<b>Figura 3.</b> Detección de auto-anticuerpos anti-citocinas y antiquimiocinas en muestras séricas caninas mediante el sistema 46-plex quimiocina-microesfera.	51
<b>Figura 4.</b> Patrón de autoanticuerpos contra citocinas pro-inflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.	53
<b>Figura 5.</b> Patrón de autoanticuerpos contra citocinas anti-inflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.	54
<b>Figura 6.</b> Patrón de autoanticuerpos contra quimiocinas en pacientes e individuos clínicamente sanos.	55
<b>Figura 7.</b> Mapa de calor de los valores de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras caninas.	57
<b>Figura 8.</b> Detección de autoanticuerpos anti-citocinas y antiquimiocinas en muestras séricas caninas mediante el sistema 46-plex citocina-microesfera	59
<b>Figura 9.</b> Patrón de autoanticuerpos contra citocinas pro-inflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.	60
<b>Figura 10.</b> Patrón de autoanticuerpos contra citocinas anti-inflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.	61
<b>Figura 11.</b> Patrón de autoanticuerpos contra quimiocinas en pacientes e individuos clínicamente sanos.	62
<b>Figura 12.</b> Mapa de calor de los valores de intensidad de fluorescencia de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas.	64
<b>Figura 13.</b> Purificación de autoanticuerpos anti- IL-10 de dos muestras séricas.	67
<b>Figura 14.</b> Purificación de autoanticuerpos anti- IL-6 de 2 muestras séricas.	68
<b>Figura 15.</b> Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-10.	70
<b>Figura 16.</b> Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6.	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

AID	Enfermedades Autoinmunes
AID/ID	Enfermedades Autoinmunes e Infecciosas
AIRE	Regulador autoinmune
APECED	Poliendocrinopatía autoinmune tipo 1
APS-1	Síndrome poli-endócrino autoinmune-1
BSA	Albumina sérica bovina
C	Grados centígrados
CMC	Candidiasis mucocutánea crónica
CPP	Cuadrantes primarios periféricos
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ELR	Glutamato-leucina-arginina
G	Gravedades
GAG's	Glucosaminoglucanos
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos.
GPCR's	Proteína heterodimérica G
HC	Controles Sanos
ID	Enfermedades Infecciosas
IF	Intensidad de fluorescencia
IFN- $\gamma$	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
JAK	Cinasa janus
kDa	Kilodalton
M	Molar
MAb's	Anticuerpos monoclonales
MDC	Quimiocina derivada de macrófagos
min	Minuto
ml	Mililitro
NaN <sub>3</sub>	Azida de sodio

NH <sub>2</sub>	Aminas primarias
NK	Natural killer
OD	Otras Enfermedades
PAP	Proteinosis alveolar pulmonar
PBMC's	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer salino de fosfatos
PBS-T	PBS-Tween
PE	Ficoeritrina
PVA	Poly(vinyl alcohol)
PVP	Poly(vinylpyrrolidinone)
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviaciones estándar
Seg	Segundo
S-NHS	N-hydroxysulfosuccinimida
STAT-3	Transductor de señales y activador transcripcional-3
Strep	Estreptavidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ l	Microlitro

## RESUMEN

La evidencia reciente pone de relieve la importancia de las inmunodeficiencias secundarias causadas por la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en donde altos títulos de estos autoanticuerpos neutralizantes causan susceptibilidad a una amplia variedad de enfermedades que amenazan la vida del individuo. Siendo de interés ampliar este tipo de estudios empleando diversas citocinas, así mismo, no existen publicaciones con respecto a la detección de autoanticuerpos anti-quimiocinas que pudieran estar relacionados a la predisposición a enfermedades infecciosas en humanos, de igual forma no existen este tipo de estudios en otras especies.

**Objetivo:** Analizar la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y anti-quimiocinas en muestras séricas caninas y humanas con diversas enfermedades, y evaluar la capacidad neutralizante de estos autoanticuerpos sobre la actividad biológica de estos mediadores químicos.

**Métodos:** Citocinas recombinantes humanas fueron acopladas covalentemente a microesferas, evaluando su especificidad, viabilidad e interferencia empleando la técnica de Luminex. Dichos sistemas se emplearon para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas en un total de 342 muestras séricas, de las cuales 209 correspondían a humanos y 133 a caninos, entre pacientes de diversos grupos de padecimientos e individuos clínicamente sanos. Así mismo, autoanticuerpos contra IL-10 o IL-6 se purificaron mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna confirmando la presencia de estos autoanticuerpos en las diferentes fracciones eluidas mediante el ensayo Luminex. Finalmente, utilizando las líneas celulares U937 y Hep3B se realizó la determinación de la capacidad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6 y anti-IL-10 sobre la fosforilación de STAT-3.

**Resultados:** El análisis serológico indicó que en 29 de las 83 muestras séricas de pacientes caninos presentaron valores de intensidad de fluorescencia altos ( $\geq 15,000$ ) para la presencia de autoanticuerpos contra al menos una de 13 citocinas y dos receptores. Mientras que 86 de las 159 muestras séricas humanas de pacientes resultaron altamente positivas contra al menos una de 22 citocinas y un receptor. Así mismo, la técnica de Luminex resultó ser útil para confirmar la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas obtenidos en la purificación por cromatografía de afinidad en columna. El ensayo de inhibición de la fosforilación de STAT-3 reflejó una disminución en los niveles de fosforilación de este factor de transcripción, cuando las líneas celulares células fueron estimuladas con la citocina (IL-10 o IL-6), pre-incubada con la muestra sérica positiva.

**Conclusiones:** La agrupación jerárquica entre los tipos de enfermedad y los autoanticuerpos detectados permitió establecer cinco grupos de reconocimiento en las muestras caninas y seis en las de humano. Se estandarizó la técnica de cromatografía de afinidad en columna logrando realizar la purificación de autoanticuerpos anti-IL-6 y anti-IL10 presentes en muestras séricas humanas. Finalmente, los autoanticuerpos contra IL-10 e IL-6 detectados en las muestras séricas presentaron un efecto de inhibición de la fosforilación del factor de transcripción STAT-3, demostrando la función biológica neutralizante de éstos.

## ABSTRACT

Recent evidence highlights the importance of secondary immunodeficiencies caused by the presence of anti-cytokine autoantibodies where high titers of these neutralizing autoantibodies cause susceptibility to a wide variety of life-threatening diseases. It is interesting to expand this type of studies using various cytokines, likewise, there are no publications regarding the detection of anti-chemokine autoantibodies that could be related to the predisposition to infectious diseases in humans, similarly there are no such studies in other species.

**Objective:** Analyze the presence of anti-cytokine and anti-chemokine autoantibodies in canine and human serum samples with different diseases, and to evaluate the neutralizing capacity of these autoantibodies on the biological activity of these chemical mediators.

**Methods:** Human recombinant cytokines were covalently coupled to microspheres, evaluating their specificity, viability and interference using the Luminex technique. These systems were used for the detection of anti-cytokine autoantibodies in a total of 342 serum samples, of which 209 corresponded to humans and 133 to canines, from patients of various groups of diseases and clinically healthy individuals. Likewise, autoantibodies against IL-10 or IL-6 were purified using the affinity column chromatography technique confirming the presence of these autoantibodies in the different eluted fractions by the Luminex assay. Finally, using the U937 and Hep3B cell lines, the neutralizing capacity of the anti-IL-6 and anti-IL-10 autoantibodies on the phosphorylation of STAT-3 it was determined.

**Results:** Serological analysis indicated that in 29 of the 83 serum samples from canine patients presented high fluorescence intensity values ( $\geq 15,000$ ) for the presence of autoantibodies against at least one of 13 cytokines and two receptors. While 86 of the 159 samples of human serum samples from patients were highly positive against at least one of 22 cytokines and one receptor. Likewise, the Luminex technique was found to be useful to confirm the presence of anti-cytokine autoantibodies obtained in the purification by affinity column chromatography. The inhibition assay of STAT-3 phosphorylation reflected a decrease in phosphorylation levels of this transcription factor, when the cell lines were stimulated with the cytokine (IL-10 or IL-6) pre-incubated with the positive serum sample.

**Conclusions:** The hierarchical grouping between the types of disease and the detected autoantibodies allowed establishing five recognition groups in the canine samples and six in the human samples. The affinity column chromatography technique was standardized, achieving the purification of anti-IL-6 and anti-IL10 autoantibodies presented in human serum samples. Finally, the autoantibodies against IL-10 and IL-6 detected in the serum samples showed an inhibiting effect on the phosphorylation of the transcription factor STAT-3, demonstrating the biological neutralizing function of these.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes

En el curso normal de una infección, durante la presentación de los signos, el agente infeccioso provoca una respuesta inmune innata, seguida de una respuesta adaptativa inmune que elimina la infección y establece un estado de inmunidad protectora. Esto no siempre sucede en el caso de individuos con problemas de inmunodeficiencia, este término engloba todo un conjunto de entidades causadas por alteraciones cualitativas y cuantitativas de uno o más componentes específicos o inespecíficos del sistema inmune. Atendiendo a su causa, pueden clasificarse en dos grandes grupos: inmunodeficiencias primarias o congénitas, cuya causa es un defecto genético intrínseco del sistema inmune, y secundarias o adquiridas, las cuales aparecen como consecuencia a una gran variedad de condiciones patológicas como neoplasias, infecciones, malnutrición, entre otras (Lahera, 2010).

Un ejemplo de inmunodeficiencias primarias son los reportes de mutaciones en genes que codifican para proteínas de la vía del interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) dependiente de interleucina (IL) 12, incluyendo mutaciones en los receptores alfa y beta para IFN- $\gamma$ , y en el receptor beta1 para la IL-12, la existencia de una de estas mutaciones predisponen al individuo a una alta susceptibilidad a infecciones por micobacterias, como *Mycobacterium tuberculosis*, el cual es el agente causal de la tuberculosis y se considera como el patógeno humano más exitoso. Estos trabajos y otros estudios indican que ésta vía mediada por la IL-12 es importante para el control de *M. tuberculosis* y otros patógenos intracelulares (Altare *et al.*, 1998; Caragol *et al.*, 2003; Doffinger *et al.*, 2004; Pedral-Sampaio *et al.*, 2003; Picard *et al.*, 2002).

Por otra parte, las inmunodeficiencias que se desarrollan en individuos que inicialmente no se encuentran afectados inmunológicamente son llamadas inmunodeficiencias secundarias, y son el resultado de diversos factores externos (infecciones, cirugías, traumas, desnutrición, drogas), así como a cierto número de enfermedades humanas como el síndrome nefrótico y la enteropatía de la pérdida de proteína (Gupta & Fernandes, 2001).

Actualmente se consideran a los agentes infecciosos como los factores desencadenantes de inmunodeficiencias secundarias más importantes, reconociendo cada vez más que éstos pueden preceder a una autoinmunidad clínica (Ercolini & Miller, 2009). Existen varios estudios que han demostrado que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra algunas citocinas, como una consecuencia de autoinmunidad, afecta las funciones celulares y la eliminación de los patógenos, lo que finalmente predispone al hospedador a enfermedades infecciosas (Dinarello, 2003; Maródi *et al.*, 2012; Winthrop, Chang, Yamashita, Iademarco, & LoBue, 2009).

Por lo tanto, la evidencia reciente pone de relieve la importancia de las inmunodeficiencias secundarias causadas por la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en donde altos títulos de estos autoanticuerpos neutralizantes causan susceptibilidad a una amplia variedad de posibles enfermedades que amenazan la vida del individuo (Maddur, Vani, Lacroix-Desmazes, Kaveri, & Bayry, 2010).

En general, una correlación entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes hacia IFN- $\gamma$  y una susceptibilidad a infecciones micobacterianas ha sido reportada en diversos estudios, en donde se muestran pacientes humanos con una deficiencia adquirida en la inmunidad mediada por esta citocina. Así mismo, autoanticuerpos contra IL-6 fueron detectados en un paciente con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente, y anticuerpos neutralizantes hacia citocinas Th17 predisponen a infecciones fúngicas (Baerlecken, Jacobs, Stoll, Schmidt, & Witte, 2009; Doffinger *et al.*, 2004; Dubin & Kolls, 2008; Höflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005; Kisand *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2009; Madariaga *et al.*, 1998; Smita Y. Patel *et al.*, 2005; A. Puel *et al.*, 2008; Anne Puel *et al.*, 2010).

También, se reporta la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en pacientes con poliendocrinopatía autoinmune tipo 1 (APECED) causada por mutaciones en el regulador autoinmune (AIRE); así mismo, se demostró en éstos pacientes que las inmunoglobulinas del isotipo G son las responsables de la actividad neutralizante contra IFN- $\omega$ , IFN- $\alpha$ 2a, IL-17A e IL-22; estableciéndose una relación entre los autoanticuerpos contra IL-17 y la infección crónica con *Candida* en mucosas (J. Kärner *et al.*, 2013; Kisand *et al.*, 2011).

Por otra parte, es importante agregar que dentro del área veterinaria no existen reportes de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas relacionadas con enfermedades infecciosas, sin embargo, el concepto de “una medicina”, se ha vuelto popular en años recientes a causa de la observación de que muchas enfermedades que ocurren en pacientes humanos también se presentan en otras especies, específicamente en animales domésticos. Aunque este concepto se refiere principalmente a enfermedades infecciosas, alergias y enfermedades del desarrollo; las autoinmidades ocupan un lugar importante entre las patologías que son similares entre humanos y animales, siendo el ratón negro de Nueva Zelanda, descubierto en 1959, el primer modelo animal espontáneo de autoinmunidad.

En estudios realizados en caninos se especula que algunos agentes infecciosos conocidos como *Leishmania*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* y *Anaplasma*, los cuales son transmitidos por artrópodos, podrían desencadenar eventos autoinmunes como es la producción de autoanticuerpos dirigidos a diferentes componentes extra e intracelulares (Ercolini & Miller, 2009).

Las enfermedades autoinmunes más frecuentes en razas de caninos son las relacionadas a células sanguíneas y a las de la piel como el Lupus eritematoso sistémico (LES), trombocitopenia, anemia hemolítica autoinmune, miastenia gravis autoinmune, nefritis y diabetes mellitus. Más recientemente se han reportado casos de perros con enfermedades reumáticas inmunomediada y epidermólisis bullosa en caninos (Bremer *et al.*, 2018; Gershwin, 2007; Morel, 2004).

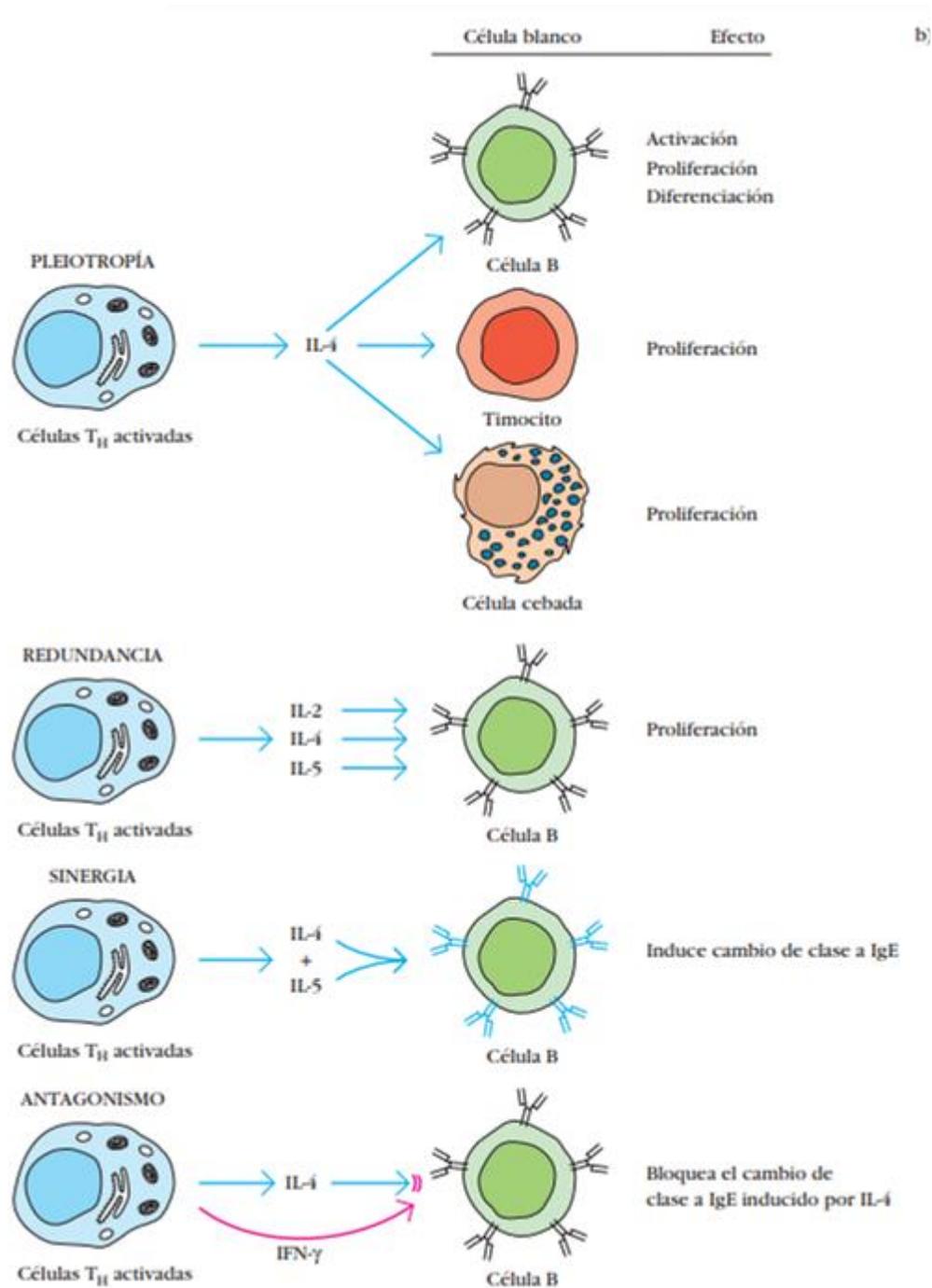
La detección de la presencia serológica de autoanticuerpos contra diversas estructuras extra e intracelulares del organismo, representa una herramienta diagnóstica de autoinmunidad, y estos autoanticuerpos pueden estar presentes durante muchos años antes de la presentación de la enfermedad autoinmune. Aunque el papel patogénico ha sido demostrado para diferentes autoanticuerpos reactivos hacia la superficie celular y hacia diferentes auto-antígenos extracelulares, los estudios que utilizan anticuerpos monoclonales (mAb) no muestran que todos los anticuerpos en la respuesta policlonal son patógenos. Las diferencias dependen de la diversidad mediada por la especificidad del epítipo, los efectos sobre la estructura de las inmunoglobulinas (Ig) involucradas, clase y subclase, la activación del complemento y el microambiente respectivo; sin

embargo una alternativa para estudiar el efecto neutralizante de los autoanticuerpos, consiste en inhibir o afectar negativamente las vías bioquímicas intracelulares definidas mediante ensayos biológicos funcionales (Rowley & Whittingham, 2015).

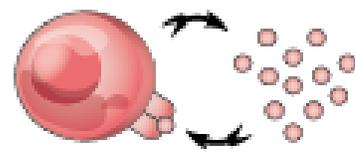
## **1.2. Citocinas y quimiocinas**

Las citocinas son un grupo de proteínas y péptidos de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos que forman la red de comunicación intercelular de todos los sistemas celulares del cuerpo, incluyendo el sistema inmune. Aunque en general son producidas por leucocitos, algunas citocinas pueden también ser secretadas por otros tipos celulares. Son moléculas de señalización similares a las hormonas y a los neurotransmisores que permiten la comunicación celular, afectando el comportamiento de otras células, por medio de receptores específicos para cada una de las citocinas, presentes en la superficie celular. Sin embargo, se diferencian de las hormonas en varios aspectos, por ejemplo, las citocinas presentan pleiomorfismo, es decir una determinada citocina puede afectar múltiples tipos celulares, de igual manera, presentan un alto grado de redundancia y sinergismo, ya que diferentes citocinas pueden ejercer una misma función y los efectos que presentan combinadas son mayores que la suma de sus efectos individuales. Así mismo, en algunos casos, las citocinas muestran antagonismo, es decir, los efectos de una citocina inhiben o neutralizan las acciones de otras citocinas (**Esquema 1**) (Bliss, Marshal, & Zhang, 1999; Denkers, 2003; Kindt, Golsby, & Osborne, 2014).

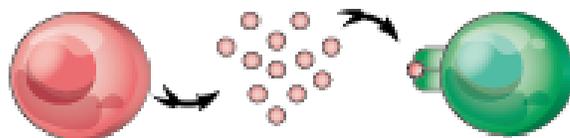
A diferencia de las hormonas, que suelen actuar a larga distancia en forma endocrina, casi todas las citocinas lo hacen en una distancia corta de manera autocrina o paracrina. Una citocina dada puede unirse a receptores en la membrana de la misma célula que la secreta y ejercer una acción autocrina, adherirse a receptores en una célula blanco cercana a la célula productora y llevar a cabo un efecto paracrino; en unos cuantos casos, se une a células blanco en partes distantes del cuerpo y tiene una acción endocrina (**Esquema 2**).



**Esquema 1. Atributos de las citocinas.** Las citocinas muestran los atributos de pleiotropía, redundancia que les permiten regular la actividad celular en una forma interactiva (Tomado de(Kindt *et al.*, 2014).

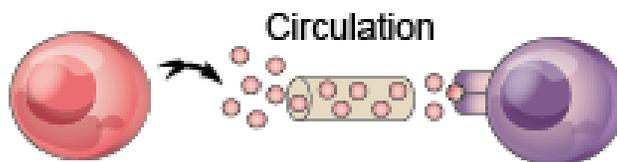


**Acción autocrina**



**Acción paracrina**

**Célula cercana**



**Acción endocrina**

**Célula distante**

**Esquema 2. Representación esquemática de las diversas acciones de las citocinas.** Las citocinas pueden presentar acción autocrina al actuar sobre la misma célula que la produjo, paracrina, al adherirse a una célula cercana o endocrina al ejercer su efecto sobre células distantes. Tomado de Kindt et al., 2014

Las citocinas juegan un papel muy importante en el proceso de montaje de respuestas anti-microbianas debido a sus habilidades para regular la respuesta inmune innata y adaptativa, en la polarización de la respuesta de células T, y por actuar como moléculas efectoras. Por ejemplo, las células T vírgenes, una vez activadas en respuesta a un antígeno, proliferan y se diferencian a células efectoras gracias a tres señales moleculares diferentes: 1) activación antígeno-específica del receptor de la célula T, 2) presencia de moléculas co-estimuladoras tales como CD40-CD40L y 3) citocinas que inducen la diferenciación a diversas subpoblaciones de células T CD8+ y CD4+ (Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras). Las células Th1 son generadas en respuesta a patógenos intracelulares como *Mycobacterium*; éstas son células productoras de IFN- $\gamma$  especializadas en la activación de macrófagos infectados. Después de la estimulación, las células Th1 expresan en su superficie CD40L que se une a CD40 presente en los macrófagos, disparando con ello la activación de estos últimos. En respuesta a IFN- $\gamma$  y moléculas co-estimuladoras, los macrófagos sobre-expresan IL-12 y otras citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Las citocinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ , entre otras) y quimiocinas (IL-8, MIP-3 $\alpha$ , MCP-1 $\beta$ , RANTES, entre otras) son producidas para favorecer la presencia y atraer a otras células inmunocompetentes al sitio de la infección, respectivamente (Bliss *et al.*, 1999; Denkers, 2003; Kasama, Strieter, & Standiford, 1993).

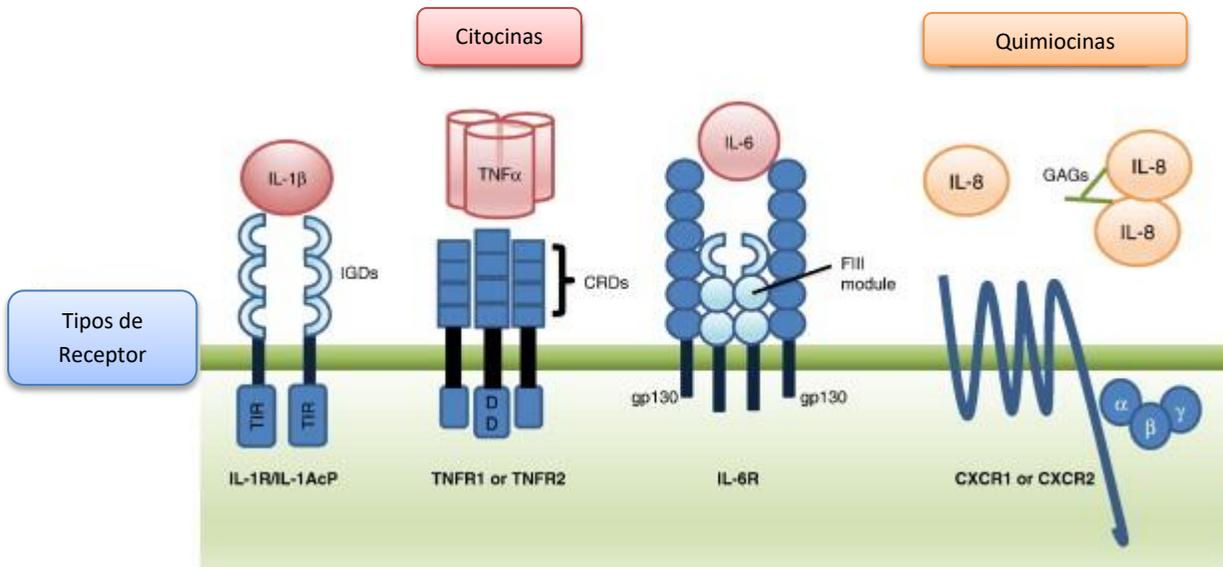
Es posible clasificar a las citocinas de acuerdo a la función que ejercen en la respuesta inmune promoviendo (proinflamatorias) o inhibiendo la inflamación (antiinflamatorias). Dentro de las citocinas proinflamatorias, se tiene como ejemplo a miembros de la familia de la IL-6 (IL-6, IL-11, IL-31), de la IL-1 (IL-1b, IL-18, IL-33), de los Interferones (IFN $\gamma$ , IL-28b o IFNL3) de IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27) y del TNF- $\alpha$ , así como la IL-15 y la IL-21; mientras que miembros de la familia de la IL-10 (IL-10, IL-19, IL-26) son algunos ejemplos de citocinas antiinflamatorias (8-14 KDa) con características bioquímicas comunes, estas son producidas por muchos tipos celulares en forma constitutiva o en respuesta a estímulos exógenos o endógenos. Principalmente estas moléculas tienen un papel importante en la reacción inflamatoria, funcionando como quimioatrayentes para leucocitos, reclutando monocitos, neutrófilos y otras células efectoras de la sangre a los sitios de infección (Thapa, Welner, Pelayo, & Carr, 2008; Zlotnik & Yoshie, 2012). Sin embargo, muchas tienen funciones homeostáticas en

hematopoyesis, el inicio de la respuesta inmune adaptativa y la vigilancia inmune (Turner, Nedjai, Hurst, & Pennington, 2014).

Las quimiocinas controlan la migración direccional de poblaciones específicas de células inflamatorias a través de un gradiente de concentración y con ello dirigen estas poblaciones celulares al sitio de inflamación, estos mediadores químicos son secretados por una variedad de células y se pueden unir a proteoglicanos ricos en heparina (Koopmann, Ediriwickrema, & Krangel, 1999; Rossi & Zlotnik, 2000).

Actualmente, se han identificado alrededor de 50 subtipos de quimiocinas en humanos, las cuales se clasifican en cuatro clases basados en la secuencia de motivos de cisteínas conservadas, CC, CXC, C y CX3C, siendo X cualquier aminoácido diferente a cisteína. En las quimiocinas CXC, existen las que poseen el motivo ELR (glutamato-leucina-arginina) precediendo al primer residuo de cisteína amino-terminal (Rossi & Zlotnik, 2000; Roy, Evans, & Dwinell, 2014; Scholten *et al.*, 2012).

Las citocinas se unen a receptores específicos en la membrana de las células blanco e inician vías de transducción de señales que al final alteran la expresión génica en las células blanco, la susceptibilidad de esta célula a una citocina particular depende de la presencia de receptores de membrana específicos. La mayoría de los receptores de unión a citocina pertenecen a la familia de receptores de citocina clase I, los miembros de esta familia tienen motivos de secuencias de aminoácidos conservadas en el dominio extracelular, así como un dominio intracelular que permite la transducción de señales. Por otro lado, las quimiocinas ejercen sus funciones quimiotácticas uniéndose a sus receptores, los cuales son proteínas de siete dominios transmembranales acoplados a la proteína heterodimérica G (GPCR's del inglés *G protein-coupled receptors*) (**Esquema 3**) (Kindt *et al.*, 2014; Scholten *et al.*, 2012).



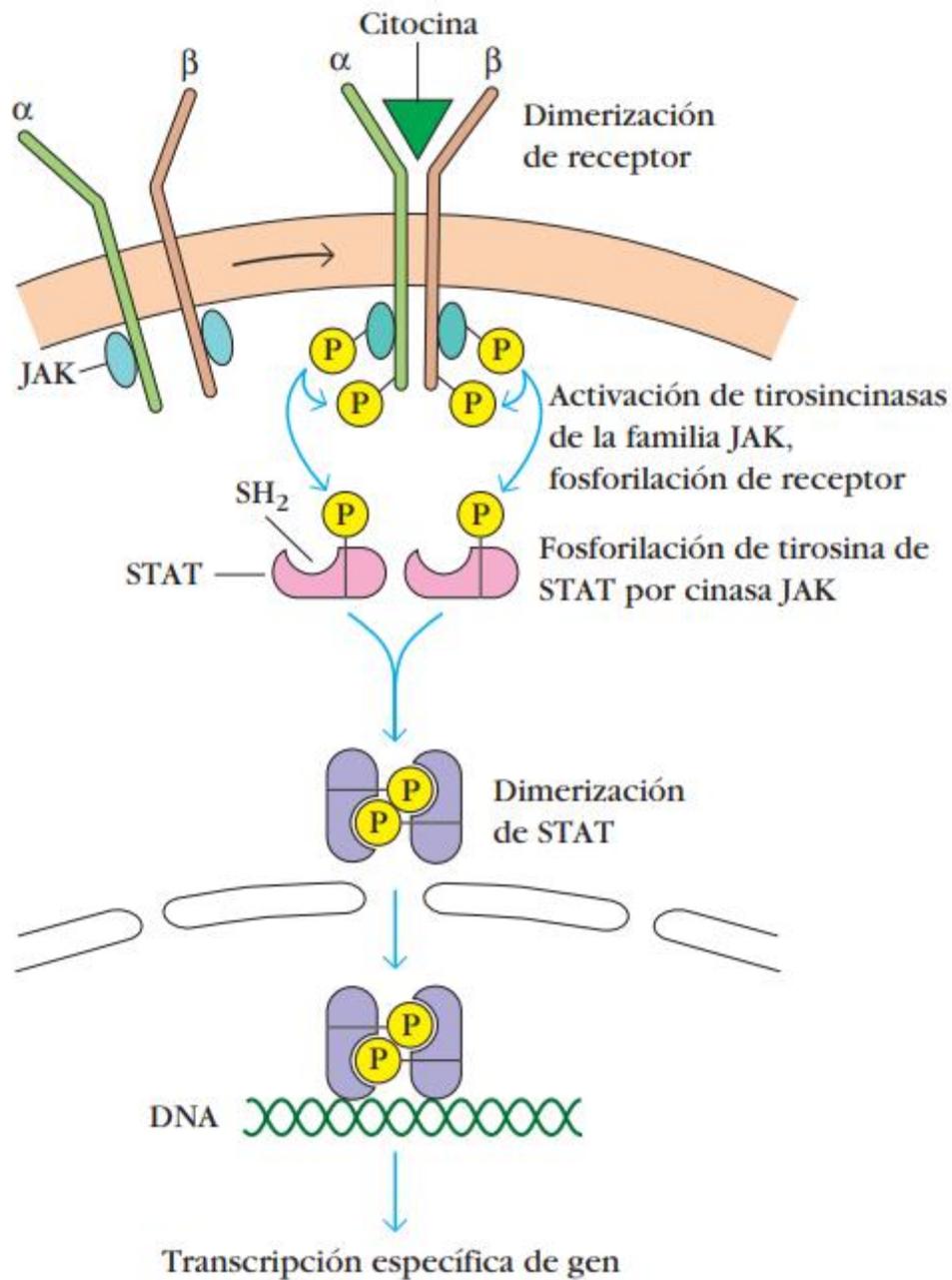
**Esquema 3. Citocinas, quimiocinas y sus receptores.** Las citocinas señalizan vía receptores transmembranales tipo 1, formados por dominios extracelulares para la unión al ligando y dominios intracelulares que permiten la transducción de señales, mientras que la señalización de las quimiocinas ocurre vía la activación de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a la proteína heterodimérica G (Tomado de Turner, *et al.*, 2014).

### 1.3 Transductor de señal y activador de transcripción (STAT)

Las citocinas ejercen sus efectos biológicos uniéndose a receptores específicos expresados en la membrana de células blanco reactivas. Muchos tipos de células expresan estos receptores y son susceptibles a la acción de las citocinas. Cada receptor, percibe estímulos y comienza a transferir señales al núcleo para provocar respuestas vitales. El resultado de este proceso es la regulación de la respuesta inmunitaria al estimular o inhibir la activación, la proliferación y diferenciación de diversas células así como contralar la secreción de anticuerpos u otras citocinas. La señalización a través de la cinasa janus (JAK) y el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT, del inglés *signal transducers and activators of transcription*) desempeñan un papel importante en la transferencia de señales vía receptores de la membrana celular al núcleo (Kindt *et al.*, 2014; Seif *et al.*, 2017).

Las JAK son tipos de tirosin cinasas que se unen a las regiones citoplasmáticas de los receptores de citoquinas tipo I y II. La multimerización de los receptores ocurre cuando los ligandos se unen a sus receptores. La activación de los receptores asociados con los JAK es fundamental para iniciar la transfosforilación de JAK y el posterior reclutamiento de uno o más STAT para ser fosforilados. Eventualmente, los STAT dimerizados ingresan al núcleo y regulan la transcripción de múltiples genes diana (**Esquema 4**) (Niemand *et al.*, 2003).

La vía JAK-STAT es esencial para una amplia gama de citoquinas y factores de crecimiento, lo que lleva a eventos celulares críticos, como la hematopoyesis, la lactancia y el desarrollo del sistema inmunitario y las glándulas mamarias. Así mismo, estas citocinas son esenciales para iniciar y desarrollar respuestas inmunes innatas y adaptativas (Seif *et al.*, 2017).



**Esquema 4. Modelo general de transducción de señales mediada por la mayor parte de los receptores de citocina clases I y II.** La unión de una citocina induce dimerización de las subunidades del receptor, lo que causa la activación de tirosincinasas JAK relacionadas con receptor a través de fosforilación recíproca. Después, las JAK activadas fosforilan varios residuos tirosina, lo que tiene como resultado la creación de sitios de acoplamiento para STAT en el receptor y la activación de uno o más factores de transcripción STAT. Los STAT fosforilados se dimerizan y transponen al núcleo, en donde activan la transcripción de genes específicos (Tomado de Kindt, *et al* 2007).

#### 1.4. Autoanticuerpos contra citocinas y susceptibilidad a infecciones

La autoinmunidad se refiere a una respuesta inmune inapropiada contra componentes propios del hospedero que resulta en condiciones patológicas. Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por una activación de las células T y B auto-reactivas, y pueden ser asociadas con la producción de autoanticuerpos contra moléculas propias, terminando en la inflamación y el daño del tejido (Hewagama & Richardson, 2009; Invernizzi & Gershwin, 2009; Kivity, Agmon-Levin, Blank, & Shoenfeld, 2009).

Como se mencionó anteriormente las citocinas juegan un papel crítico en el montaje de las respuestas contra los microorganismos, debido a su capacidad de regular el sistema inmune innato y adaptativo, en la polarización de las respuestas de células T y actuando como moléculas efectoras. Por lo tanto, se puede concebir que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra cualquiera de estos mediadores químicos, como una consecuencia de la autoinmunidad, afecta a las funciones celulares y a la eliminación de patógenos, predisponiendo al huésped a enfermedades infecciosas (Dinarello, 2003; Maddur *et al.*, 2010; Maródi *et al.*, 2012; Winthrop *et al.*, 2009).

En 2004 Döffinger y colaboradores, describen a un paciente con infección diseminada causada por *M. tuberculosis* y *M. chelonae* que posteriormente falleció por la misma razón, el paciente también desarrolló diabetes autoinmune (tipo I) e hipotiroidismo primario; el suero presentó un alto título de IgG anti-IFN- $\gamma$  capaz de bloquear *in vitro* la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC'S) de donadores normales hacia esa citocina (Doffinger *et al.*, 2004).

Al mismo tiempo, Hoflich y su grupo reportaron el caso de un paciente adulto que en un inicio presentó infecciones graves con *Burkholderia cocovenenans* y subsecuentemente con *M. chelonae*; más tarde, el paciente falleció debido a una severa sepsis. Los autores encontraron una fuerte actividad anti IFN- $\gamma$  inhibitoria en el plasma del paciente e identificaron autoanticuerpos con alta afinidad neutralizante hacia IFN- $\gamma$  (Höflich *et al.*, 2004).

En el año 2005, Kampmann y colaboradores reportan a tres pacientes que mostraron tener altos títulos de anticuerpos que específicamente se unen a IFN- $\gamma$  e inhiben la capacidad de activar la función del macrófago; los autores describen un mecanismo

nuevo basado en el síndrome clínico de infección micobacteriana progresiva en pacientes que no tienen desórdenes inmunológicos reconocidos previamente (Kampmann *et al.*, 2005).

Ese mismo año, otro grupo de investigadores detectó altos títulos de IgG neutralizante anti-IFN- $\gamma$  en el plasma de seis pacientes que presentaban infección diseminada predominantemente con micobacterias de crecimiento rápido. Demostrando que estos anticuerpos tienen una actividad biológica neutralizante del IFN- $\gamma$  *in vitro*, afectando la fosforilación de STAT-1 y la sobre-expresión de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-12), ambos dependientes de IFN- $\gamma$  (Smita Y. Patel *et al.*, 2005).

Posteriormente, en 2009, Baerlecken y colaboradores describen a un individuo con una infección multifocal por *Mycobacterium avium-intracellulare* con un alto título de autoanticuerpos anti-IFN- $\gamma$  en el suero del paciente, quien con un tratamiento de plasmaféresis y ciclofosfamida en conjunto con la quimioterapia antimicobacteriana se logró la remisión del mismo después de tres años de seguimiento (Baerlecken *et al.*, 2009).

Los anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  pueden ser funcionales ya que son capaces de bloquear la producción de TNF $\alpha$  en respuesta a una endotoxina o la expresión de genes inducida vía IFN $\gamma$ , también pueden inhibir la expresión de HLA-II en PBMC's. Estas observaciones sugieren que los autoanticuerpos contra IFN- $\gamma$  pueden inducir una susceptibilidad de inicio tardío a infecciones micobacterianas diseminadas (Kampmann *et al.*, 2005) .

Por otra parte, la presencia de autoanticuerpos contra IL-6 se reportó en el caso de un niño con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente, y por el curso de los eventos clínicos en el paciente los autores mencionan que la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6 pueden preceder a una infección estafilococal (Puel *et al.*, 2008).

Pacientes que sufren de una proteinosis alveolar pulmonar (PAP) presentan anticuerpos neutralizantes contra el Factor Estimulador de Colonia Macrófago/Granulocito (GM-CSF), mostrando una alta mortalidad debido a la enfermedad; los autores confirman una relación entre la función afectada de GM-CSF por la presencia de autoanticuerpos y PAP (Kitamura *et al.*, 1999). Las citocinas Th17 están

implicadas en la protección contra infecciones fúngicas, incluyendo candidiasis, en las superficies mucosales y en varios estudios se ha demostrado que anticuerpos neutralizantes hacia citocinas Th17 predisponen a este tipo de infecciones (Conti *et al.*, 2009; Dubin & Kolls, 2008; Lin *et al.*, 2009). Interesantemente, autoanticuerpos neutralizantes contra citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22 han sido reportados en pacientes con candidiasis mucocutánea crónica (CMC) y además con síndrome poli-endócrino autoinmune-1 (APS-1) o timoma (Kisand *et al.*, 2010; Anne Puel *et al.*, 2010).

Así mismo, en pacientes con poliendocrinopatía autoinmune tipo 1 (APECED, *Autoimmune Poly-Endocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*) causada por mutaciones en AIRE, se reportó la presencia de autoanticuerpos contra citocinas y se estableció una relación entre la autoinmunización contra citocinas y la infección crónica de *Candida* en mucosas tras demostrar que las inmunoglobulinas G's son las responsables de la actividad neutralizante contra IFN- $\omega$ , IFN- $\alpha$ 2a, IL-17A e IL-22 (J. Kärner *et al.*, 2013; Kisand *et al.*, 2011).

Más recientemente, Browne estableció la relación entre autoanticuerpos anti-IFN- $\gamma$  y la diseminación de micobacterias no tuberculosas; se detectó también la presencia de autoanticuerpos anti-GM-CSF en pacientes con meningitis criptococal y en individuos con infecciones de la piel por estafilococos se detectaron autoanticuerpos anti-IL-6. Así mismo, en candidiasis mucocutáneas, relacionadas a APECED o Timoma, se detectaron autoanticuerpos anti-IL-17A, anti-IL-17F, o anti-IL-22 (Browne, 2014).

### **1.5. Ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bioplex**

El ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bioplex (Luminex) es un sistema basado en citometría de flujo, que utiliza microesferas poliestireno con un diámetro de 5.6 micras como el soporte sólido para un inmunoensayo convencional; las microesferas son clasificadas en regiones las cuales presentan un código de color específico que permite la discriminación e identificación de ensayos individuales; éste código es establecido mediante dos colorantes fluorescentes diferentes que se presentan en proporciones que varían de acuerdo a cada región.

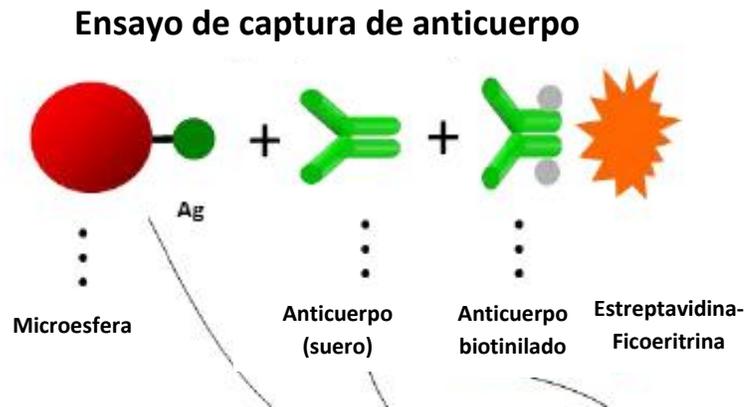
Cada conjunto de microesferas se puede conjugar con una molécula de captura diferente, las microesferas conjugadas por lo tanto pueden ser mezcladas para ser incubadas con la muestra en un pozo de microplaca con filtro de fondo para reaccionar con analitos específicos y posteriormente con la molécula de detección correspondiente. Prácticamente, se pueden medir hasta 100 parámetros individuales simultáneamente en una sola etapa del ensayo. Las microesferas se detectan utilizando un flujo de dos láseres del citómetro, un láser excita los colorantes fluorescentes internos que identifican la región de cada microesfera y el segundo láser excita el colorante informador capturado durante el ensayo.

El ensayo permite la detección y cuantificación de múltiples analitos (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, entre otros) en una sola muestra, empleando un principio similar al ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). La sensibilidad de este método es comparable a un ELISA convencional pero permite investigaciones complejas usando pequeñas alícuotas de reactivos para realizar el ensayo; de igual forma existe una gran flexibilidad para realizar una serie de variaciones en el análisis serológico.

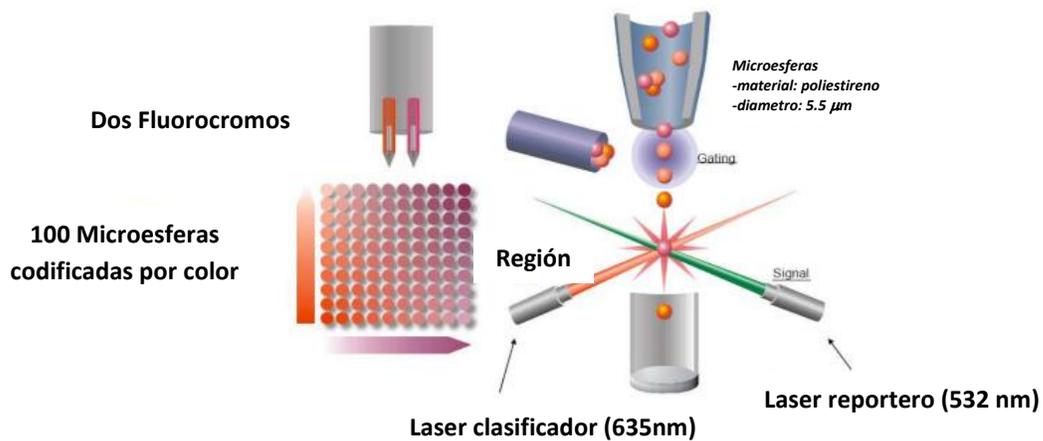
En el caso del ensayo de captura indirecto, cada analito es acoplado covalentemente a microesferas con una región en particular. Posteriormente, se añade la muestra problema para la unión de los anticuerpos específicos al analito y finalmente se agrega un anticuerpo anti-inmunoglobulina especie específico, el cual puede estar conjugado con un fluorocromo (PE, ficoeritrina) o con biotina, para este último caso es necesario utilizar la estreptavidina-ficoeritrina como molécula indicadora (**Esquema 5, Panel A**).

Después de la incubación se realiza la lectura del sistema empleando el lector de Bio-Plex, donde los fluidos de precisión alinean las microesferas a través de una celda de flujo y dos láseres las excitan individualmente, el láser de clasificación rojo excita los colorantes internos de cada microesfera para su identificación específica, mientras que el láser verde excita la molécula indicadora asociada a la microesfera, lo que permite la detección del anticuerpo capturado. El sistema emite señales fluorescentes simultáneamente para cada microesfera, traduciendo las señales en datos (valores de intensidad de fluorescencia) de cada muestra para todos los parámetros medidos (analitos) (**Esquema 5, Panel B**).

PANEL A)



PANEL B)



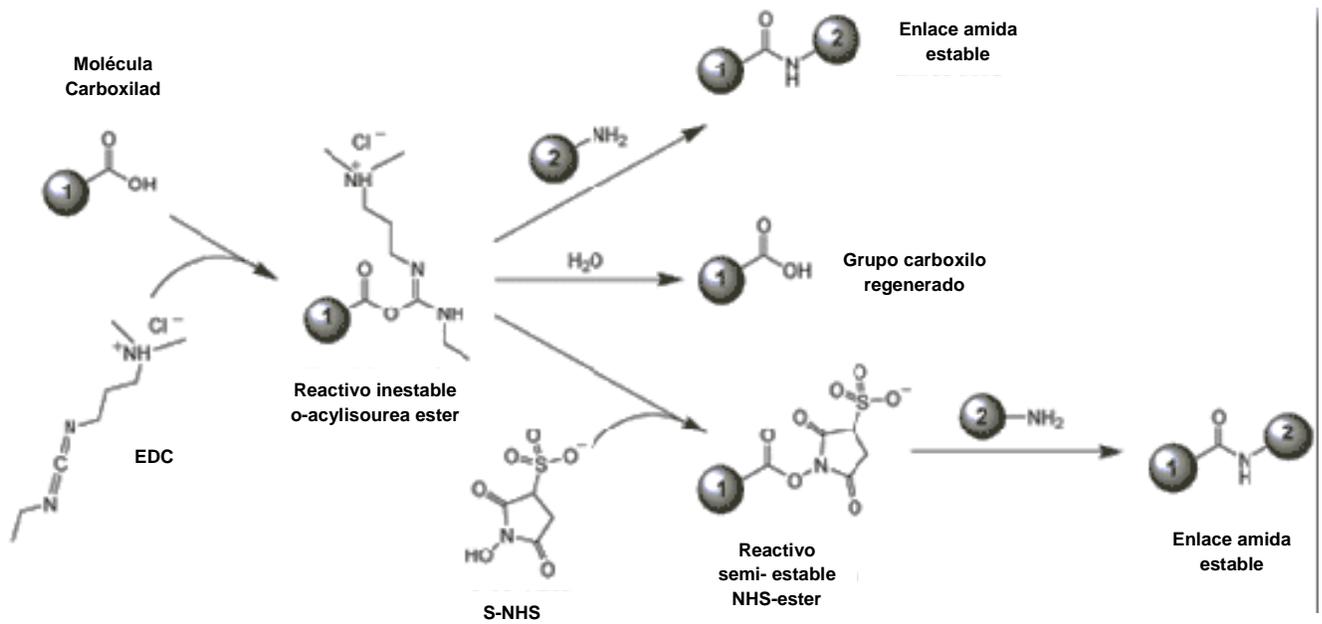
**Esquema 5. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex). Panel A** Inmunoensayo indirecto para la detección de autoanticuerpos contra los diferentes mediadores químicos. **Panel B** Microesferas codificadas ópticamente utilizando una mezcla de diferentes colorantes que son decodificados por un citómetro de flujo. Tomado de Araujo, 2011.

### 1.5.1. Activación de microesferas y acoplamiento proteico

El procedimiento de acoplamiento involucra una reacción carbodiimido en dos pasos; los grupos carboxilo en la superficie de las esferas de poliestireno deben ser primero activados con un derivado carbodiimida adecuado para acoplar la proteína. El EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida) reacciona con los grupos carboxilo en la superficie de las esferas de poliestireno para formar un intermediario activo O-acilisourea, éste intermediario es inestable y requiere ser estabilizado en soluciones acuosas usando S-NHS (N-hydroxysulfosuccinimida) para que se una en el sitio activo. Ambos intermediarios, el carbodiimido O-acilisourea (inestable) y el ester-NHS formados son aminos reactivos; de cualquier forma el NHS ester tiene mayor estabilidad a pH fisiológico. Éstos intermediarios después reaccionan con aminos primarios de las proteínas para formar enlaces amida. El intermediario es hidrolizado, si éste falla en reaccionar con una amina y el carboxilo es regenerado liberando una N-urea no sustituible. Ésta reacción ocurre de forma inmediata y finaliza en cuestión de minutos (**Esquema 6**).

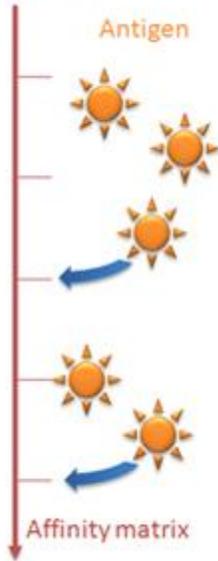
### 1.6. Cromatografía por afinidad

Debido al reconocimiento específico de los anticuerpos, es común emplear la purificación por afinidad con un antígeno inmovilizado como ligando. La eficacia de esta técnica aprovecha los dominios estructurales de los anticuerpos y su capacidad para reconocer específicamente un adsorbente de afinidad, que consiste en un ligando inmovilizado y la matriz a la que está unido el ligando. Este método es ventajoso si se debe obtener un anticuerpo específico a partir de una mezcla de inmunoglobulinas con diferentes especificidades (**Esquema 7**). La purificación de anticuerpos monoespecíficos a partir de sueros de animales inmunizados es un ejemplo típico de tal desafío, la elución del anticuerpo retenido se logra a menudo mediante el uso de un cambio en el pH de la fase móvil, aunque también puede emplearse un agente caotrópico o modificador orgánico. La elución por etapas para obtención de diferentes fracciones se usa frecuentemente durante la purificación de los anticuerpos, donde dichas fracciones se deben de analizar mediante otro método para determinar en cuales de ellas se encuentran los anticuerpo purificados (Huse, Böhme, & Scholz, 2002; Jackson, Sobansky, & Hage, 2012).

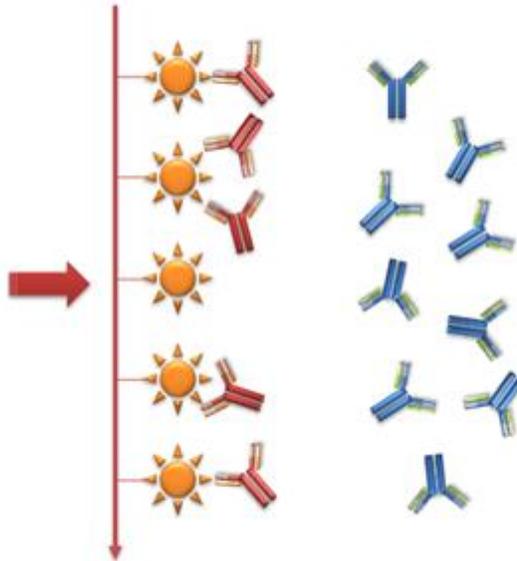


**Esquema 6. Acoplamiento proteico entre las microesferas y las quimiocinas.** Reacción que se presenta entre el grupo carboxilo de las microesferas y las quimiocinas empleando EDC y S-NHS.

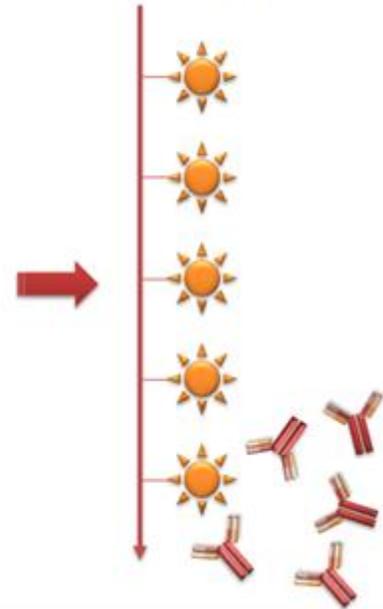
1) Antígeno se une covalentemente a la matriz de afinidad



2) Anticuerpos específicos al antígeno se unen. Los no específicos son lavados



3) Anticuerpos específicos al antígeno son eluidos



**Esquema 7. Cromatografía por afinidad.** La purificación de anticuerpos por afinidad implica 3 pasos principales: 1) Acoplar el antígeno a la matriz. 2) La incubación de una muestra cruda con el soporte de afinidad para permitir que la molécula diana en la muestra se una al ligando inmovilizado y lavar los componentes de muestra no enlazados del soporte. 3) La elución (disociación y recuperación) de la molécula diana del ligando inmovilizado al alterar las condiciones del tampón de modo que ya no se produce la interacción de unión (Magdeldin, 2012).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Con base en la función tan importante que presentan las citocinas y las quimiocinas en el desarrollo y regulación de la respuesta inmunitaria necesaria para el control de las infecciones, así como las publicaciones recientes que reportan una correlación de la presencia, en muestras séricas humanas, de altos niveles de autoanticuerpos contra ciertas citocinas y la predisposición a infecciones causadas por diversos tipos de microorganismos, es importante considerar que estas condiciones podrían afectar o alterar las funciones de las células inmunitarias involucradas en el control y la eliminación de los patógenos. Sin embargo, hasta donde se conoce, no existen publicaciones con respecto a la detección de autoanticuerpos anti-quimiocinas que pudieran estar relacionados a la predisposición a enfermedades infecciosas en humanos, de igual forma no existen este tipo de estudios en otras especies (Browne & Holland, 2010b; Doffinger *et al.*, 2004; Dubin & Kolls, 2008; Höflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005; Maddur *et al.*, 2010; S. Y. Patel, Doffinger, Barcenás-Morales, & Kumararatne, 2008; Smita Y. Patel *et al.*, 2005; A. Puel *et al.*, 2008).

Por lo tanto, resulta interesante especular la presencia de autoanticuerpos en muestras séricas de otras especies (canina), los cuales pudieran estar ejerciendo un efecto sobre la función biológica de sus moléculas dianas, ya que hasta donde sabemos, no existen reportes con respecto a la detección de autoanticuerpos contra mediadores químicos (citocinas) en el área veterinaria. Así mismo, es importante dar continuidad a estudios de detección de autoanticuerpos contra citocinas y quimiocinas en muestras séricas humanas donde éstos pudieran estar implicados en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Existen trabajos donde se ha demostrado que sistemas de citocinas y quimiocinas humanas recombinantes acoplados a microesferas, funcionan adecuadamente para llevar a cabo la detección de autoanticuerpos en muestras séricas de otras especies (equina y canina) (Autran, n.d.; Paulina Cortes, 2016), considerando que existe una alta homología de estas moléculas entre humanos, caninos y equinos. Por lo tanto, para la realización del presente trabajo es de suma importancia disponer de los sistemas de quimiocinas y citocinas humanas recombinantes acopladas a microesferas.

El empleo de sistemas de citocinas o quimiocinas humanas recombinantes acopladas a microesferas para la detección de autoanticuerpos presentes en sueros de otras especies es confiable, tomando en cuenta resultados previos obtenidos en el laboratorio de trabajo, donde se analizaron un total de 100 muestras séricas en caninos (50 sueros de controles negativos y 50 de pacientes con diversas enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas); en todas las muestras séricas del grupo control negativo no se detectaron autoanticuerpos contra ninguna de las citocinas humanas recombinantes analizadas, mientras que de los sueros del grupo de pacientes se reportaron 44 individuos positivos a la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas, principalmente hacia IFN- $\gamma$ , IL-17F, IL17A, IL17B, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-28B e IL-6. Así mismo, en otro trabajo similar donde analizaron muestras séricas caninas empleando sistemas de microesferas que tenían acopladas las quimiocinas humanas recombinantes, los resultados mostraron que de las 17 muestras del grupo de pacientes, en cinco se detectaron autoanticuerpos contra diferentes quimiocinas, siendo los autoanticuerpos contra Eotaxin los más frecuentes (Autran, n.d.; Paulina Cortes, 2016).

Debido a que la presencia de autoanticuerpos contra citocinas y quimiocinas no es comúnmente evaluada en la patogénesis de las enfermedades, la detección de los mismos pudiera considerarse, a futuro, como marcador de gran utilidad para propósitos de diagnóstico, que podría resultar de importancia médica para decidir una terapia y un tratamiento más adecuados para cada paciente en particular.

Por otra parte, resulta interesante realizar el análisis y la determinación de la capacidad neutralizante de autoanticuerpos contra citocinas y quimiocinas, detectados en muestras séricas de pacientes, empleando diversos ensayo *in vitro* para evaluar la inhibición de la función biológica de estos mediadores químicos; considerando que estos autoanticuerpos pueden provocar la pérdida del efecto al tratamiento y probablemente alteraciones de la función inmune, predisponiendo al hospedero a una susceptibilidad a diversos agentes infecciosos.

### **3. HIPÓTESIS**

Las muestras séricas de caninos y humanos con ciertas enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas presentan autoanticuerpos contra citocinas y quimiocinas, así mismo estos autoanticuerpos tienen una capacidad inhibitoria sobre la actividad biológica de dichos mediadores químicos esenciales para el desarrollo de la respuesta inmunitaria.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general.**

Analizar la presencia de autoanticuerpos anti-quimiocinas y anti-citocinas en muestras séricas caninas y humanas con diversas enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas, y evaluar la capacidad neutralizante de algunos autoanticuerpos sobre la actividad biológica de estos mediadores químicos.

### **4.2. Objetivos específicos.**

4.2.1. Elaborar los sistemas de acoplamiento de citocinas y quimiocinas humanas recombinantes que se unirán covalentemente a microesferas carboxiladas.

4.2.2. Evaluar la especificidad, integridad e interferencia antigénica de los sistemas obtenidos utilizando el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión mono- y multiplexing, basado en la técnica de citometría de flujo.

4.2.3. Analizar muestras séricas caninas y humanas de pacientes con enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas, e individuos clínicamente sanos para la detección de autoanticuerpos contra quimiocinas y citocinas empleando la técnica multiplexing Luminex.

4.2.4. Estandarizar la purificación de los autoanticuerpos anti-citocinas (anti-IL-6 y anti-IL-10) de muestras séricas humanas positivas, empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna.

4.2.5. Evaluar la función neutralizante de los autoanticuerpos en muestras humanas contra citocinas (IL-6 e IL-10), analizando la inhibición de la actividad biológica de estos mediadores químicos.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Muestras séricas

La colección de sueros humanos empleada en este estudio fue donada por el Dr. R. Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.). Las muestras séricas correspondientes a caninos analizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el banco de sueros del Laboratorio de Virología Genética y Biología molecular, de la FES-Cuautitlán Campo 4, UNAM. Todos los sueros se distribuyeron en alícuotas y se conservaron a -20C.

Se analizaron aproximadamente 342 muestras séricas en total, de las cuales 209 corresponden a humanos y 133 a caninos. De las 133 muestras séricas de caninos, 86 pertenecen a pacientes y 50 a individuos clínicamente sanos (controles negativos). Las muestras se clasificaron de acuerdo al tipo de enfermedad que presentaban los pacientes como se muestra en el **Cuadro 1**.

Así mismo, de las 209 muestras séricas humanas, 50 eran de individuos clínicamente sanos (controles negativos) y 159 de pacientes con distintos padecimientos. Dichas muestras fueron clasificadas como se observa en el **Cuadro 1**.

Enfermedad	Número de muestras
Autoinmunidad	44
Enfermedades Infecciosas	20
Autoinmunidad e infecciones	19
<b>Subtotal</b>	83
Controles negativos	
Individuos clínicamente sanos	50
<b>Total de muestras analizadas</b>	133

**Cuadro 1. Número de muestras séricas caninas colectadas, ordenadas por grupo de pacientes especificando su padecimiento y de controles negativos.**

Enfermedad	Número de muestras
Autoinmunidad	118
Enfermedades Infecciosas	30
Autoinmunidad e infecciones	7
Otras Enfermedades	4
<b>Subtotal</b>	159
Controles negativos	
Individuos clínicamente sanos	50
<b>Total de muestras analizadas</b>	209

**Cuadro 2. Número de muestras séricas humanas colectadas y analizadas, ordenadas por grupo de pacientes especificando su padecimiento y de controles negativos**

## **5.2. Citocinas, quimiocinas y microesferas**

Considerando que la disponibilidad comercial de citocinas caninas y reactivos relacionados es limitada, se emplearon citocinas humanas recombinantes, por lo que fue necesario demostrar que las citocinas caninas son suficientemente homólogas (porcentaje de similitud) con las citocinas humanas, para permitir un reconocimiento cruzado policlonal sustantivo e informativo. El análisis de homología y la matriz de identidad se realizaron utilizando la base de datos GenBank NCBI® y Protein Data Bank PDB®, el Programa Bioedit® y MEGA 6®, que permiten analizar, reconocer y comparar las secuencias de péptidos de citocinas de estas dos especies diferentes. Los datos del análisis de homología se presentan en el **Cuadro 3**.

Por otra parte, las cuatro citocinas y las siete quimiocinas que se utilizaron para la elaboración de los sistemas se obtuvieron de la compañía R&D Systems, mientras que las microesferas a las que se acoplaron dichos analitos se adquirieron de la marca Bio-Rad.

## **5.3. Obtención de los sistemas de citocinas o quimiocinas acopladas a microesferas y evaluación de la especificidad, integridad antigénica e interferencias entre los sistemas**

Se realizó el acoplamiento de siete diferentes sistemas quimiocina-microesfera y cuatro citocina-microesfera. Los sistemas se analizaron de forma mono-Plex para evaluar el éxito del acoplamiento y la viabilidad de la actividad antigénica de los analitos; para determinar las posibles interferencias entre ellos se empleó el sistema de análisis multi-Plex comparado con el mono-Plex. De la misma forma se evaluó la posibilidad de emplear los sistemas de citocinas y quimiocinas en un solo ensayo multi-Plex. El resto de los sistemas de citocinas fueron donados por el Dr. R. Döffinger.

Número	Citocina o Quimiocina	Porcentaje de Homología	Número de Acceso GenBank Protein/PDB® Citocina Humana	Número de Acceso GenBank Protein/PDB® Citocina Canina
1	IL-17A	99.1	NP_002181.1	UPI0001B05147
2	G-CSF	99.0	AJC19277.1	1BGD_A
3	IL-6	98.9	P05231.1	AAA83030.1
4	IFN- $\gamma$	98.6	NP_000610.2	NP_001003174.1
5	IL-10	98.3	P48411.1	NP_001003077.1
6	IL-17F	97.6	AAC50341.1	BAH89243.1
7	IL-23	97.2	NP_057668.1	NP_112542.1
8	IL-21	97.0	NP_001193935.1	NP_001003347.1
9	IL-22	96.9	AAH69308.1	XP_025332317.1
10	GM-CSF	95.6	AAA52578.1	NP_001003245.1
11	BSA	93.1	NP_851335.1	0.912-0.915
12	IFN- $\beta$	92.8	NP_742152.1	AGN92945.1
13	IFN- $\alpha$	92.8	NP_002167.1	AYN61080.1
14	IL-28	79	AAR24510.1	NP_742152.1
16	IL-27	77.6	AAH62422.1	NP_663611.1
17	IL-15	76	NP_001184117.1	NP_001184117.1
18	TGF- $\beta$	67	NP_000651.3	NP_001003309.1
19	IL-12	64	AAB36675.1	NP_001003293.2
20	TNF- $\alpha$	56	BAF31279.1	NP_001003244.4
21	IL-18	42.5	AAH07461.1	NP_001003169.1
22	IL-8	41.6	NP_001341769.1	NP_001003200.1
23	IL-1 $\beta$	33	NP_000567.1	CAA93909.1
24	IFN- $\gamma$	19.3	AAA52724.1	AAA30852.1
25	LT- $\alpha$	14.5	AAP51435.1	NP_001300778.1
26	IFN- $\gamma$	9.7	P05000 (IFNWMAN)	AAB27160.1.3
15	IL-33	19.5	NP_001340731.1	NP_001003180.1
27	IL-25	-	AAI04932.1	NA
28	IL-6Ra	79.3	NP_000591.1	NP_001003301.1
29	IL-10 viral	-	1VLK_A	NA
30	IL-26	-	NP_060872.1	NA
31	MIP-3a (CCL20)	61.6	NC_000002.12	NC_006607.3
32	MDC (CCL22)	56.2	NC_000016.10	NC_006584.3
33	IP-10 (CXCL10)	--	NC_000004.12	NA
34	Eotaxin (CCL11)	--	NC_000017.11	NA
35	I-TAC (CXCL11)	66	NC_000004.12	NC_006614.3
36	I-309 (CCL1)	66.4	NC_000017.11	NC_006591.3
37	SDF-1a (CXCL12)	67.8	NC_000010.11	NC_006610.3

**Cuadro 3. Homología entre citocinas o quimiocinas de caninos y humanos.** Se presentan los porcentajes de homología entre las citocinas y el número de acceso GenBank Protein/PDB® de las secuencias.

### **5.3.1. Amino acoplamiento de proteínas (citocinas y quimiocinas) a microesferas carboxiladas**

El procedimiento de acoplamiento descrito por Rosenberg en 2016 fue utilizado para unir covalentemente proteínas solubles con un tamaño de 6 a 150 kDa, a microesferas de poliestireno de 5.5  $\mu\text{m}$ , vía grupos carboxilos en la superficie de estas microesferas. Esto se realizó mediante reacciones vía carbodiimida que incluyen los grupos amino de las proteínas primarias y los grupos carboxilo funcionales unidos en la superficie de microesferas de poliestireno. La unión covalente es permanente, sin dejar proteínas sin acoplar después del lavado, aún después de meses de almacenamiento. (Rosenberg et al., 2016)

#### **5.3.1.1. Preparación de la proteína**

La muestra de proteína estuvo libre de azida de sodio, BSA, glicina, Tris o aditivos que contengan aminas, y se resuspendió en PBS, pH 7.4. Las condiciones óptimas de acoplamiento de cada proteína se establecieron para determinar la cantidad de proteína que fue requerida para la reacción de acoplamiento, y para promover la óptima unión a futuro entre la proteína unida y su ligando complementario en el ensayo establecido.

Las muestras de proteína que así lo requirieron se dializaron durante la noche contra PBS, pH 7.4, empleando la unidad de mini diálisis "Slide-A-lyzer" (Thermo Scientific, 69580), siguiendo las indicaciones del instructivo. Brevemente, consistió en depositar 100  $\mu\text{L}$  de la muestra en las unidades de diálisis, las cuales se colocaron en PBS, pH. 7.6 con ayuda de un flotador para que el fondo de las unidades estuviera en contacto con el líquido sin sumergirse completamente; posteriormente el líquido fue agitado a baja velocidad durante 3 horas. Transcurrido éste tiempo el PBS fue reemplazado y se puso en agitación durante 3 horas.

Una reacción de acoplamiento requiere de 5 a 12  $\mu\text{g}$  de proteína dependiendo de la proteína usada. Si el acoplamiento es por primera vez se deben preparar múltiples reacciones de acoplamiento variando las cantidades de proteína usadas para determinar condiciones óptimas de acoplamiento para la proteína ( $\sim 10 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ).

### 5.3.1.2. Activación de las microesferas

1. Las soluciones amortiguadoras fueron llevadas a temperatura ambiente (TA) antes de su uso. Las microesferas se protegieron de la luz tanto como fue posible, cubriendo los tubos con papel aluminio durante el procedimiento.

2. Las microesferas carboxiladas fueron seleccionadas de acuerdo a su región y se agitó 1 mL de cada región ( $1.25 \times 10^7$  microesferas/mL) breve y vigorosamente en el agitador vórtex y posteriormente se sonicaron en un baño ultrasónico durante 1 min por 4 veces.

**NOTA:** Fue importante que las microesferas COOH estuvieran completamente resuspendidas como partículas monodispersas sencillas. Se detectaron visualmente agregados de microesferas como grandes uniones a través de la suspensión. Si se observaban agregados, se sonicaron las microesferas en baño de sonicación durante un máximo de 30 seg y se checaron nuevamente si se habían eliminado los agregados. La sonicación fue repetida hasta que se dejaron de ver agregados en la muestra.

3. Se transfirieron 1000  $\mu$ l ( $1 \times 100 \mu$ L) de microesferas COOH monodispersas ( $1.25 \times 10^7$  microesferas) a cada vial de 2 mL no adherente libre de RNAasa (Ambion, AM12475). Se centrifugaron a 14,000 rpm por 7 min. El sobrenadante fue retirado y removido cuidadosamente del botón de microesferas, empleando una micropipeta y puntas largas.

**NOTA:** El botón de las microesferas es de difícil visualización por lo que se marcó el tubo de reacción del acoplamiento para identificar dónde teóricamente se encontraba localizado el botón dependiendo de la centrifuga utilizada. Para evitar remover el botón se inclinó el tubo del lado del botón en lado opuesto de la pared del tubo y se removió el sobrenadante solamente en la parte frontal de la pared del tubo.

4. Para la escala 10x empleada se resuspendieron las microesferas en 1 mL ( $1 \times 100 \mu$ L) de solución amortiguadora de lavado (solución amortiguadora MES ~100 mM, pH 6.0) (SIGMA, M1317-100ML) y se agitaron en vortex por mínimo 1 min, para posteriormente sonicarlas por 60 seg. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 7 min y el sobrenadante se descartó cuidadosamente como se especifica en párrafos anteriores.

5. El botón de microesferas se resuspendió en 800  $\mu$ L (1x=80  $\mu$ L) de solución amortiguadora de activación (solución amortiguadora MES ~100 mM, pH 6.0) y se agitó en vortex por 60 seg. Posteriormente se sonicaron las microesferas dos veces por 2 min cada vez en un baño ultrasónico.

6. Inmediatamente antes de su uso se prepararon por separado el 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] (EDC, Pierce/Perbio, UK) y el sulfo-N-hidroxisuccinimida (S-NHS, Pierce/Perbio, UK) a 50 mg/mL ambas soluciones, empleando la solución amortiguadora de activación (solución amortiguadora MES ~100 mM, pH 6.0). Se agregaron a las microesferas 110  $\mu$ L (1x ~10  $\mu$ L) de EDC, se agitó brevemente e inmediatamente se agregaron 110  $\mu$ L (1x ~10  $\mu$ L) de S-NHS (ambos recién preparados). La suspensión se agitó en el vórtex a alta velocidad durante 30 seg. El tubo de reacción se cubrió con papel aluminio y fue colocado dentro de un tubo de 50 mL, para fijarlo en el mezclador rotatorio y se agitó a TA durante 30 min.

**NOTA:** Fue esencial que las microesferas permanecieran mezclándose en suspensión durante éste paso de activación.

7. Posterior a la incubación, se agregaron 1,000  $\mu$ L (1x ~150  $\mu$ L) de PBS, pH 7.4 a las microesferas activadas, se agitaron en el vortex brevemente a alta velocidad durante 60 seg. y se centrifugaron a 14,000 rpm por 7 min. Cuidadosamente se removió el sobrenadante con la micropipeta empleando una punta larga diferente para cada región de microesferas y se repitió éste paso.

8. El botón de las microesferas activadas fue resuspendido con 1,000  $\mu$ L (1x ~100  $\mu$ L) de PBS, pH 7.4, se agitó en vortex a velocidad media por 30 seg y se sonicó en el baño ultrasónico durante 60 seg dos veces.

### **5.3.1.3. Acoplamiento proteico**

9. A cada tubo de reacción, conteniendo las microesferas activadas correspondientes a una región en particular, se le agregó una de las distintas muestras de proteínas (citocinas humanas recombinantes diferentes), empleando una concentración de ~10  $\mu$ g/100  $\mu$ L dependiendo de la cantidad disponible de cada citocina; como un control

negativo se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA). El volumen final se ajustó a 1.5-1.8 mL con PBS, pH 7.4, dependiendo del espacio libre y capacidad del vial utilizado. Durante esta reacción de acoplamiento, se cubrió el tubo de reacción con papel aluminio y se mantuvo en agitación en el rotador a TA por 2 h. Posteriormente, las microesferas-citocinas se incubaron en agitación a 4 °C por toda la noche.

**NOTA:** Fue esencial que las microesferas permanecieran en suspensión durante este paso de conjugación.

10. Las microesferas ya acopladas se centrifugaron 14,000 rpm por 7 min, se separó el sobrenadante y cuidadosamente fue colectado en un vial, para almacenarlo a -70 °C.

11. Las microesferas se lavaron con 1,500 uL de PBS, pH 7.4 y se centrifugaron a 14,000 rpm por 7 min, el sobrenadante fue descartado y se repitió el lavado. Es importante no sonicar las microesferas ya acopladas a la proteína.

12. Se resuspendió el botón de microesferas acopladas en 1,000 uL de solución amortiguadora de bloqueo (10 mM PBS, 1% BSA, 0.05% w/v NaN<sub>3</sub>). Y se mantuvieron en agitación a velocidad media con un agitador rotatorio a TA por 30 min, cubriendo siempre las microesferas con papel aluminio para protegerlas de la luz.

13. Las microesferas acopladas y bloqueadas en sus sitios libres, nuevamente fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 7 min, y posteriormente se descartó el sobrenadante.

14. Las microesferas acopladas se resuspendieron en 1,000 uL de solución amortiguadora de bloqueo-almacenamiento (10 mM PBS, 1% BSA, 0.05% w/v NaN<sub>3</sub>). Se mantuvieron a 4 °C hasta ajustar la concentración a 3x10<sup>6</sup> microesferas/mL usando la misma solución amortiguadora de bloqueo-almacenamiento como diluyente.

15. El conteo de microesferas se realizó por cámara de Neubauer (ver punto 5.4.1.4). y se ajustó la concentración a 3x10<sup>6</sup> microesferas por mL.

16. Finalmente, después de ajustar los volúmenes de cada muestra de microesferas considerando la concentración de cada una de ellas, se hicieron alícuotas usando 20 uL de suspensión de microesferas/vial, se etiquetaron y se almacenaron a -70 °C para su uso posterior.

#### 5.3.1.4. Conteo de microesferas con cámara de Neubauer

Inicialmente, se tomaron 3 uL de la suspensión de microesferas acopladas y se depositaron en 57 uL de PBS, para alcanzar un volumen final de 60 uL a una dilución 1/20. Posteriormente, el conteo de éstas se realizó empleando un volumen de 10 uL de la suspensión de microesferas diluida (1/20) para llenar la cámara de Neubauer, y se observó en el microscopio óptico, utilizando el objetivo 40X, contando los cuatro cuadrantes primarios periféricos (CPP) de la cámara.

Así mismo para realizar el conteo correcto de las microesferas se tomaron en cuenta aquellas que se encontraban dentro de los 16 cuadros secundarios periféricos que constituyen los CPP.

Finalmente, el cálculo para determinar la concentración de las microesferas por mL se realizó con la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{microesferas contadas}}{4}\right) (\text{Factor de dilución})(10,000) = \text{Microesferas/mL}$$

Una vez realizado el conteo y obtenido el número de microesferas/mL se ajustó la suspensión a  $3 \times 10^6$  microesferas por mL; para lo cual se determinó el volumen final de cada muestra de microesferas empleando la siguiente fórmula:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Donde,

C1= La concentración de microesferas determinada en el conteo.

V1= El volumen total utilizado para cada muestra de microesferas.

C2= La concentración final requerida ( $3 \times 10^6$  microesferas por mL).

V2= Volumen final necesario para ajustar la C2 de microesferas.

Por lo tanto,

$$V2 = \frac{C1 * V1}{C2}$$

#### **5.4. Evaluación de los sistemas de citocinas acopladas a las microesferas empleando el sistema mono-Plex (Luminex)**

1. Las microplacas se humedecieron de 96 pozos con filtro-BV de 1.2  $\mu\text{m}$  el tamaño del poro (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) agregando 150  $\mu\text{l}$  por pozo de la solución de lavado (PBS-T; 10 mM PBS pH 7.4, 0.05 % vol/vol Tween 20), posteriormente se removió el líquido después de 1-2 minutos mediante un sistema de vacío (Millipore, Núm. Cat. MSVMHTS00).(Rosenberg et al., 2016)

2. Se preparó la suspensión de trabajo de las microesferas acopladas a una citocina en particular a partir de las alícuotas (20  $\mu\text{l}$ ) diluidas en 4,980  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora pre-bloqueadora (10 mM PBS pH 7.4, 1% BSA, 0.05% de  $\text{NaN}_3$ ) en forma individual.

3. Posteriormente se depositaron 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión de trabajo de las microesferas acopladas (previamente agitadas en el vórtex), y se removió el líquido por medio de filtración a vacío.

4. A continuación se agregaron en los pozos correspondientes 50  $\mu\text{l}$  por pozo del anticuerpo anti-quimiocina no biotinilado (anti-SDF-1 $\alpha$ ) a la dilución 1:200, empleando la solución bloqueadora (10 mM PBS pH 7.4, 1% BSA, 0.05% de  $\text{NaN}_3$ , PVA 0.5%, PVP 0.8%) como diluyente y 50  $\mu\text{l}$  por pozo de la solución bloqueadora al resto de la placa. Posteriormente, se incubó la placa por 60 min a TA con agitación lenta (500 rpm) en un agitador orbital horizontal.

5. Después del tiempo de incubación, se removió el líquido de cada pozo empleando el sistema de vacío y se realizó una serie de tres lavados con 200  $\mu\text{l}$  de PBS-T, dejando 2 min en agitación lenta (500 rpm) entre cada lavado. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$  por pozo de los anticuerpos anti-citocinas específicos biotinilados (1:100) en los pozos correspondientes, y para el anticuerpo anti-quimiocina no biotinilado se empleó un anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado (1:100) utilizando la solución bloqueadora como diluyente. Posteriormente se incubaron las placas a TA durante 60 min, con una agitación lenta (500 rpm) empleando el agitador orbital horizontal.

6. Se removió el líquido de cada pozo empleando el sistema de vacío y se repitió la serie de tres lavados con 200 ul de PBS-T, dejando 2 min en agitación lenta (500 rpm) entre cada lavado.

7. Posteriormente se adicionaron 50 ul/pozo de la solución de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (PE), previamente diluida 1:50 empleando la solución amortiguadora bloqueadora. Se protegieron las placas de la luz e incubaron durante 40 min a TA y en agitación (500 rpm) empleando un agitador orbital horizontal (Thermomixer comfort, Eppendorf, Núm. Cat. 22331).

8. Luego del periodo de incubación, se lavaron las placas como se describió anteriormente.

9. Finalmente se agregaron un volumen de 100 ul/pozo de PBS-T y las microplacas se colocaron en el lector Luminex para realizar el análisis correspondiente.

10. Se realizó la evaluación de forma mono-Plex de los sistemas que obtenidos, para la determinación de su evaluación de la especificidad, integridad antigénica.

### **5.5. Determinación de las interferencias entre los sistemas de acoplamiento**

Para la determinación de las posibles interferencias entre los sistemas de acoplamiento, se realizó el ensayo de arreglo de suspensión de microesferas mono- y multi-Plex, empleando la metodología descrita en el apartado anterior y se compararon gráficamente los valores obtenidos de cada una de las determinaciones.

### **5.6. Detección de la presencia de autoanticuerpos contra quimiocinas y citocinas en muestras séricas caninas y humanas mediante el ensayo de arreglo de partículas en suspensión múltiple**

La detección de autoanticuerpos en muestras séricas se realizó en microplacas de 96 pozos (Multiscreen HTS Milipore, UK, Cat MSBVN1210), siguiendo la metodología para la evaluación de los sistemas considerando servir 50 ul de las muestras después de agregar 50 ul/pozo de la suspensión de microesferas a la placa.

Brevemente, se sirvieron 50 ul de las muestras problemas (diluidas 1:100) a cada pozo conteniendo los sistemas citocinas- y/o quimiocinas-microesferas, y se incubaron durante una hora a 37 °C y protegidas de la luz empleando un agitador orbital (Thermomixer comfort, Eppendorf, Cat. 22331). El líquido de los pozos se extrajo utilizando un sistema de vacío (Millipore Cat. MSVMHTS00) y se realizaron tres lavados con PBS-Tween. Se agregaron 50 ul de los anticuerpos de detección (anti-IgG humana o anti-IgG canina) conjugados con PE y se incubó durante una hora en las condiciones anteriores. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados de la microplaca. Finalmente se agregaron 150 ul de PBS-Tween por pozo; se agitó la placa por tres min y se procedió a hacer la lectura en el analizador Bioplex utilizando el software Bio-Plex manager V 3.0 (Bio-Rad).

El análisis de resultados se realizó mediante una agrupación jerárquica entre las citocinas evaluadas y las muestras analizadas utilizando el programa Multiple Experiment Viewer (MeV 4\_9\_0® for Windows 7).

### **5.7. Técnica de cromatografía por columna de afinidad**

Para la purificación de autoanticuerpos se realizó la técnica de cromatografía por columna de afinidad empleando el kit de acoplamiento proteico de microenlace (*Micro Link protein coupling kit, Thermo Scientific Núm. Cat. 20475*). El cual contiene el siguiente material:

- a)** Columnas de centrifugación con resina de acoplamiento amino enlace: cada columna contiene 400 ul de una suspensión al 4 % de perlas de agarosa con 25 % de un compuesto acuoso.
- b)** Solución amortiguadora de acoplamiento pH= 7.2 (Coupling Buffer): Solución salina amortiguadora de fosfatos, 1 paquete rinde en fosfato de sodio [0.1 M] , Cloruro de sodio [0.15 M], pH 7.2 cuando se reconstituye con 400 mL de agua.
- c)** Solución amortiguadora de enfriamiento (Quenching Buffer): 50 mL, 1 M Tris-HCl, 0.05% de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>), pH= 7.4.
- d)** Solución de Cianoborohidruro de sodio al 5 M (NaCNBH<sub>3</sub>, mw 62.84): 0.5 mL, disuelto en NaOH 0.01 M.
- e)** Solución de lavado (Wash Solution): 25 mL, 1 M NaCl, 0.05 % NaN<sub>3</sub>.

**f)** Solución amortiguadora de Elución (Elution Buffer): 50 mL, pH 2.8, contiene aminos primarias.

**g)** Tubos de colección para microcentrifuga: Viales con tapa y con una capacidad de 0.5 mL.

**h)** Solución amortiguadora de almacenamiento: Se prepararán 100 mL de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS; igual que la solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2) conteniendo 0.05 % de NaN<sub>3</sub>.

Almacenamiento del kit: almacenar a 4° C, aunque el producto sea transportado a TA. De forma general el procedimiento de purificación se describe a continuación.

### **5.7.1. Preparación del material**

**Solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2:** Se disolvió el contenido del sobre en 500 mL de agua ultrapura; cuando fue necesario obtener una solución a 10X se disolvió todo el contenido en 50 mL. Para un almacenamiento por largos periodos de la solución amortiguadora filtrar la solución empleando una membrana con un tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m o añadir azida de sodio a una concentración final de 0.02% y almacenar a 4 °C.

**Muestra de proteína:** Se disolvió la IL-10 o la IL-6 recombinante en 400  $\mu$ l de solución amortiguadora de acoplamiento, tratando de ajustar a una concentración final de 0.5-1 mg/mL.

### **5.7.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína**

#### **A) Preparación de la columna e inmovilización de la proteína**

En todos los pasos se requirió mezclar la resina de acoplamiento con la solución amortiguadora para lograr en forma más eficiente se recomienda dar varios impactos suaves a la columna cerca de donde se encuentra el paquete de la resina hasta resuspenderla, y luego cuidadosamente se agitó la columna en un vórtex a baja velocidad. Para asegurar que la resina permaneciera húmeda todo el tiempo se

realizaron los pasos de centrifugación a 1000 g (3 500 rpm en BioFugePico-Heraeus) por 1 minuto.

1. La columna de centrifugación conteniendo la resina de acoplamiento amino enlace, y todos los reactivos a utilizar se equilibraron a TA (37 °C).

2. Primero se aflojó la tapa superior de la columna y luego se removió el tapón inferior para evitar aspirar aire dentro de ésta. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó a 1,000 x g por 30 segundos, para remover la solución amortiguadora de almacenamiento.

3. Se removió la tapa superior y se insertó el tapón. La resina fue suspendida, adicionando 400 ul de la solución amortiguadora de acoplamiento utilizado para disolver la muestra. Después se removió el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó a 1,000 x g por 1 minuto y se descartó el fluido pasante. Este paso se repitió dos veces más.

4. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 400 ul de la muestra (0.5 mg/mL) directamente en la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló. Para determinar la eficiencia del acoplamiento, se reservó una porción de la muestra (10 ul) que fue utilizada como referencia de la cantidad inicial de proteínas (Vial: A).

Nota: Para todos los pasos se mezcló la resina, agitando la columna suavemente o cuidadosamente en un vórtex a baja velocidad.

5. En una campana de extracción, se destapó la columna y se añadieron 5 ul de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se volvió a colocar la tapa y se mezcló.

6. Se dejó incubar la columna durante 2 horas a TA (37 °C), agitando el vial cada hora, para posteriormente incubar toda la noche a 4 °C, con un mezclado rotatorio suave.

Nota: Antes de incubar durante toda la noche se aseguró que la resina se mezclara adecuadamente, por lo que se adicionó una concentración final de 0.05% de Tween-20 (se agregaron a la columna 0.5 ul de Tween-20 para 400 ul de muestra utilizada), esto ayudó para que la resina fluyera libremente en la columna.

7. Posteriormente, se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó 1000 x g por 1 minuto (para coleccionar el fluido con la proteína no unida). Para determinar la eficacia del acoplamiento, se evaluó el fluido pasante con un ensayo de proteínas y se sugiere comparar con la concentración o la cantidad inicial (Vial: B).

8. Se removió la tapa de la columna y se insertó el tapón. Se adicionaron 500 ul de la solución amortiguadora de acoplamiento, se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió el tapón, después se aflojó la tapa, y se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó. Se repitió este paso dos veces más. Se guardó el fluido pasante para evaluar la eficiencia de acoplamiento (Vial: C y D).

Nota: Si la reacción es incubada toda la noche, se invierte cuidadosamente la columna 10 veces para desalojar cualquier resina restante en la tapa. Se afloja la tapa de la columna y se remueve el tapón. Se coloca la columna en un tubo de colección y se centrifuga a 1000 x g, guardando el fluido pasante para evaluar la eficacia del acoplamiento. Se repite este paso dos veces más.

## **B) Bloqueo de los sitios activos de unión remanentes**

1. Se destapó la columna y se insertó el tapón. Posteriormente se adicionaron 500 ul de solución amortiguadora de enfriamiento a la resina pH 7.4, se reemplazó la tapa y se mezcló.

2. Se retiró la tapa de la columna y el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.

3. Se repitieron los pasos 1-2.

4. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 500 ul de solución amortiguadora de enfriamiento directamente a la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló.

5. En una campana de extracción se quitó la tapa de la columna y se adicionaron 10 ul de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se tapó la columna y se mezcló. Se incubó la reacción a TA durante 60 minutos, mezclando cada 15 minutos.

6. Se quitó el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.

Nota: Como la columna se utilizó en forma inmediata fue necesario equilibrarla adicionando 500 ul de solución amortiguadora de acoplamiento y se centrifugó a 1000 x g por 1 minuto, se realizó esto dos veces. Y se continuó con el paso 2 del procedimiento general para la purificación por afinidad (**Punto 5.6.3**).

### **5.7.3. Procedimiento general para la purificación por afinidad**

#### **C) Formación del complejo anticuerpo-antígeno unido a la resina**

1. La columna con la resina conteniendo la citocina se equilibró a TA (37 °C).
2. Se removió primero la tapa de la columna y después el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.
3. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 500 ul de la muestra sérica diluida vol:vol en solución amortiguadora de acoplamiento directamente en la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló.
4. Se incubó la reacción con un mezclado suave en forma de rotación. Se dejó incubar la columna durante 2 horas a TA (37 °C), para posteriormente incubar toda la noche a 4 °C, con un mezclado rotatorio suave.
5. Se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó. Se guardó el fluido pasante para análisis (Vial: E). Para la evaluación se utilizó el sistema citocina-microesfera Bio-Plex.
6. Para reducir las posibles interacciones no específicas se preparó 1 mL de una solución de NaCl a 0.5 M, con la cual se diluyó la solución de lavado vol:vol, y se le adicionó Tween-20 a una concentración final de 0.05%. Se quitó la tapa de la columna, se insertó el tapón y se adicionaron 300 ul de la solución. Se reemplazó la tapa y cuidadosamente se invirtió la columna 10 veces. Se aflojó la tapa, se removió el tapón y se colocó la columna en un tubo de colección. Se centrifugó el tubo y se descartó el fluido pasante. Se repitió este pasó dos veces más (Viales: F, G y H).

7. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 ul de solución de amortiguadora de acoplamiento, se reemplazó la tapa y gentilmente se invirtió el tubo (columna) 10 veces. Se aflojó la tapa y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido obtenido en el vial, se repitió esta paso una vez más (Viales: I y J).

8. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 ul de la solución amortiguadora de acoplamiento, en incrementos de 100 ul, en la superficie interior de la columna para lavar y bajar la resina, fue muy importante no mezclar la resina. Se removió el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, centrifugar y coleccionar el fluido pasante (Vial: K).

#### **D) Elución de los autoanticuerpos anti-citocina**

1. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 300 ul de la solución amortiguadora de elución a un pH 2.8 a lo largo de los lados de la columna sobre la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló. La columna se incubó durante 5 minutos a TA (37 °C).

2. Se destapó la columna y se colocó el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó (Vial: E-1). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 15 ul de Tris 1M, pH 9.0 (5 ul para 100 ul de volumen de elución).

3. Se repitieron los pasos 1 y 2 seis veces o según sea necesario (mínimo 3 veces) (Viales: E-2, E-3, E-4, E-5 E-6 y E-7).

4. Para asegurar la elución completa del anticuerpo de la columna se realizó un cambio de pH de la solución amortiguadora de elución, ajustando 5 mL de esta solución amortiguadora a un pH 2.0 (empleando una solución 1 M de HCl), y un aumento en el volumen empleado, como se indica en los pasos posteriores.

5. Se colocó el tapón a la columna y adicionar 300 ul de la solución amortiguadora de elución a lo largo de los lados de la columna sobre la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló. Se incubó la columna durante 5 minutos a TA (37 °C).

6. Se destapó la columna y se colocó el tapón. La columna se coloca en un tubo de colección y se centrifugo (Vial: E-5). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 18 ul de Tris 1M, pH 9.0 (para 300 ul de volumen de elución).

7. Se repitieron los pasos 5 y 6 según fue necesario (Viales: E-9, E-10, E-11 y E-12).

8. Se regeneró la resina tan pronto como fue posible después de la elución mediante el lavado una vez con 300 ul de Solución de acoplamiento conteniendo azida de sodio al 0.02%. Se almacenó la columna a 4 °C.

9. Finalmente, a cada fracción de eluido (12 fracciones) se le agregaron 30 ul de una solución de BSA al 4.5%; y se conservaron en refrigeración hasta el análisis.

#### **5.7.4. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad**

Nota: Para un almacenamiento por largos periodos (ejem., > 2 semanas), adicionar azida de sodio a la solución amortiguadora de acoplamiento hasta obtener una concentración final de 0.02 %.

1. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 500 uL de la solución de lavado. Se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió la tapa y el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más.

2. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 400 uL de Solución de acoplamiento, se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió la tapa y el tapón inferior, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más.

3. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 400 uL de solución amortiguadora de acoplamiento a lo largo de los lados de la columna para lavar la resina. Se reemplazó la tapa y se almacenó a 4°C.

## **5.8. Determinación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-citocinas (IL-6 y IL-10) sobre la actividad biológica de éstas en ensayos de inhibición *in vitro***

Para analizar la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-citocinas se emplearon líneas celulares, las cuales se estimularon de forma exógena con la citocina humana recombinante (L-6 ó IL-10) o el mitógeno, pre-incubados con la muestra sérica (positiva o negativa a la presencia de autoanticuerpos) o con el medio de cultivo.

Después de 12-24 h de incubación (a 37C, 5%CO<sub>2</sub> y 100% humedad) se compararon los niveles de los efectos de las citocinas neutralizadas por la presencia o ausencia de los autoanticuerpos, con el objetivo de detectar cualquier alteración producida debido a la función neutralizante de los autoanticuerpos específicos sobre la actividad biológica de fosforilación del factor de transcripción STAT-3 inducida por estas citocinas (Puel, 2008).

### **5.8.1. Líneas Celulares**

**a) Células U937:** La línea celular promonocítica U-937 comercializada por la American Type Culture Collection ATCC: U937-DC-Sign ATCC® CRL-3253™, (Sundstrom and Nilsson, 1976). Las células se propagaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina y P-S 5% (v/v) y los cultivos se mantuvieron a 37°C y atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Bajo estas condiciones, las células crecen en suspensión. La viabilidad de las células se determinó por medio del método de exclusión del colorante azul de tripán al 0,4%. Para todos los experimentos, se utilizaron cultivos con más del 90% de viabilidad.

**b) Células Hep3B:** Las células Hep3B fueron donadas por el Dr Matthew Hoare (CRI, Cambridge, UK), provenientes del American Type Culture Collection (ATCC-HB 8064), Rockville, MD, estas son líneas derivadas de carcinoma humano hepatocelular. La suspensión de células Hep3B se obtuvo partir de una concentración de  $1 \times 10^7$  cels/ml, empleando el medio de cultivo DMEM Suplementado 10% SFB, penicilina-estreptomina y L-Glutamina, para la expansión de las células se empleó 5 ml de tripsina en una caja de 150 ml con 70-80% de confluencia (Frascos tipo T75 de cultivo celular, 75 cm<sup>2</sup>, con rosca con filtro, Cat. # 174952., Thermo Scientific, Fisher®, Tripsina (Sigma Aldrich®, Cat. No. 7924).

### **5.8.2. Ensayo de inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10 empleando la técnica de Luminex, para evaluar la función biológica de autoanticuerpos anti-IL-10**

La determinación de los niveles de fosforilación de STAT-3 se cuantificó mediante el uso del kit Bio-Plex Pro *Cell Signaling Assays* (Bio-Rad, Núm. Cat. 10024929) empleando la citocina rh-IL-10 (ImmunoTools).

Se emplearon seis muestras diferentes de sueros humanos con niveles altos de autoanticuerpos anti-IL-10, simultáneamente se incluyeron como controles negativos sueros de individuos con títulos bajos o nulos de autoanticuerpos previamente evaluados.

#### **5.8.2.1 Pre-incubación de la rhIL-10 con las muestras séricas para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10 en células U937**

Se colocaron en diferentes viales 25  $\mu$ l de tres diferentes concentraciones de IL-10, 50 ng/ml, 25 ng/ml o 10 ng/ml; a cada uno de los viales se les adicionaron 25  $\mu$ l de la muestra sérica positiva o negativa. Como control positivo del sistema se emplearon las diferentes concentraciones de IL-10 con el anticuerpo monoclonal anti-IL-10 a una concentración de 500  $\mu$ g/mL. El control negativo del sistema fue cada una de las condiciones anteriores sin IL-10 volumen que fue sustituido por DMEM. Así mismo, se incluyeron las diferentes concentraciones de IL-10 sin muestra sérica, volumen que fue sustituido con DMEM. Así como la condición sin estímulo ni muestra sérica o autoanticuerpo (50  $\mu$ l de DMEM por vial).

#### **5.8.2.2. Activación de la fosforilación de STAT3 en U937 con IL-10**

De una suspensión celular  $2 \times 10^6$  células/mL, se depositaron 500  $\mu$ l/vial ( $1 \times 10^6$  células) en tubos de 1.5 mL. Cada vial se centrifugó a 1000 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron con 50  $\mu$ l de cada una de las soluciones pre-incubadas anteriormente. Todos los viales continuaron con una incubación de 30 min a TA.

### **5.8.2.3. Lisis celular.**

Las células se lavaron con 500 µl de solución de lavado en frío y se centrifugaron a 1000 g por 5 min. El sobrenadante se retiró con una micropipeta. Posteriormente se les adicionó 250 ul del solución de lisis (1X Buffer Lisis frío) con el inhibidor de proteasas recién preparado (PMFS 500 nM). Se agitó suavemente el lisado durante 20 minutos a 4 C (incubando en hielo) en un agitador orbital (roto-shake genie, Scientific industries) en velocidad 6 y modo rock.

### **5.8.2.4. Determinación de la concentración de proteínas totales**

La concentración de trabajo para proteína sugerida para análisis de señalización es 200 ug/ml (0.15-10 ug/pozo). Para obtener la concentración de proteína deseada se utilizó el kit Bio-Rad® DC Protein Assay Cat. No. 500#0112, y se ajustó la concentración de proteína con la solución de lisis frío (1X Bio-Rad Lysis Buffer).

### **5.8.2.5. Preparación de las microesferas con el anticuerpo de captura**

Las microesferas de captura BioRAD® son suministradas como una solución stock 20X y deben protegerse de la luz; estas se agitaron en el vórtex durante 1 min.

Las microesferas fueron diluidas a 1X combinando 150 ul de éstas con 2.85 mL de la solución de lavado (volumen necesario para 56 pozos, empleando 50 ul/pozo). Se agitaron las microesferas de captura en el vórtex por 15 segundos.

### **5.8.2.6. Preparación del anticuerpo de detección biotinilado y de la estreptavidina-PE**

La solución de dilución contenida en el Kit fue usada para preparar los anticuerpos de detección biotinilados y la estreptavidina-PE. La solución 20X del anticuerpo de detección biotinilado se agitó en el vórtex por 10 segundos, posteriormente se diluyó 1/20 empleando 75 ul de este anticuerpo con 1425 ul de la solución de dilución (volumen suficiente para 56 pozos de la placa, 25 ul/pozo).

Posteriormente en el vórtex se agitó la estreptavidina-PE (SAPE) 100X por 10 segundos y se diluyeron 30 ul de esta en 2,970 ul de solución de resuspensión.

#### **5.8.2.7. Medición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10 empleando la técnica de Luminex**

1. Se humedecieron las microplacas de 96 pozos con filtro-BV de 1.2 um el tamaño del poro (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) agregando 150 µl por pozo de la solución de lavado, posteriormente se removió el líquido después de 1-2 minutos mediante un sistema de vacío (Millipore, Núm. Cat. MSVMHTS00).
2. En forma independiente, se centrifugaron los lisados celulares a 15,000 g durante 10 minutos.
3. Posteriormente en cada pozo de la microplaca humedecida se depositaron 50 ul de la suspensión de microesferas-anticuerpo de captura ya preparadas (previamente agitadas en el vórtex), y se removió el líquido por medio de filtración a vacío. Se realizaron dos lavados con 150 ul por pozo de buffer de lavado.
4. A continuación se agregaron en los pozos correspondientes 50 ul de los lisados celulares, usando como blanco la solución de dilución del anticuerpo. Las placas se incubaron durante 18 horas a TA con agitación lenta (450 rpm) en un agitador orbital horizontal.
5. Después del tiempo de incubación, se removió el líquido de cada pozo empleando el sistema de vacío y se realizó una serie de tres lavados con 150 ul de buffer de lavado. Se agregaron 25 ul por pozo del anticuerpo anti-phosphoSTAT-3 biotinilado de detección en todos los pozos. Posteriormente se incubaron las placas a TA durante 30 min, con una agitación lenta (450 rpm) empleando el agitador orbital horizontal.
6. Se removió el líquido de cada pozo empleando el sistema de vacío y se repitió la serie de tres lavados con 150 ul de solución de lavado de lavado, dejando 2 min en agitación lenta (500 rpm) entre cada lavado.

7. Posteriormente se adicionaron 50 ul/pozo de la solución de estreptavidina acoplada a ficoeritrina (PE) previamente diluida (1/100). Se protegieron las placas de la luz e incubaron durante 10 min a TA y en agitación (450 rpm) empleando un agitador orbital horizontal (Thermomixer comfort, Eppendorf, Núm. Cat. 22331).
8. Luego del periodo de incubación, se lavaron las placas como se describió anteriormente.
9. Finalmente se agregó un volumen de 125 ul/pozo de solución de resuspensión contenida en el Kit, se agitaron las placas durante 30 segundos en un agitador orbital horizontal y se colocaron en el lector Luminex para realizar el análisis correspondiente.

### **5.8.3. Ensayo de inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex, para evaluar la función biológica de autoanticuerpos anti-IL-6.**

La determinación de los niveles de fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6 se cuantificó mediante el uso del kit Bio-Plex Pro *Cell Signaling Assays* (Bio-Rad, Núm. Cat. 10024929) siguiendo la metodología y las condiciones de preincubación descritas en el punto 5.7.2., pero para este caso se utilizaron la citocina rh-IL-6 (Sigma-Aldrich) y las células Hep3B.

Así mismo, se emplearon dos muestras diferentes de sueros humanos con niveles altos de autoanticuerpos anti-IL-6, simultáneamente se incluyeron como controles negativos sueros de individuos negativos a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6, previamente evaluados.

### **5.9. Análisis estadístico.**

Las gráficas y el análisis estadístico se llevarán a cabo usando el programa informático GraphPad Prism versión 7.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, (<http://www.graphpad.com>).

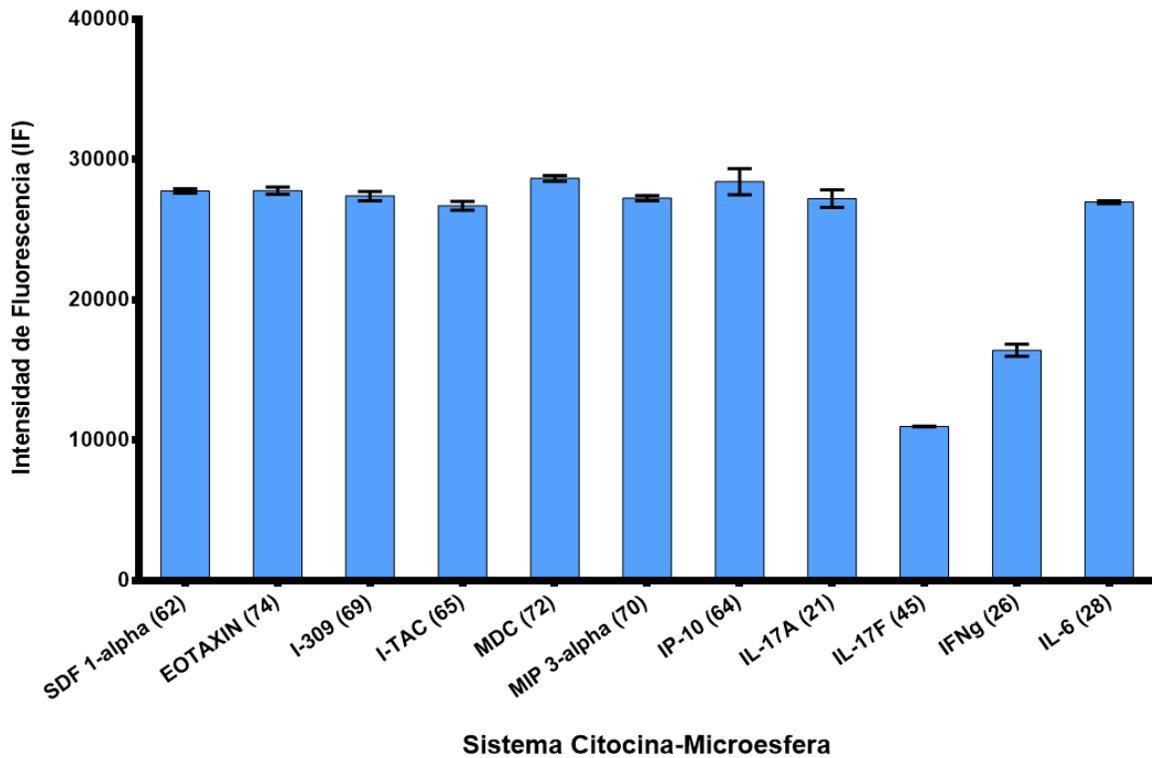
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Evaluación del acoplamiento proteico, la integridad antigénica y la especificidad de cada sistema citocina- o quimiocina-microesfera empleando anticuerpos específicos para cada citocina

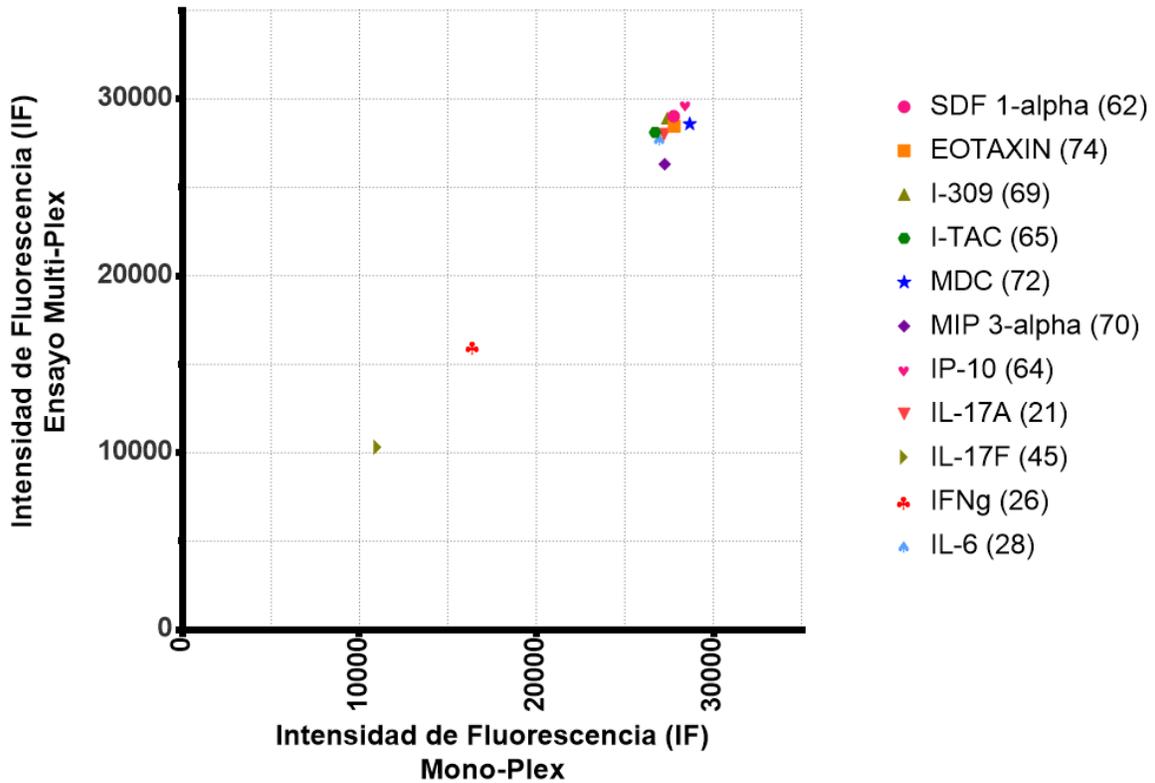
Se realizó el acoplamiento de diferentes sistemas citocinas-microesfera, los cuales fueron evaluados de forma monoplex utilizando los anticuerpos biotinilados específicos para cada una de ellas. Cada sistema se evaluó por triplicado y se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar (SD) de cada uno de ellos. En la **Figura 1** se observan los valores promedios de intensidad de fluorescencia ( $\pm$ SD) obtenidos para cada uno de estos sistemas, donde se puede apreciar que dichos valores fueron mayores a 10,000 de IF, indicando que existió un alto grado de acoplamiento covalente entre los grupos aminos primarios de las citocinas y los grupos carboxilos funcionales que se encuentran en la superficie de las microesferas; así como una integridad antigénica viable de los sistemas.

### 6.2. Determinación de las interferencias entre los diferentes sistemas de citocinas- o quimiocinas-microesferas elaborados

Para determinar las posibles interferencias que pudieran presentarse entre los diferentes sistemas acoplados, los anticuerpos específicos para cada citocina (controles positivos) fueron evaluados empleando el ensayo monoplex (para cada sistema citocina-microesfera en forma individual) y el ensayo multiplex (11plex, todos los sistemas simultáneamente). En la **Figura 2** se muestran los resultados de este análisis, donde es posible observar que la mayoría de los sistemas no mostraron interferencias considerables, presentando valores de intensidad de fluorescencia muy similares cuando se analizaron en forma individual y en forma múltiple (11plex), es decir no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las lecturas de ambas formas (monoplex y multiplex), empleando la *t* student como prueba de hipótesis,  $p < 0.05$ .



**Figura 1. Evaluación de los sistemas de citocinas-microesferas acoplados.** Valores de intensidad de fluorescencia obtenidos en los sistemas de acoplamiento de las citocinas a los diferentes grupos de microesferas; utilizando los anticuerpos monoclonales (MAb's) biotinilados específicos para cada citocina. Se muestra el valor promedio  $\pm$ SD de triplicados de la intensidad de fluorescencia obtenida para cada sistema de forma monoplex.



**Figura 2. Determinación de las interferencias entre los diferentes sistemas citocinas acopladas a las microesferas.** Los valores promedio de las intensidades de fluorescencia de triplicados para cada sistema citocina-microesfera medidos en forma múltiple (7plex, eje Y) y monoplex (eje X), empleando los anticuerpos monoclonales (MAb's) biotinilados específicos para cada citocina, son graficados uno contra otro. Ningún sistema presentó diferencias estadísticamente significativas entre las lecturas de ambas formas (prueba *t* student,  $p < 0.05$ ).

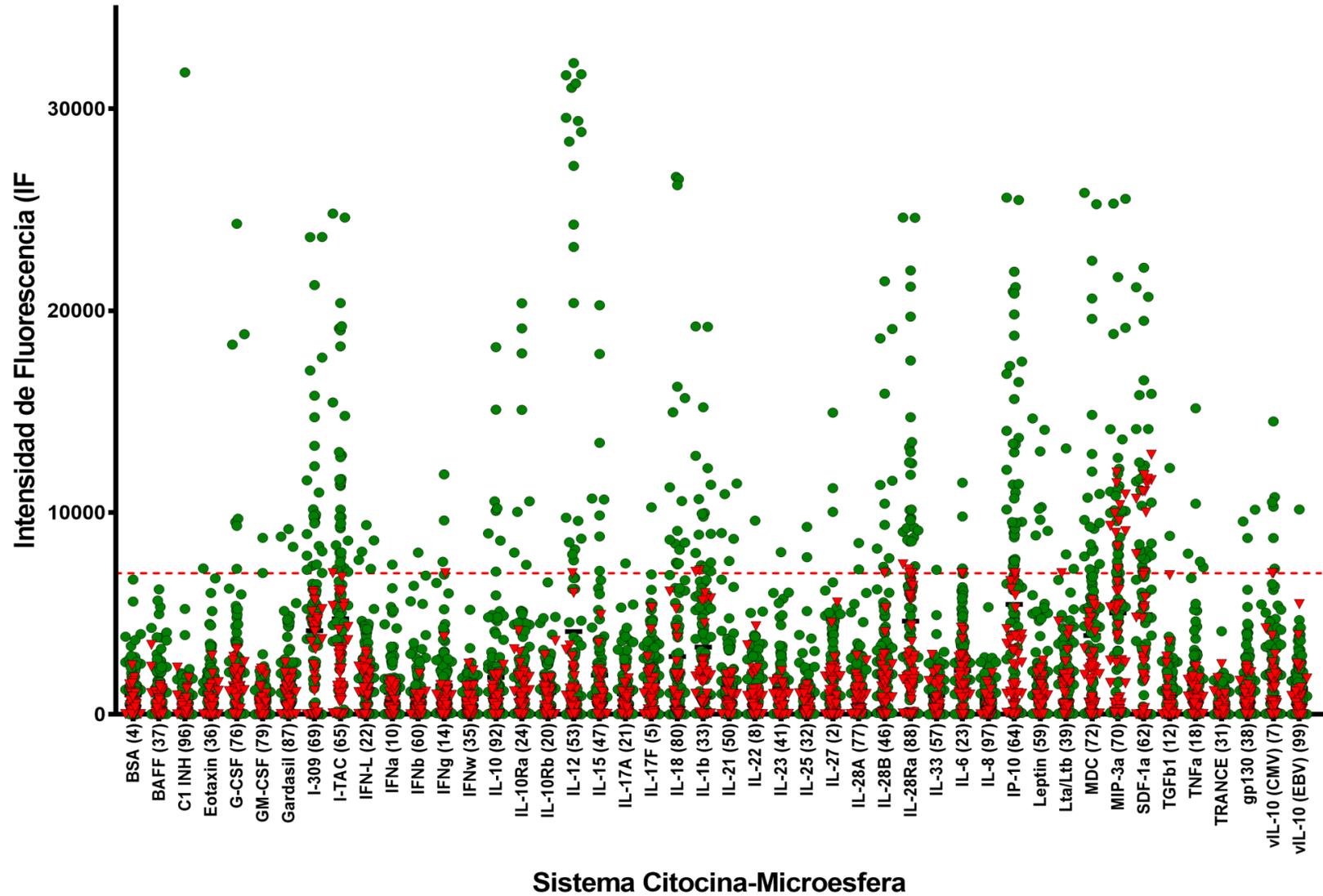
### **6.3. Análisis serológico para la detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas de caninos y humanos mediante el ensayo de arreglo de partículas en suspensión múltiple**

Para la detección de la presencia de autoanticuerpos en muestras séricas de las diferentes especies se realizó el ensayo Multi-plex empleando 46 diferentes sistemas citocina-microesfera, utilizando una dilución de 1/100 de las muestras séricas analizadas.

#### **6.3.1. Análisis serológico en muestras caninas**

Se analizaron un total de 133 muestras séricas caninas, las cuales fueron clasificadas en cuatro grupos, aquellas que correspondieron a enfermedades autoinmunes (AID, n=44), enfermedades infecciosas (ID, n=20), enfermedades autoinmunes e infecciosas (AID/ID, n=19) e individuos clínicamente sanos (HC, n=50) (controles negativos). De acuerdo al tipo de enfermedad, los resultados del análisis de la presencia de autoanticuerpos en muestras séricas de caninos se muestran en las **Tablas 1, 2 y 3** (ver Apéndice 1), en donde los pacientes señalados en color corresponden a animales positivos con altos niveles de autoanticuerpos ( $\geq 15,000$ ) contra más de una citocina, mientras que en la **Tabla 4** corresponde a los individuos clínicamente sanos.

Los resultados revelaron que 51 de 83 (61%) muestras del grupo de pacientes presentaron autoanticuerpos contra al menos una citocina dado que mostraron valores de intensidad de fluorescencia considerables ( $\geq 7,000$ ) correspondientes a anticuerpos contra diez diferentes citocinas (IL-1b, IL-10, vIL-10 CMV, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-28B, G-CSF, Leptin), dos receptores (IL-10Ra e IL-28Ra) y seis quimiocinas (I-309, MIP-3a, MDC, IP-10, I-TAC, SDF-1a). Por otra parte en el grupo de controles, todas las muestras resultaron negativas a autoanticuerpos contra los 46 analitos analizados con excepción de nueve muestras en las que se detectaron valores medios de intensidad de fluorescencia ( $< 13,000$ ) para la presencia de anticuerpos contra únicamente dos quimiocinas (MIP-3a y SDF-1a), dichos resultados se muestran en la **Figura 3**.



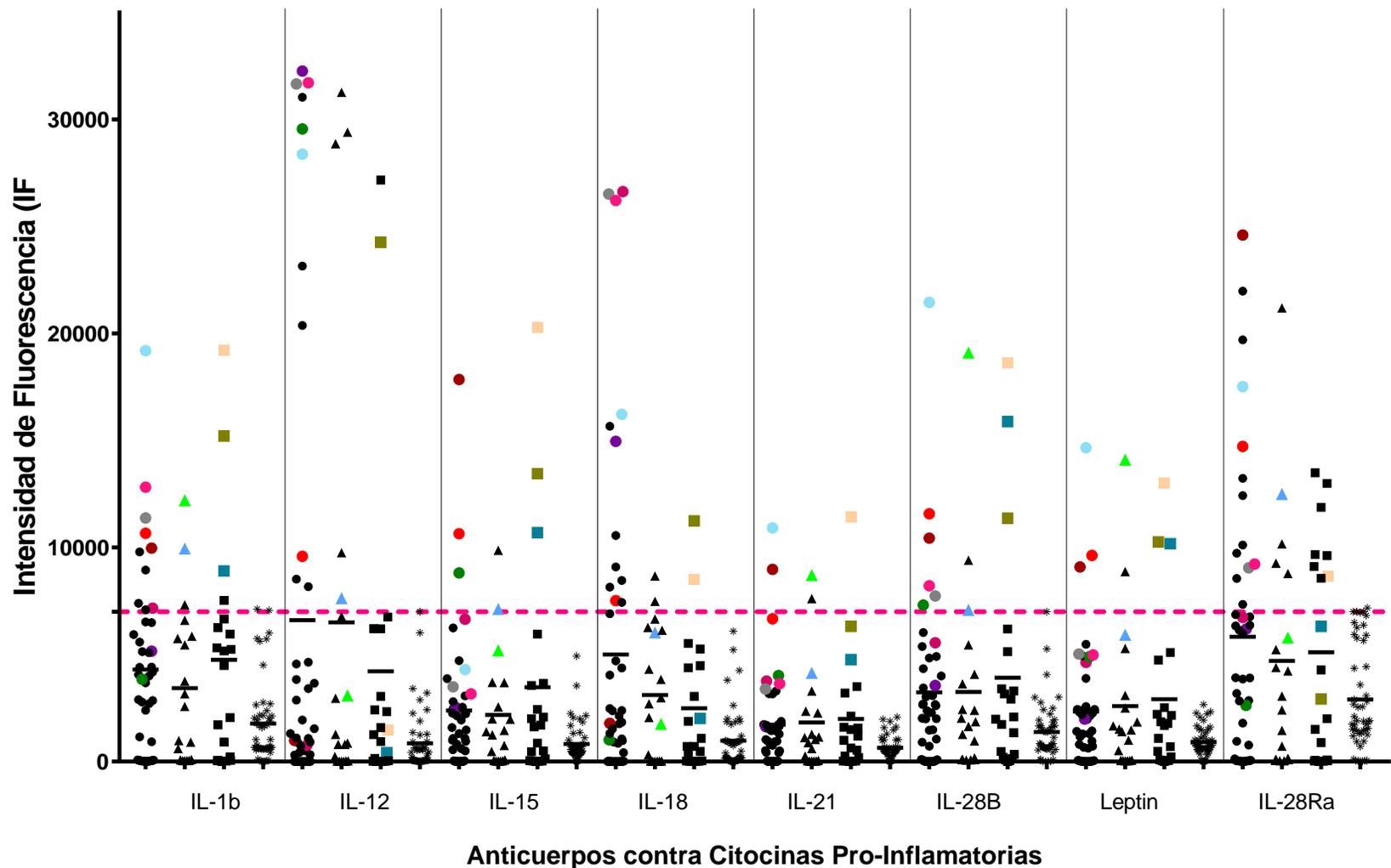
**Figura 3. Detección de auto-anticuerpos anti-citocinas y anti-quimiocinas en muestras séricas caninas mediante el sistema 46-plex citocina-microesfera.** Se grafican los valores promedio de la IF para los 46 sistemas. Se incluye el sistema de la BSA como control negativo. Donde (●) representa las muestras séricas, y los (▼) representan individuos control.

En la **Figura 4** se presentan los resultados de la presencia de autoanticuerpos contra ocho citocinas proinflamatorias y un receptor, de las 133 muestras séricas de caninos analizadas, donde se puede observar que autoanticuerpos contra IL-18 e IL-12 así como contra el IL-28Ra presentan los valores más altos ( $\geq 15,000$ ) de intensidad de fluorescencia principalmente en el grupo de pacientes con enfermedades autoinmunes.

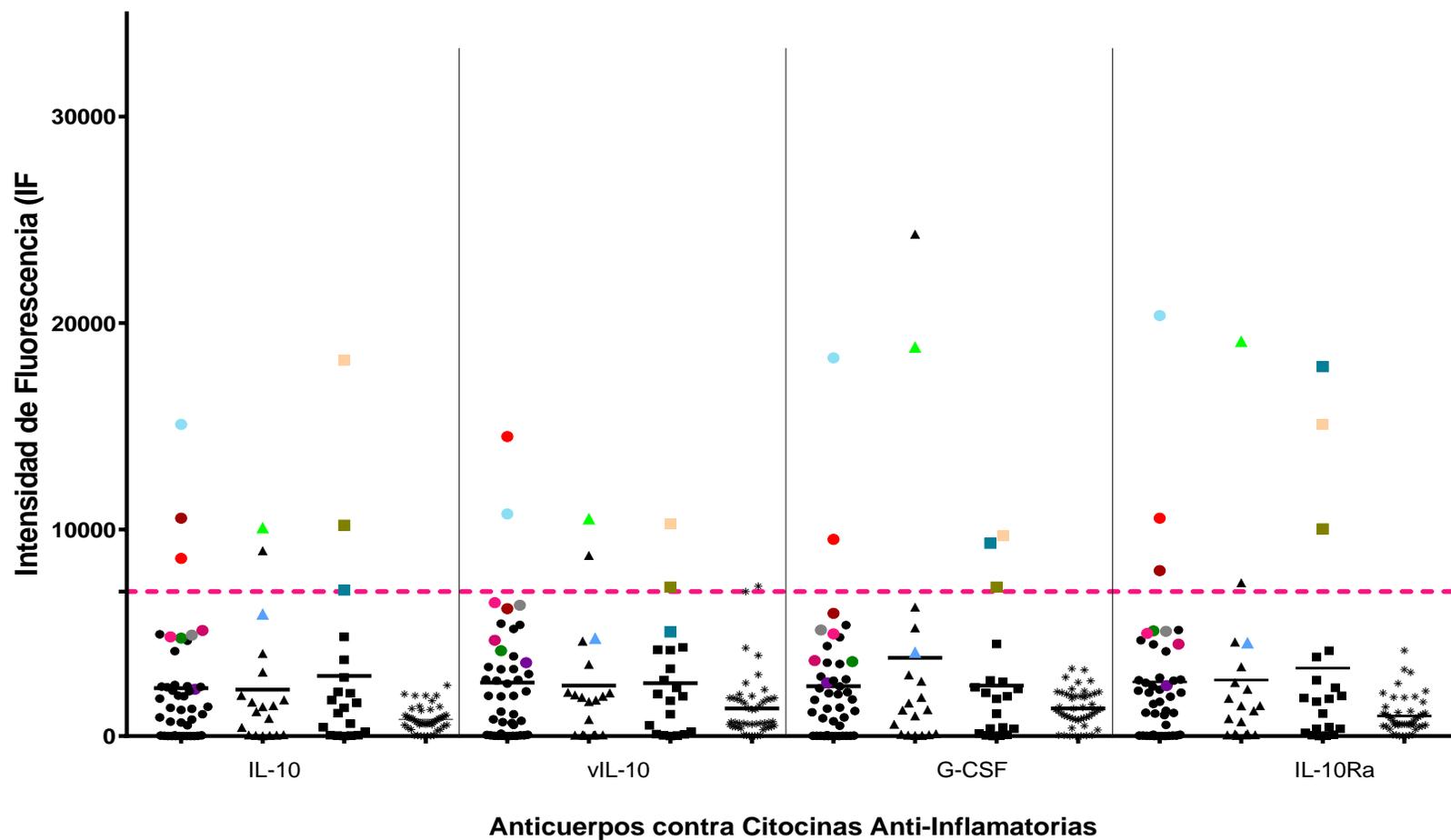
Por otra parte, en el análisis de la presencia de autoanticuerpos contra tres citocinas anti-inflamatorias y un receptor (IL-10Ra), se observó que los autoanticuerpos contra la IL-10 y el IL-10Ra fueron los que tuvieron mayores valores de IF, principalmente en los grupos de pacientes con enfermedades infecciosas (**Figura 5**).

Así mismo, en la **Figura 6**, se puede observar que algunas muestras del grupo de pacientes con enfermedades autoinmunes presentaron altos niveles de anticuerpos contra las seis quimiocinas reportadas, mientras que solo una muestra del grupo de enfermedades infecciosas presenta valores altos ( $\geq 15,000$ ) de intensidad de fluorescencia en anticuerpos contra tres quimiocinas (IP-10, I-TAC y SDF-1a).

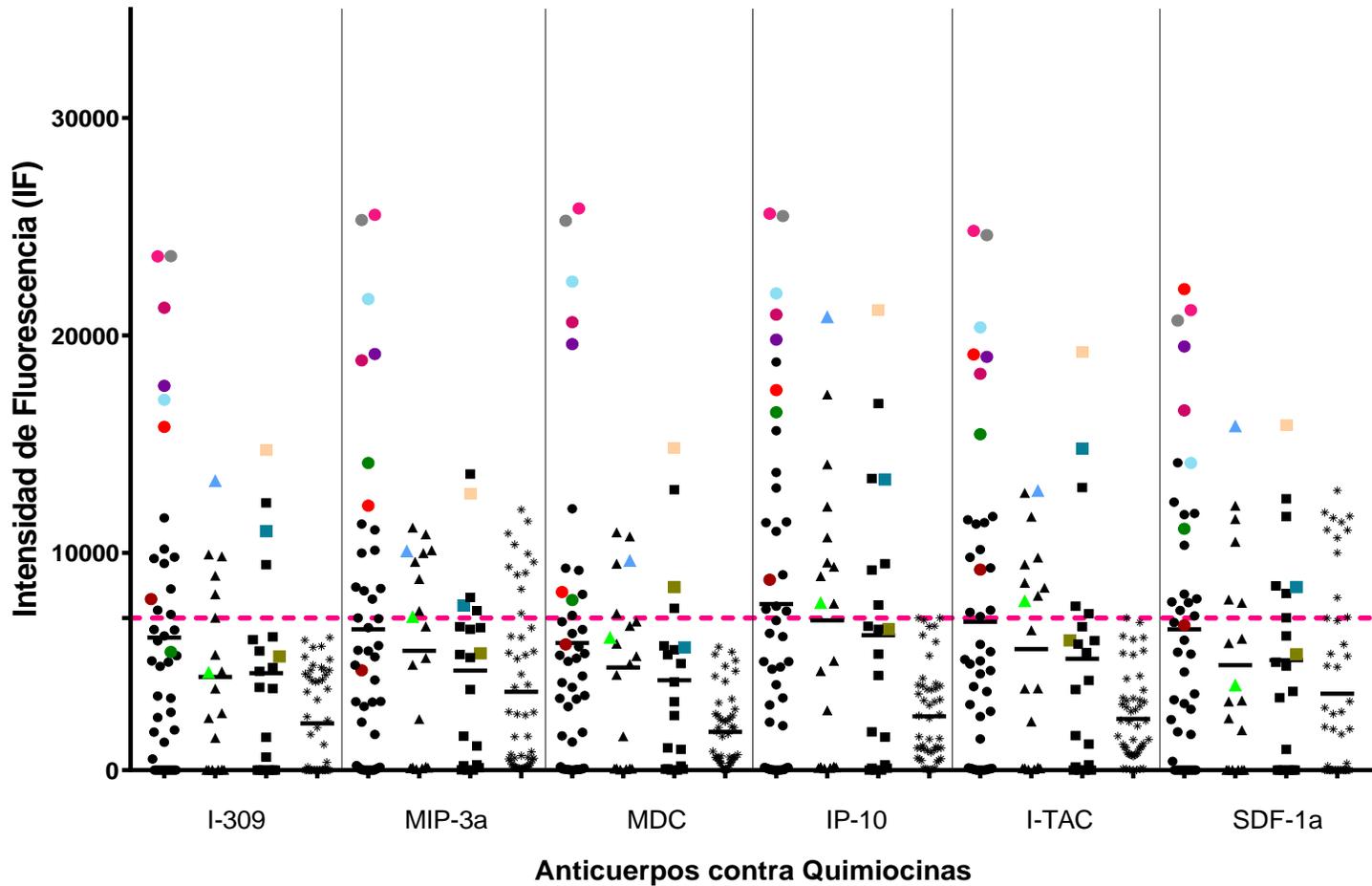
Por lo tanto, 29 de las 83 muestras caninas de pacientes presentaron valores de intensidad de fluorescencia altos ( $\geq 15,000$ ) para la presencia de autoanticuerpos contra al menos una de las siete citocinas altamente reconocidas (IL-1b, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-28B, G-CSF), seis quimiocinas (I-309, MIP-3a, MDC, IP-10, I-TAC y SDF-1a) y dos receptores (IL-10Ra y IL-28Ra). La **Figura 7** corresponde al mapa de calor de los valores de intensidad de fluorescencia de estas muestras séricas, las cuales pertenecen a los tres grupos de pacientes (AID, ID y AID/ID); donde el programa *Multiple Experiment Viewer* reporta los valores de intensidad de fluorescencia empleando una escala de colores, el gradiente de negro a azul representa los valores bajos ( $< 7,000$ ), de verde a naranja los valores intermedios ( $> 7,000$  y  $< 15,000$ ) y rojo los valores altos ( $\geq 15,000$ ); así mismo dicho programa realiza en forma automática agrupaciones considerando los valores.



**Figura 4. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas pro-inflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.** Valores promedio de intensidad de fluorescencia de muestras séricas de caninos (n=133) analizadas. Las enfermedades fueron agrupadas en: ● Enfermedades autoinmunes (n=44), ▲ Enfermedades autoinmunes e infecciosas (n=19), ■ Enfermedades infecciosas (n= 20), se incluyen también \* los individuos sanos (n=50); Los símbolos en color corresponden a animales positivos con algunos niveles de autoanticuerpos (≥15,000) contra más de una citocina.

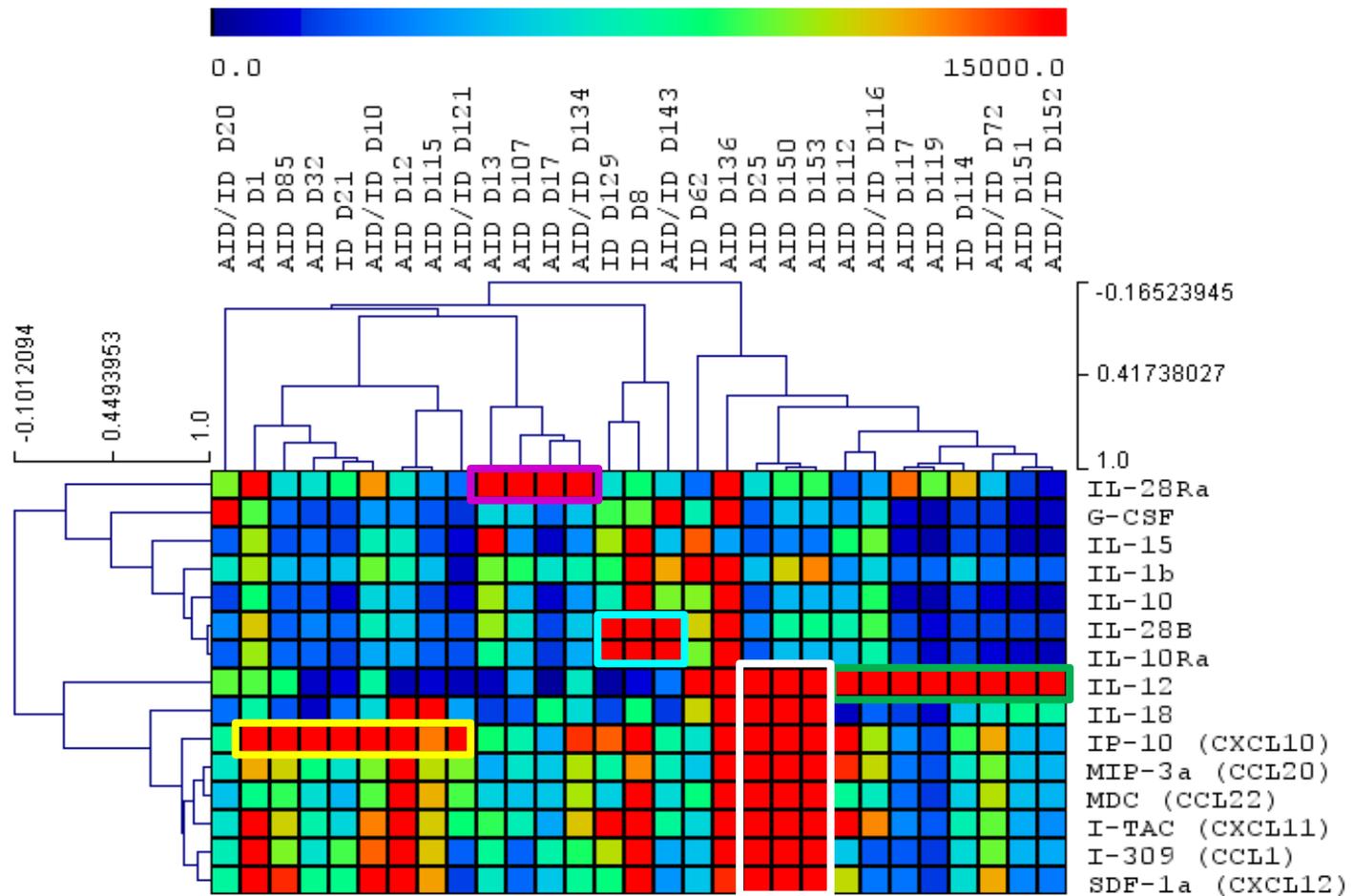


**Figura 5. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas anti-inflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.** Valores promedio de intensidad de fluorescencia de muestras séricas de caninos (n=133) analizadas. Las enfermedades fueron agrupadas en: ● Enfermedades autoinmunes (n=44), ▲ Enfermedades autoinmunes e infecciosas (n=19), ■ Enfermedades infecciosas (n= 20), se incluyen también \* los individuos sanos (n=50); Los símbolos en color corresponden a animales positivos con altos niveles de autoanticuerpos (≥15,000) contra más de una citocina.



**Figura 6. Patrón de autoanticuerpos contra quimiocinas en pacientes e individuos clínicamente sanos.** Valores promedio de intensidad de fluorescencia de muestras séricas de caninos (n=133) analizadas. Las enfermedades fueron agrupadas en: ● Enfermedades autoinmunes (n=44), ▲ Enfermedades autoinmunes e infecciosas (n=19), ■ Enfermedades infecciosas (n= 20), se incluyen también \* los individuos sanos (n=50); Los símbolos en color corresponden a animales positivos con altos niveles de autoanticuerpos ( $\geq 15,000$ ) contra más de una citocina.

El análisis de estos datos se realizó de acuerdo a una agrupación jerárquica entre las citocinas evaluadas y las muestras analizadas, definiendo una asociación entre la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y el tipo de enfermedad; dicha asociación permitió establecer cinco subgrupos diferentes (**Figura 7**), donde el primer subgrupo de muestra séricas (recuadro blanco) presentó autoanticuerpos con una alta reactividad a seis quimocinas (I-309, MIP-3a, MDC, IP-10, I-TAC, SDF-1a) y a dos citocinas (IL-18 e IL-12), correspondiendo a tres pacientes con enfermedades autoinmunes (AID); así mismo, en éste tipo de pacientes se observó un segundo subgrupo (recuadro morado) que demostró autoanticuerpos con reactividad al receptor IL-28Ra en otras cuatro muestras. Por otra parte, el tercer subgrupo (recuadro azul) de muestras séricas presentó autoanticuerpos con fuerte reactividad a IL-28B y al receptor IL-10Ra en dos pacientes con enfermedades infecciosas (ID) y uno con enfermedad autoinmune e infecciosa (AID/ID). En cuanto al cuarto subgrupo correspondió a ocho muestras que presentaron reactividad a la quimocina IP-10 (recuadro amarillo), mientras que el quinto subgrupo a otras ocho muestras con autoanticuerpos contra la citocina IL-12 (recuadro verde); las muestras séricas de ambos subgrupos son de pacientes que pertenecen a los tres diferentes tipos de enfermedades (AID, ID y AID/ID).



**Figura 7. Mapa de calor de los valores de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras caninas.** El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los sistemas de citocinas. Los colores más oscuros (Azules y negros) indican valores de IF <7000, los colores de verdes a naranjas valores >7,000 pero <15,000 y los rojos representan las muestras con valores de IF > 15,000. Los patrones de alta reactividad se muestran en recuadros: anti-quimiocinas, anti-IL-18 y anti-IL-12 (recuadro blanco), anti-IL-28Ra (recuadro morado); anti-IL-28B y anti-IL-10Ra (recuadro azul); anti-IP-10 (recuadro amarillo) y anti-IL-12 (recuadro verde).

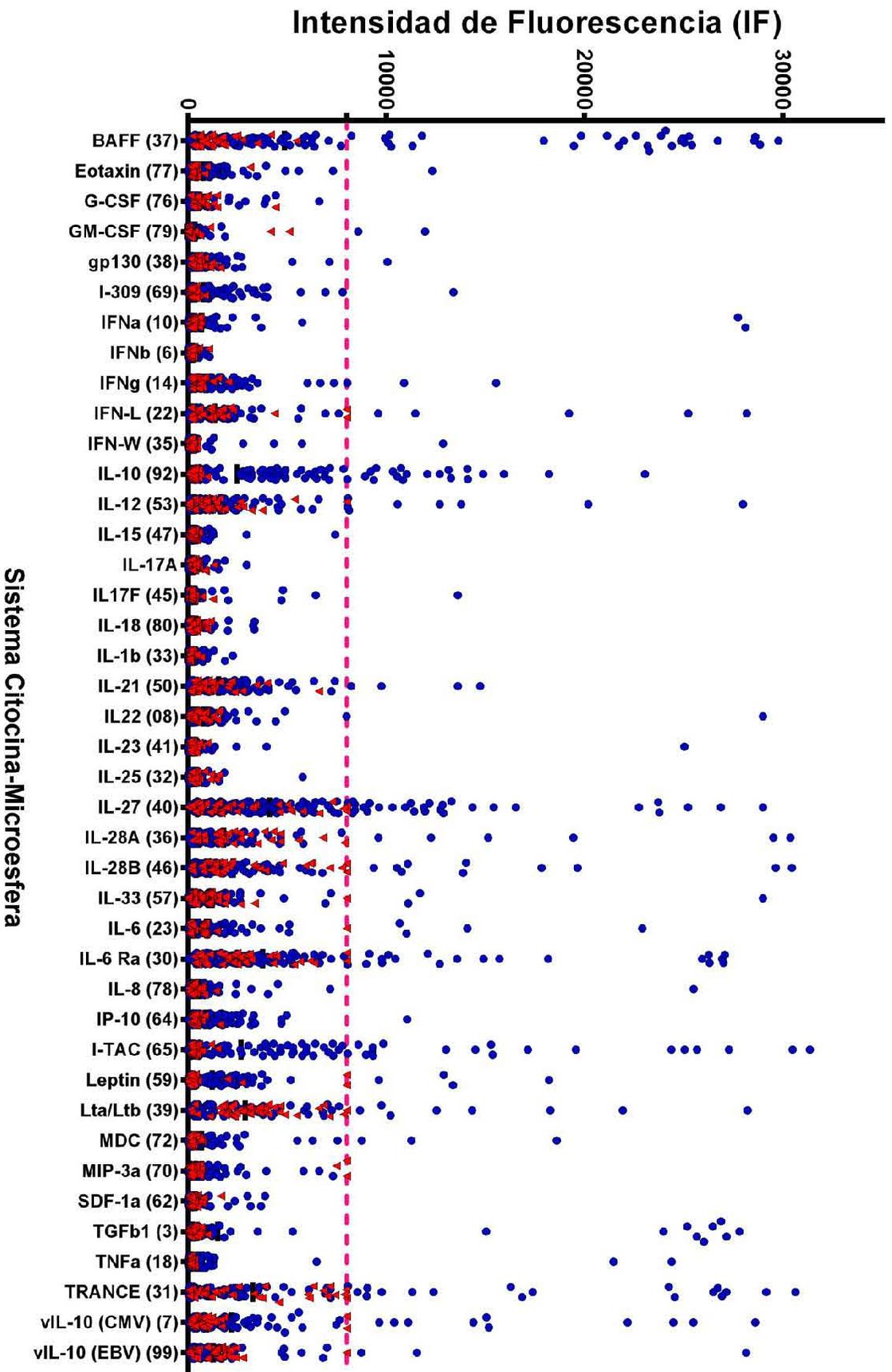
### 6.3.2. Análisis serológico en muestras humanas

Se analizaron un total de 209 muestras séricas humanas, las cuales fueron clasificadas en cuatro grupos, aquellas que correspondieron a enfermedades autoinmunes (AID, n=118), enfermedades infecciosas (ID, n=30), enfermedades autoinmunes e infecciosas (AID/ID, n=7), otras enfermedades (OD, n=4) e individuos clínicamente sanos (HC, n=50) (controles negativos). De acuerdo al tipo de enfermedad, los resultados del análisis de la presencia de autoanticuerpos en muestras séricas de humanos se muestran en las **Tablas 5, 6, 7 y 8** (ver Apéndice 1), en donde los pacientes sombreados con color corresponden a pacientes positivos con altos niveles de autoanticuerpos ( $\geq 15,000$ ) contra más de una citocina, mientras que en la **Tabla 9** corresponde a los individuos clínicamente sanos.

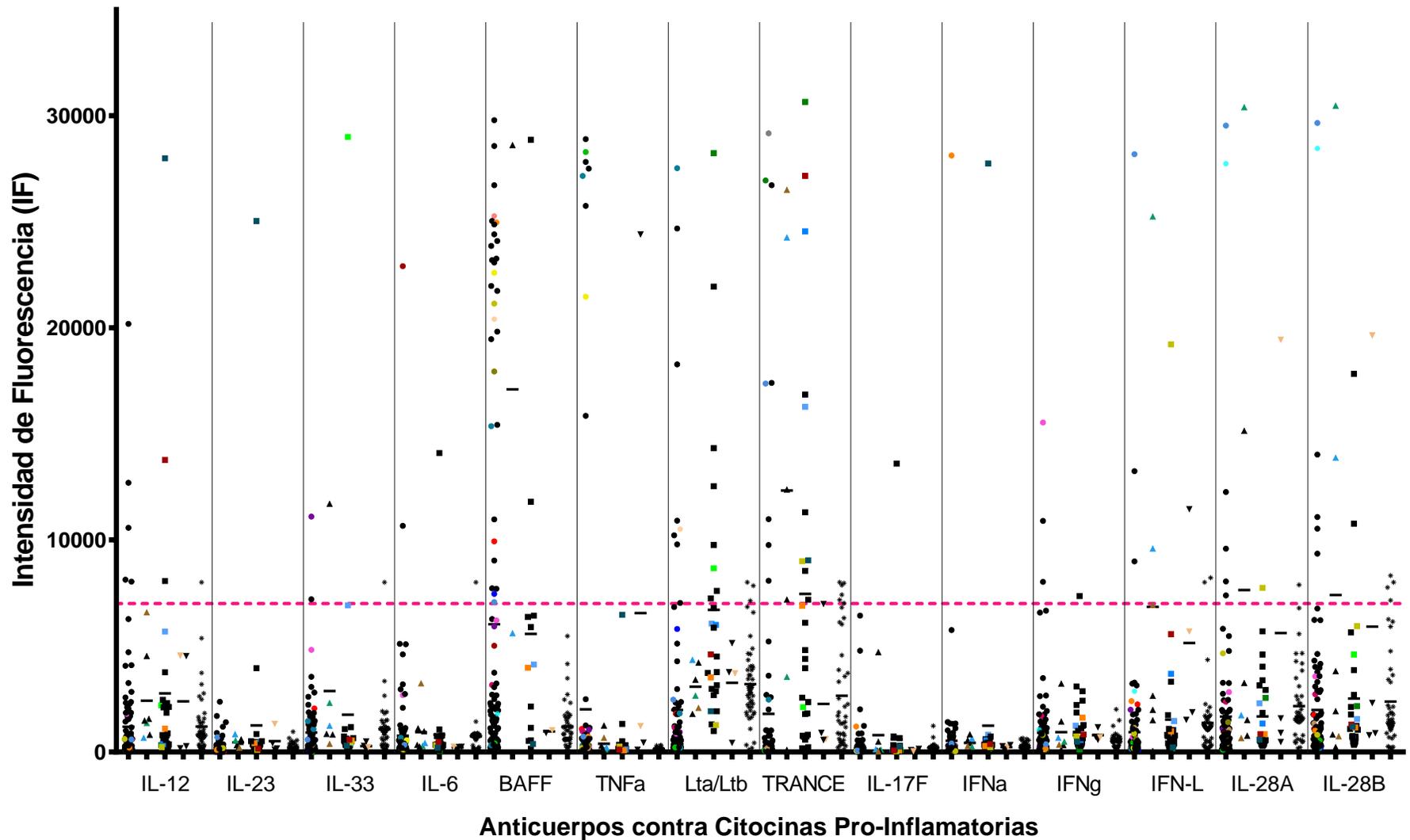
Los resultados revelaron que 139 de 159 (87%) muestras del grupo de pacientes presentaron autoanticuerpos contra al menos una citocina, dado que mostraron valores de intensidad de fluorescencia considerables ( $\geq 8,000$ ) correspondientes a anticuerpos contra 20 diferentes citocinas (IL-33, IL-6, BAFF, TNF $\alpha$ , Lta/Ltb, TRANCE, IL-17F, TGF $\beta$ 1, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IFN-L, IL-28a, IL-28B, IL-12, IL-23, IL-27, IL-10, vIL-10 CMV, vIL-10 EBV, IL-22), un receptor (IL-6 Ra) y tres quimiocinas (MDC, IL-8, I-TAC). Por otra parte en el grupo de controles, todas las muestras resultaron negativas a anticuerpos contra las 44 analitos analizados (**Figura 8**).

En la **Figura 9** se presentan los resultados de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas proinflamatorias en las 209 muestras séricas de humanos analizadas, donde se puede observar que anticuerpos contra BAFF y TNF $\alpha$  presentan los valores más altos de intensidad de fluorescencia ( $\geq 15,000$ ) principalmente en el grupo de pacientes con enfermedades autoinmunes, mientras que los valores de anticuerpos anti-TRANCE fueron más altos en el grupo de enfermedades infecciosas.

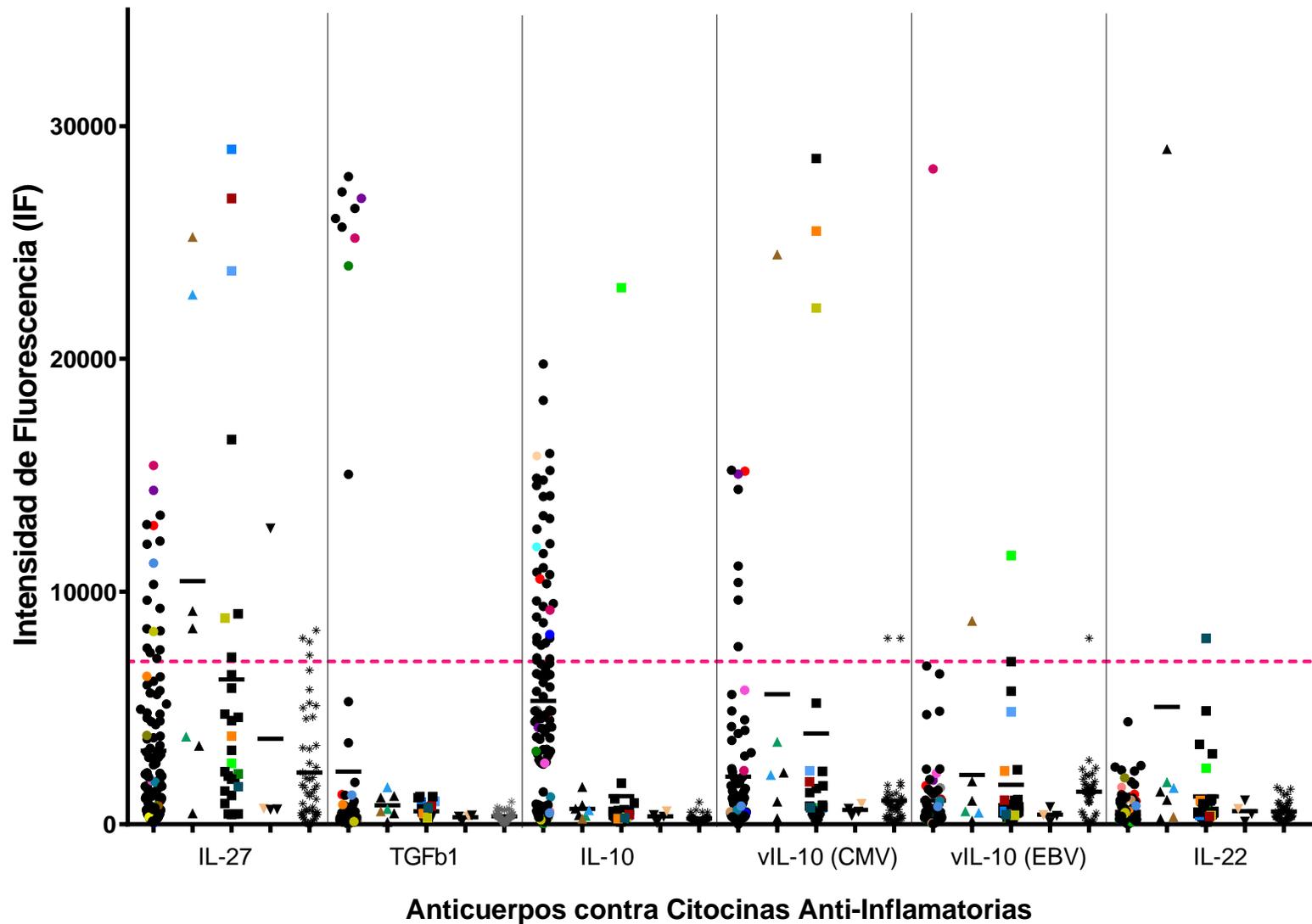
Por otra parte, en el análisis de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas antiinflamatorias, se observó que IL-27 y vIL-10 CMV fueron las citocinas contra las cuales se detectaron autoanticuerpos en algunas muestras, las cuales presentaron altos valores de intensidad de fluorescencia, y dichos autoanticuerpos predominaron principalmente en el grupo de enfermedades infecciosas (**Figura 10**). Así mismo, en la **Figura 11** se reporta la presencia de altos niveles de anticuerpos contra tres quimiocinas, siendo I-TAC la quimiocina que presentó mayor número de muestras positivas a autoanticuerpos contra ella principalmente en el grupo de pacientes con enfermedades autoinmunes.



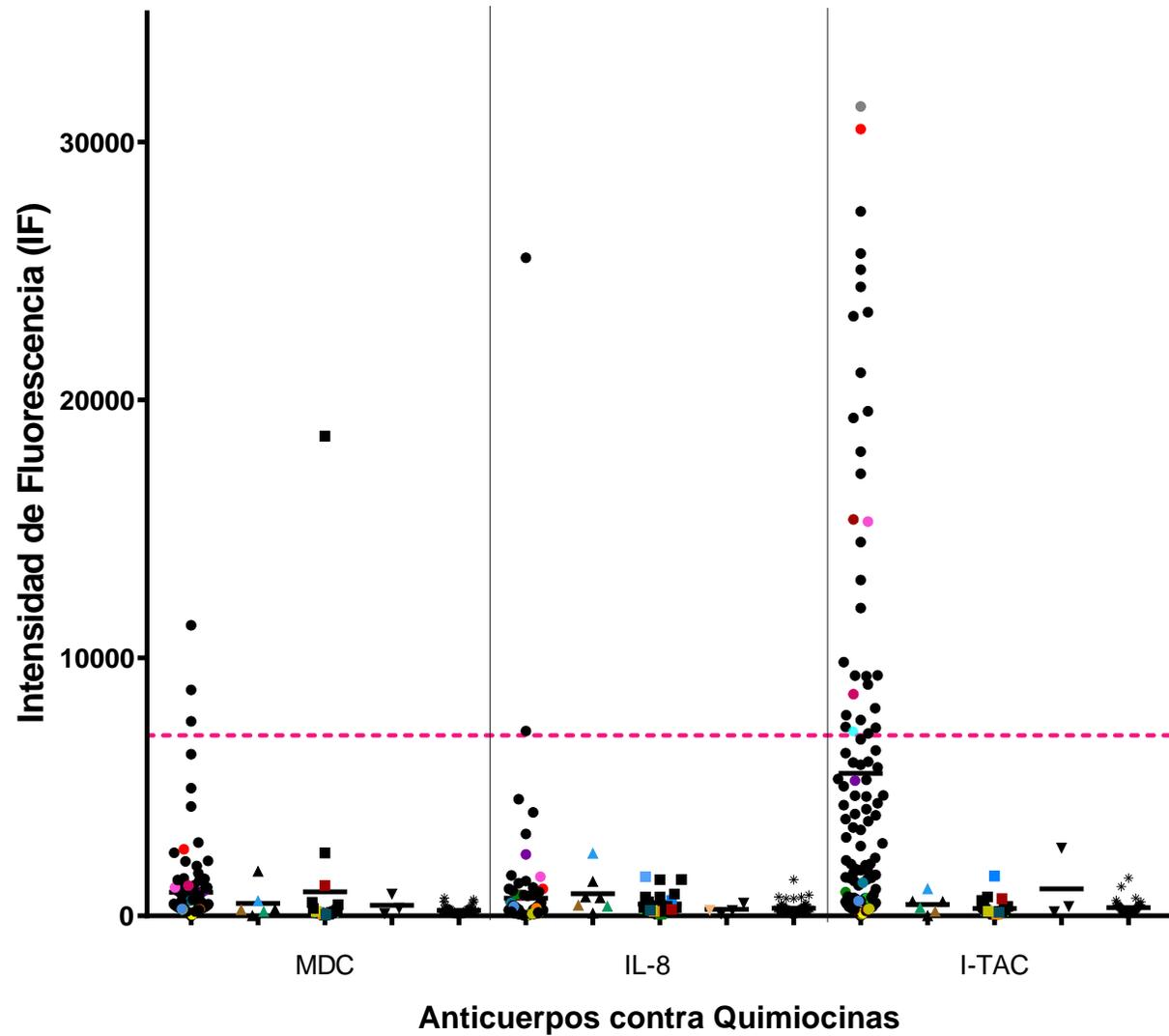
**Figura 8. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas y antiquimiocinas en muestras séricas caninas mediante el sistema 41-plex citocina-microesfera. Se grafican los valores promedio de la IF para los 46 sistemas. Se incluye el sistema de la BSA como control negativo. Donde (●) representa las muestras séricas, y los (▼) representan individuos control.**



**Figura 9. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas pro-inflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.** Valores promedio de intensidad de fluorescencia de muestras séricas de humanos (n=209) analizadas. Las enfermedades fueron agrupadas en: ● Enfermedades autoinmunes (n=118), ▲ Enfermedades autoinmunes e infecciosas (n=7), ■ Enfermedades infecciosas (n= 30), ▼ Otras Enfermedades (n=4); se incluyen también \* los individuos sanos (n=50); Los símbolos en color corresponden a individuos positivos con altos niveles de autoanticuerpos ( $\geq 15,000$ ) contra más de una citocina.



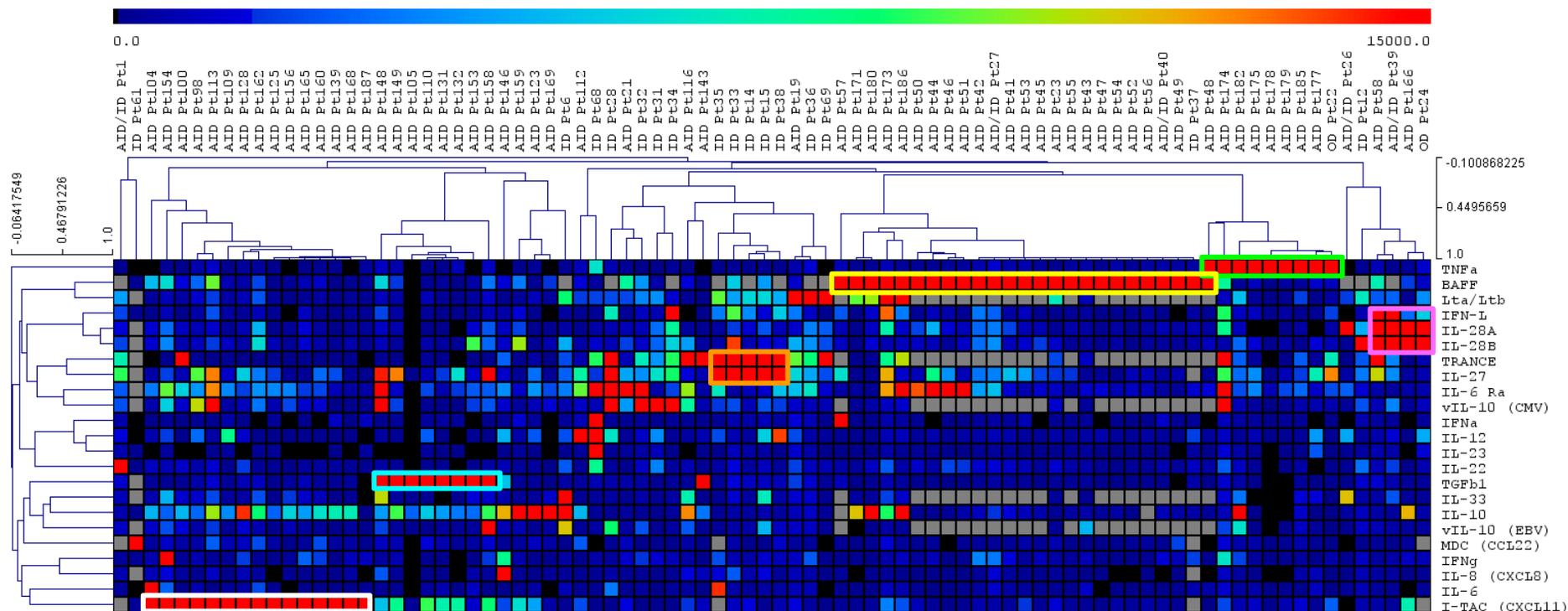
**Figura 10. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas anti-inflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.** Valores promedio de intensidad de fluorescencia de muestras séricas de humanos (n=209) analizadas. Las enfermedades fueron agrupadas en: ● Enfermedades autoinmunes (n=118), ▲ Enfermedades autoinmunes e infecciosas (n=7), ■ Enfermedades infecciosas (n= 30), ▼ Otras Enfermedades (n=4); se incluyen también \* los individuos sanos (n=50); Los símbolos en color corresponden a individuos positivos con altos niveles de autoanticuerpos ( $\geq 15,000$ ) contra más de una citocina.



**Figura 11. Patrón de autoanticuerpos contra quimiocinas en pacientes e individuos clínicamente sanos.** Valores promedio de intensidad de fluorescencia de muestras séricas de humanos (n=209) analizadas. Las enfermedades fueron agrupadas en: ● Enfermedades autoinmunes (n=118), ▲ Enfermedades autoinmunes e infecciosas (n=7), ■ Enfermedades infecciosas (n= 30), ▼ Otras Enfermedades (n=4); se incluyen también \* los individuos sanos (n=50); Los símbolos en color corresponden a individuos positivos con altos niveles de autoanticuerpos ( $\geq 15,000$ ) contra más de una citocina.

Por otra parte, 86 de las 159 muestras humanas de pacientes presentaron valores de intensidad de fluorescencia altos ( $\geq 15,000$ ) para la presencia de autoanticuerpos contra al menos una de 19 citocinas reconocidas por éstos (IL-33, IL-6, BAFF, TNF $\alpha$ , Lta/Ltb, TRANCE, TGFb1, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IFN-L, IL-28A, IL-28B, IL-12, IL-23, IL-27 IL-10, vIL-10 CMV, vIL-10 EBV, IL-22), tres quimiocinas (MDC, IL-8 e I-TAC) y un receptor (IL-6Ra). Por lo tanto, la **Figura 12** corresponde al mapa de calor empleando los valores de intensidad de fluorescencia de estas muestras séricas, las cuales pertenecen a pacientes con AID, ID y AID/ID; donde el programa *Multiple Experiment Viewer* reporta los valores de intensidad de fluorescencia empleando diferentes gradientes de color, el gradiente de negro a azul representa los valores bajos ( $< 8,000$ ), de verde a naranja los valores intermedios ( $> 8,000$  pero  $< 15,000$ ) y rojo los valores altos ( $\geq 15,000$ ).

El análisis de estos datos se llevó a cabo realizando una agrupación jerárquica entre las citocinas evaluadas y las muestras analizadas, lo cual permitió definir una asociación entre la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y el tipo de enfermedad de los pacientes humanos, y establecer seis subgrupos diferentes (**Figura 12**). En el primer subgrupo se detectaron 25 muestras positivas a autoanticuerpos con una alta reactividad a BAFF (recuadro amarillo), de las cuales 22 pertenecen a pacientes con enfermedades autoinmunes (AID), dos con enfermedades autoinmunes e infecciones (AID/ID) y solo una con enfermedades infecciosas (ID); mientras que en el segundo subgrupo nueve muestras séricas (recuadro verde) presentaron autoanticuerpos con una alta reactividad a TNF $\alpha$ , donde ocho de ellas corresponden a pacientes con enfermedades autoinmunes (AID) y solo una a otras enfermedades (OD). El tercer subgrupo se conformó de 15 muestras positivas a autoanticuerpos altamente reactivos contra I-TAC (recuadro blanco), el cuarto subgrupo presentó una alta reactividad a TGFb1 (recuadro azul) en muestras de cinco pacientes, las muestras de estos dos subgrupos pertenecen a pacientes con enfermedades autoinmunes (AID). Por otra parte, en el quinto subgrupo (recuadro rosa); se presentaron autoanticuerpos con alta reactividad a INF-L, IL-28A e IL-28B en tres muestras del grupo de enfermedades autoinmunes (AID) y en una muestra del grupo de otras enfermedades (OD). Por último, el sexto subgrupo (recuadro naranja) presentó autoanticuerpos con fuerte reactividad a IL-27 y a TRANCE en cinco muestras de pacientes con enfermedades infecciosas (ID).



**Figura 12. Mapa de calor de los valores de intensidad de fluorescencia de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas.** El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los sistemas de citocinas. Los colores más oscuros (Azules y negros) indican valores de IF <7000, los colores de verdes a naranjas valores entre 7,000 a 15,000, los rojos representan las muestras con valores de IF > 15,000, mientras que el gris representa valores no evaluados. Los patrones de alta reactividad se muestran en recuadros: anti-BAFF (recuadro amarillo), anti-TNF $\alpha$  (recuadro verde), anti-I-TAC (recuadro blanco), anti-TGF $\beta$ 1 (recuadro azul), anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-28A y anti-IL-28B (recuadro rosa), anti-IL-27 y anti-TRANCE (recuadro naranja).

#### **6.4. Estandarización de la purificación de autoanticuerpos contra IL-10 e IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna**

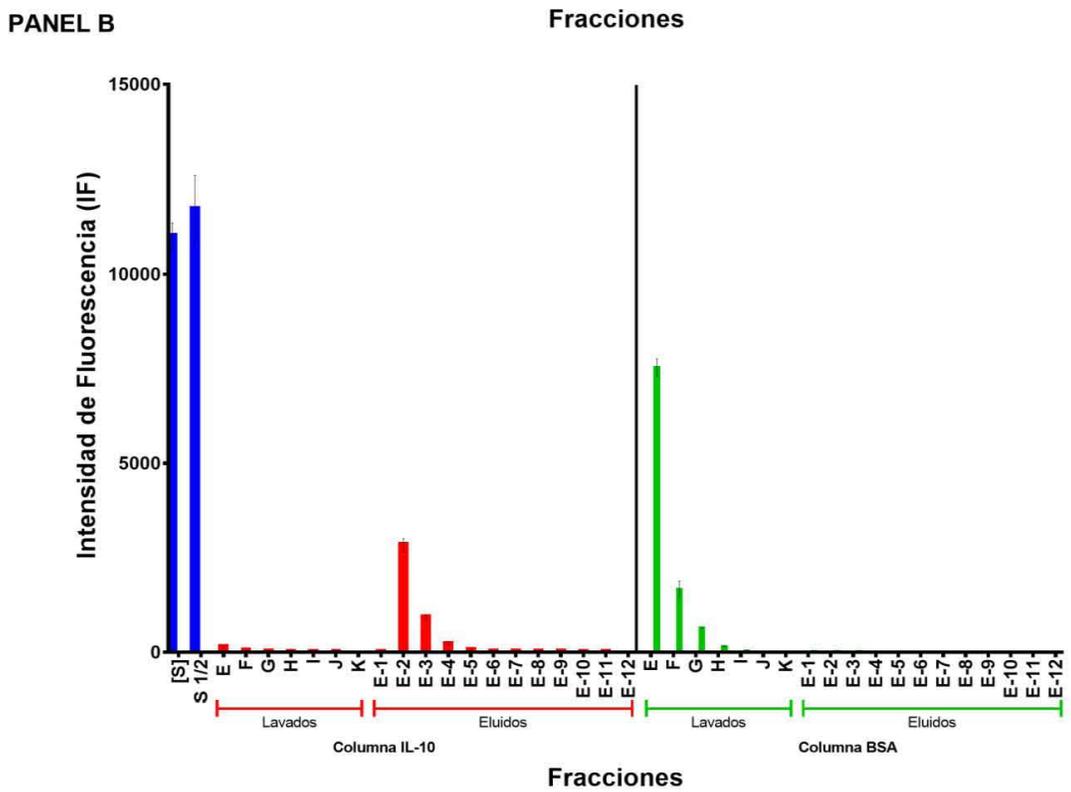
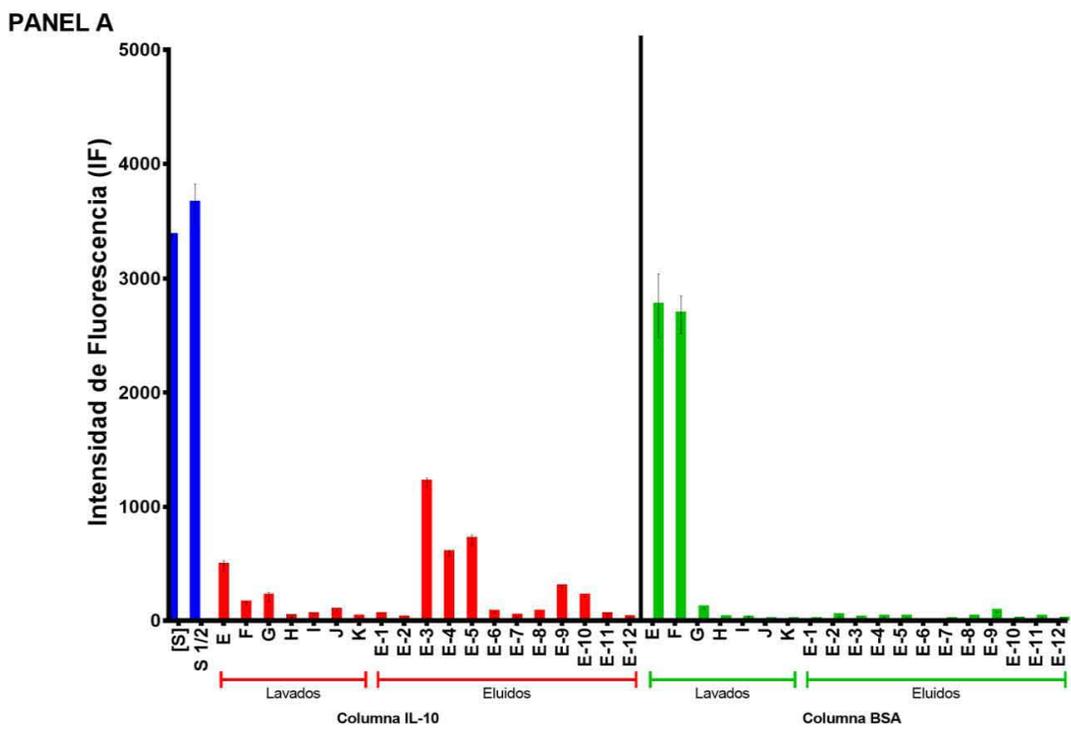
Se obtuvo la purificación de dos muestras séricas positivas a autoanticuerpos contra IL-10 y dos contra IL-6 mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna. Una vez que se realizó el proceso de purificación, se analizaron las diferentes fracciones obtenidas de cada columna para evaluar la eficiencia de la técnica y se identificó la presencia de los autoanticuerpos anti-IL-10 o anti-IL 6, empleando el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex) incluyendo el sistema de BSA-microesfera como control negativo.

En la **Figura 13** se observan los resultados de la purificación de autoanticuerpos contra IL-10 a partir de las muestras séricas PT172 (Panel A) y PT123 (Panel B), las cuales fueron positivas a la presencia de éstos en (con) niveles altos e intermedios, respectivamente; el lado izquierdo de ambos paneles de esta Figura corresponde a la Columna-IL-10; la primera barra muestra cada uno de los sueros completos ([S]) positivos con altos valores de intensidad de fluorescencia, y en la segunda barra indica las mismas muestras séricas denominadas suero pre-columna (S 1/2) donde se observan los niveles altos de autoanticuerpos. En la fracción E (suero post-columna) de esta misma Columna-IL-10 se observa una disminución de los valores de intensidad de fluorescencia, lo que indica un bajo nivel de autoanticuerpos contra IL-10 y de esta forma se demuestra que la mayoría de los autoanticuerpos específicos para IL-10 se unieron a esta citocina acoplada a la Columna-IL-10. Por otra parte, en la Columna-BSA la fracción E (suero post-columna) resultó ser lo contrario, donde se obtuvo un valor alto de intensidad de fluorescencia, indicando que los autoanticuerpos anti-IL-10 no se están uniendo de forma inespecífica a una proteína ajena dicha citocina, como es la BSA. Los lavados de ambas columnas previos a la elución, corresponden a las fracciones de la F a la K, por lo que la intensidad de fluorescencia va disminuyendo para ambas.

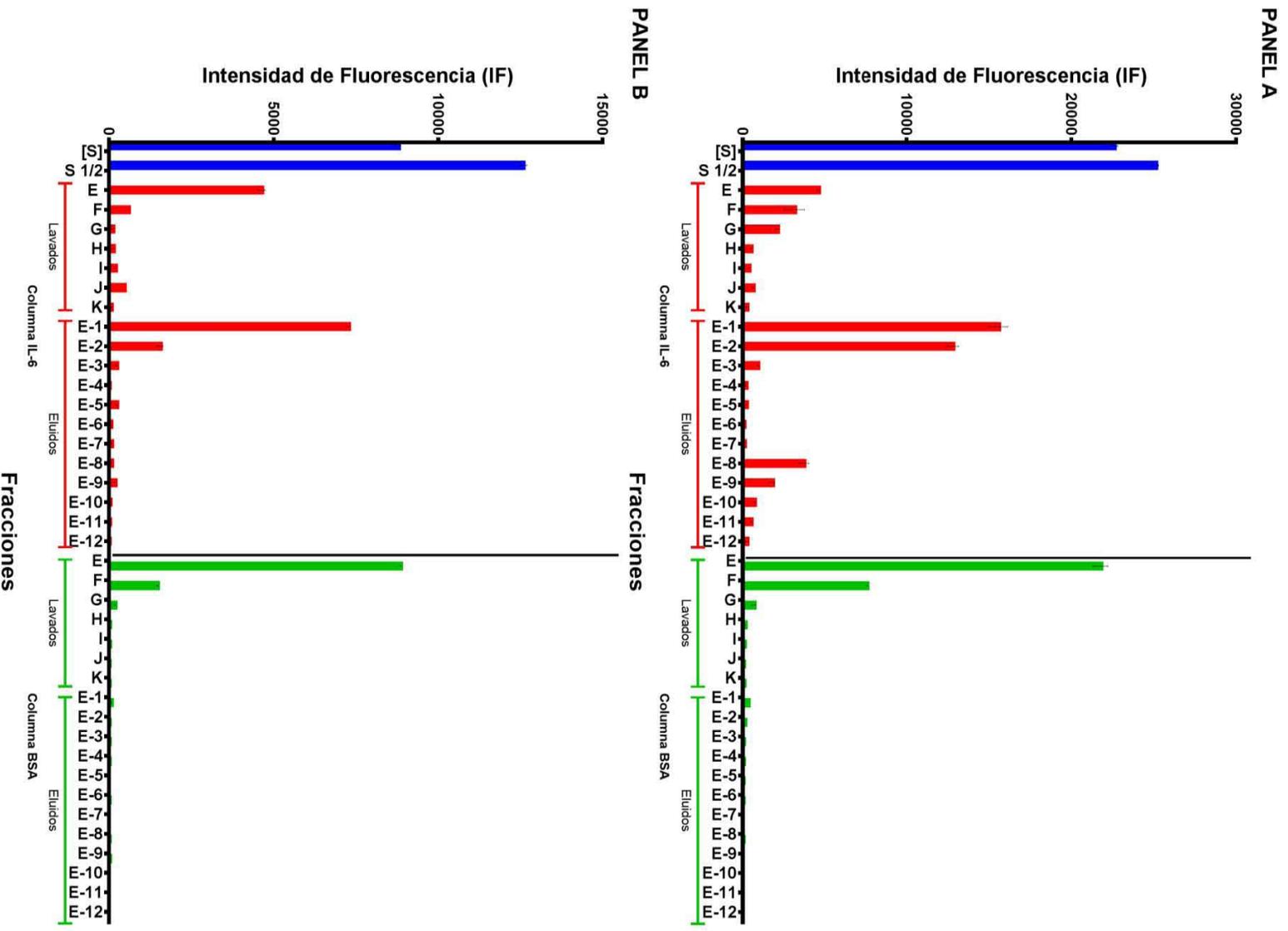
En los eluidos de E-1 a E-7 el enlace antígeno-anticuerpo se rompe con el empleo del buffer de elución (pH 2.8), por lo tanto, el primer eluido de la Columna-IL-10 dió un valor alto de intensidad de fluorescencia (indicando la elución de los autoanticuerpos de esta columna), disminuyendo proporcionalmente en los eluidos sucesivos hasta E-7. El cambio a un pH más ácido (de 2.0) favoreció aún más el rompimiento de la unión

antígeno-anticuerpos y por lo tanto en los eluidos E-8, E-9 y E-10 es donde sucedió un incremento en los valores de intensidad de fluorescencia, los cuales solo se observan para una muestra sérica (PT123, Panel A). En cambio los valores de intensidad de fluorescencia para todos los eluidos de la columna de BSA fueron negativos debido a que nunca ocurrió la unión antígeno-anticuerpos anti-IL-10.

En la **Figura 14** se observa un comportamiento similar se observa para la purificación de autoanticuerpos contra IL-6, a partir de las muestras PT104 (Panel A) y PT35 (Panel B), las cuales fueron positivas a la presencia de éstos. Sin embargo la muestra PT104 (Panel A) presenta un incremento en los valores de intensidad de fluorescencia causado por el cambio de pH en el eluido E8 y disminuye proporcionalmente hasta los últimos eluidos.



**Figura 13. Purificación de autoanticuerpos anti- IL-10 de dos muestras séricas.** Valores de Intensidad de fluorescencia para las diferentes muestras séricas, fracciones de lavado y de elución, obtenidos por el ensayo Luminex. Panel A: Fracciones correspondientes al Suero PT123. Panel B: Fracciones correspondientes al Suero PT172 mediante la técnica cromatografía de afinidad. Todas las fracciones se trabajaron empleando una dilución de 1/100.



**Figura 14. Purificación de autoanticuerpos anti- IL-6 de dos muestras séricas.** Valores de Intensidad de fluorescencia para las diferentes muestras séricas, fracciones de lavado y de elución, obtenidos por el ensayo Luminex. Panel A: Fracciones correspondientes al Suero PT104. Panel B: Fracciones correspondientes al Suero PT35 mediante la técnica cromatografía de afinidad. Todas las fracciones se trabajaron empleando una dilución de 1/100.

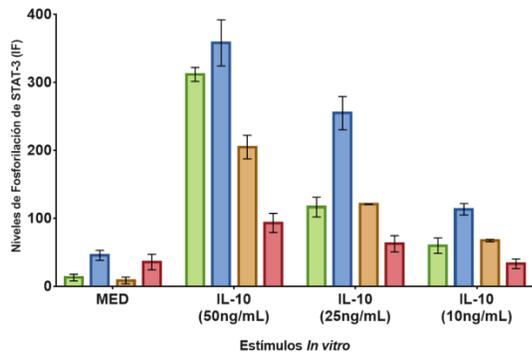
## 6.5. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina en la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10

La determinación de los niveles de fosforilación de STAT-3 se cuantificó mediante el uso del kit Bio-Plex Pro Cell Signaling Assays empleando la línea celular U937 y la citocina rh-IL-10 (ImmunoTools), para el análisis de la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-10 se utilizaron tres diferentes concentraciones de la citocina (50 ng/ml, 25 ng/ml y 10 ng/ml), las cuales se preincubaron en presencia o ausencia del suero positivo a autoanticuerpos contra IL-10, así como un control negativo (suero de individuo clínicamente sano) o el anticuerpo anti-IL-10 comercial (R&D Systems) como control positivo.

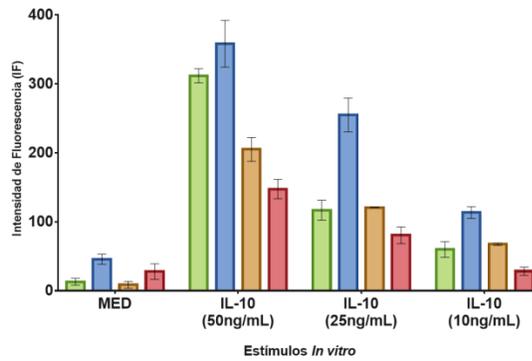
Posteriormente las células U937 se estimularon de forma exógena con los preparados preincubados de las condiciones mencionadas anteriormente. Después de 30 min de incubación a TA y agitación, se compararon los niveles STAT-3 fosforilado en los lisados celulares.

Los resultados de los ensayos de inhibición de la fosforilación del STAT-3 se presentan en la **Figura 15** en donde se utilizaron seis muestras séricas positivas a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-10 (**Panel A al F**). Los valores de IF indican los niveles de fosforilación de STAT-3, mostrando que en las células estimuladas con rh-IL-10 en ausencia del autoanticuerpo, empleando un suero negativo a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-10 (barra color azul) o el medio de cultivo DMEM completo (barra verde), efectivamente se induce la fosforilación de STAT-3, observando también que el nivel de fosforilación de este factor de transcripción es proporcional a la concentración de citocina utilizada para la estimulación. Por otra parte, se puede observar que los autoanticuerpos contra IL-10 presentes en las muestras séricas (barra roja) ocasionaron un efecto de inhibición en las diferentes concentraciones de IL-10 que se emplearon, dicha neutralización en la mayoría de las muestras es inclusive mayor que la causada por el anticuerpo comercial (barra café).

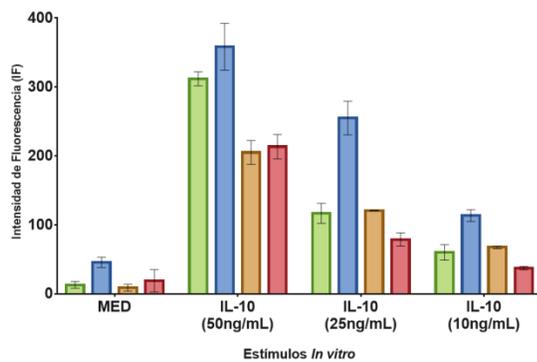
PANEL A



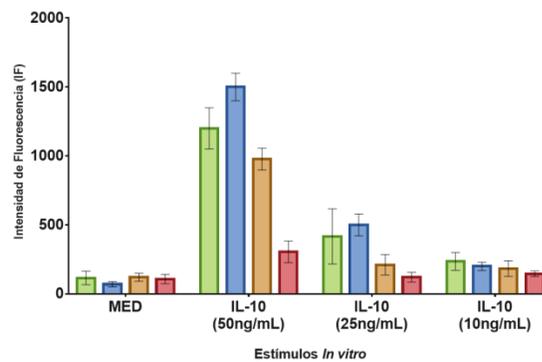
PANEL B



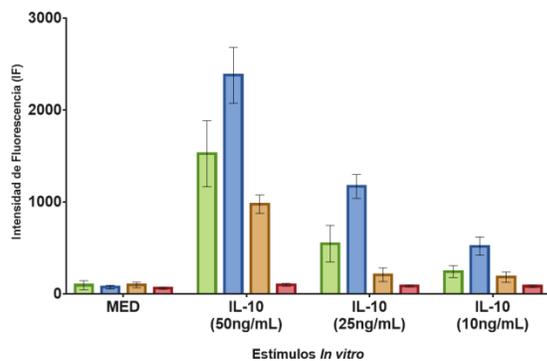
PANEL C



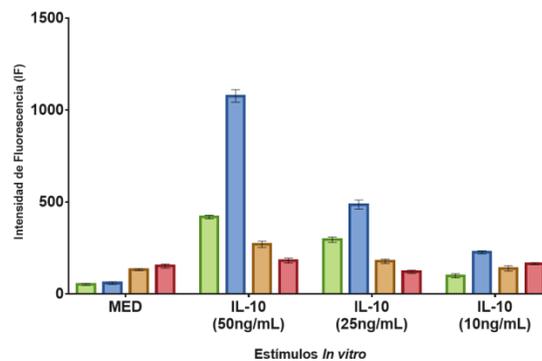
PANEL D



PANEL E



PANEL F

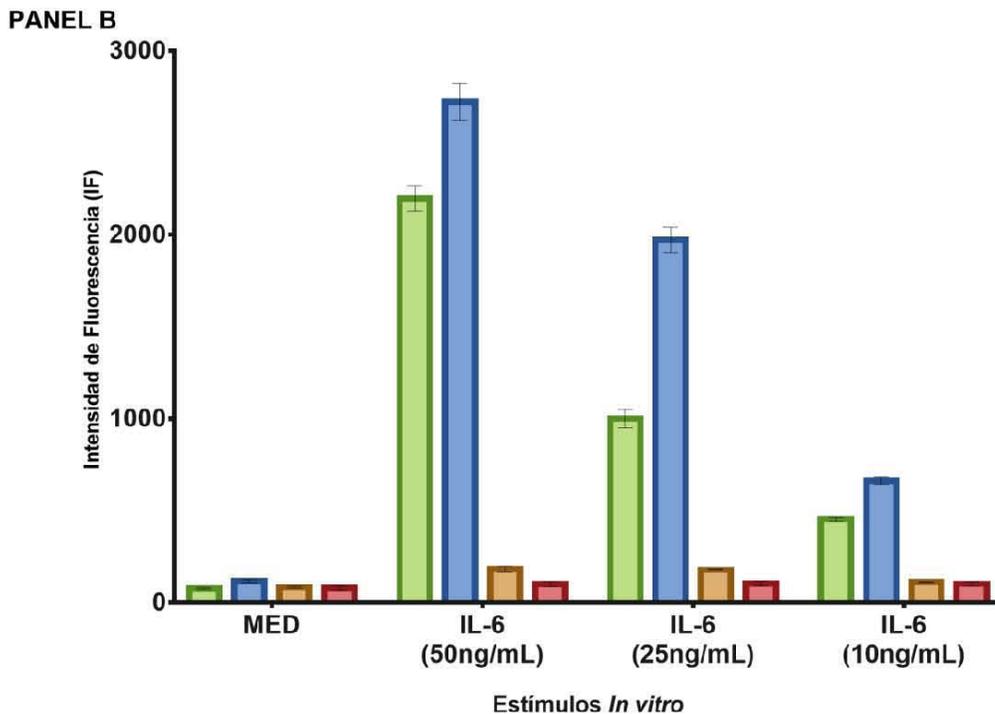
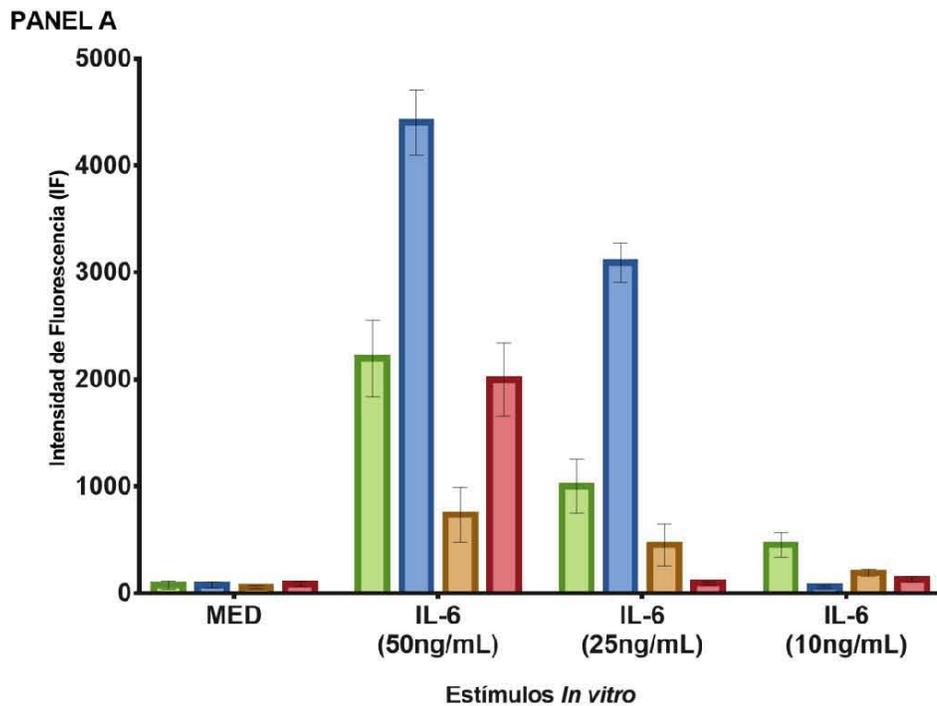


**Figura 15. Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-10.** Los niveles de fosforilación de STAT-3 fueron determinados en lisados celulares de células U937 estimuladas con IL-10 en las tres concentraciones preincubadas con ■ medio (DMEM); ■ Suero negativo a anti-IL-10 (control negativo), ■ anti-IL-10 (control positivo) o ■ Suero positivo a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-10. Panel A: PT172, Panel B: PT123, Panel C; PT169, Panel D: PT159, Panel E: PT170, Panel F: PT186.

## **6.7 Actividad neutralizante de auto-Ac's anti-citocina en la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6**

La determinación de los niveles de fosforilación de STAT-3 se cuantificó mediante el uso del kit Bio-Plex Pro Cell Signaling Assays empleando la línea celular Hep-3B, la citocina rh-IL-6 (R&D Systems) y para el análisis de la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6 se utilizaron las mismas condiciones descritas en el punto 6.2.

Los resultados de los ensayos de inhibición se presentan en la **Figura 16**, en donde se analizaron dos muestras séricas positivas (PT35 y PT104, Panel A y B, respectivamente) a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6. Los valores de IF indican los niveles de fosforilación de STAT-3 mostrando que en las células estimuladas con rh-IL-6 en ausencia del autoanticuerpo, empleando un suero negativo a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6 (barra color azul) o el medio de cultivo DMEM completo (barra verde) efectivamente se induce la fosforilación de STAT-3, observando también que el nivel de fosforilación de este factor de transcripción es proporcional a la concentración de citocina utilizada para la estimulación. Por otra parte, los valores de intensidad de fluorescencia reportados para el anticuerpo comercial (barra café) demuestran un efecto de inhibición de la fosforilación de STAT-3; así mismo se puede observar dicha neutralización al preincubar con las muestras séricas positivas a la presencia de autoanticuerpos contra IL-6 (barra roja), apreciando la disminución de los niveles de fosforilación de STAT-3 principalmente en las concentraciones de 50 y 25 ng/ml al preincubar con la muestra PT35 (**Panel A**) y en las tres concentraciones de IL-6 empleadas al preincubar con la muestra PT104 (**Panel B**).



**Figura 16. Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6.** Los niveles de fosforilación de STAT-3 fueron determinados en lisados celulares de células Hep3B estimuladas con IL-6 en las tres concentraciones preincubadas con ■ medio (DMEM); ■ Suero negativo a anti-IL-6 (control negativo), ■ anti-IL-6 (control positivo) o ■ Suero positivo a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6. Panel A: PT35 y PANEL B: PT104.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los anticuerpos anti-citocinas se han descrito, a últimos días, como una importante y emergente causa de enfermedades. Sus manifestaciones son diversas e incluyen proteínosis alveolar pulmonar debido a autoanticuerpos contra GM-CSF, infecciones con micobacterias no tuberculosas debido a autoanticuerpos anti-IFN- $\gamma$ , también individuos con miastenia gravis y timoma con prevalencia de autoanticuerpos contra IL-12 e IFN- $\gamma$ . (Barcenas-Morales, Jandus, & Döffinger, 2016; Browne, 2014; Browne & Holland, 2010a; Meager *et al.*, 2003).

Pacientes con severa susceptibilidad a infecciones producidas por bacterias intracelulares pueden presentar altos niveles de autoanticuerpos hacia IFN- $\gamma$ , una citocina, la cual es de crucial importancia para la eliminación de este tipo de patógenos tales como *Mycobacterium* y *Salmonella*. También los autoanticuerpos contra IL-6 se encontraron en un paciente con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente. Más reciente, una susceptibilidad a infecciones por hongos se ligó a autoanticuerpos contra IL-17 e IL-22 (Cappellano *et al.*, 2012; Doffinger *et al.*, 2004; Dubin & Kolls, 2008; Jaanika Kärner *et al.*, 2016; Smita Y. Patel *et al.*, 2005)

Además de estas presentaciones altamente patológicas mencionadas anteriormente, los autoanticuerpos anti-citocinas también se manifiestan en artritis reumatoide, timoma y ciertos tipos de cánceres (Meager *et al.*, 2003).

La disposición de sistemas que permitan el análisis de muestras séricas para detectar la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas, representan una enorme ventaja en el diagnóstico de infecciones atípicas recurrentes en pacientes que no tienen antecedentes de padecimientos genéticos reportados y que sin embargo, presentan un cuadro e historia clínica muy similar a pacientes con inmunodeficiencias primarias que afectan al sistema inmune (mutaciones en componentes involucrados en el desarrollo de la respuesta inmunitaria necesaria para el control de agentes infecciosos).

Comercialmente es posible obtener sistemas de anticuerpos acoplados a microesferas de poliestireno para detectar niveles de citocinas en diferentes tipo de muestras; sin embargo, la disponibilidad de sistemas de citocinas acopladas a microesferas para la detección de anticuerpos anti-citocinas, no existe comercialmente; por lo que en el

presente trabajo fue necesario e indispensable producir los sistemas de acoplamiento citocinas-microesfera de interés, realizando su correspondiente evaluación con el empleo de la técnica de Luminex para determinar su viabilidad.

En el presente proyecto se elaboraron 11 sistemas de acoplamiento citocina-microesfera y se evaluó el acoplamiento e integridad antigénica de los sistemas, donde los valores de IF obtenidos para cada uno de los sistemas (citocina-microesfera) empleando sus anticuerpos específicos como controles positivos, indicaron que existió un alto grado de acoplamiento covalente entre los grupos aminos primarios de las citocinas y los grupos carboxilos funcionales que se encuentran en la superficie de las microesferas, y así mismo, se confirmó la viabilidad de la integridad antigénica de los sistemas. Por otro lado, se determinaron las posibles interferencias entre los diferentes sistemas de acoplamiento, no existiendo este fenómeno entre ellos, permitiendo el uso de ellos en forma simultánea en la realización del análisis de muestras séricas para la detección de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas empleando el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple, basado en la técnica de citometría de flujo.

El análisis del presente estudio se enfocó en las 29 muestras que presentaron valores altos de intensidad de fluorescencia ( $\geq 15,000$ ) indicando niveles considerables de autoanticuerpos contra ocho citocinas (IL-1b, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-28B, G-CSF), seis quimiocinas (I-309, MIP-3a, MDC, IP-10, I-TAC y SDF-1a) y dos receptores (IL-10Ra y IL-28Ra).

De las muestras positivas del grupo de pacientes caninos con enfermedades autoinmunes (AID) se detectó la presencia de autoanticuerpos contra IL-18, IL-12 y diferentes quimiocinas, principalmente en pacientes con enfermedades relacionadas procesos de inflamación (epidermolisis bullosa, miositis y penfigo). Dichas citocinas tienen un papel importante en la regulación de enfermedades autoinmunes como citocinas proinflamatorias (Biet, Loch, & Kremer, 2002), existiendo reportes en humanos en los que se menciona que altos niveles de estas citocinas podrían desencadenar cuadros de autoinmunidad; por lo tanto, se podría especular que los autoanticuerpos presentes en las muestras séricas de estos pacientes pudieran estar regulando la función biológica de estas citocinas (Boraschi & Dinarello, 2007; Volin & Koch, 2011).

Así mismo, en este grupo de pacientes (AID) otras cuatro muestras caninas fueron positivas a la presencia de autoanticuerpos contra el receptor de IFNL (IL-28Ra), principalmente en pacientes con enfermedades relacionadas a daño en tejido epitelial (epidermolisis bullosa, miastenia gravis, pénfigo). La familia IFNL es el grupo de interferones descubierto más recientemente, este comprende cuatro miembros homólogos: IFNL1 (IL-29), IFNL2 (IL-28A), IFNL3 (IL-28B) e IFNL4, siendo este último el más recientemente descrito; es importante mencionar que este grupo de interferones participa principalmente en respuesta a diversas infecciones virales, tiene una función inmunoreguladora potente e induce la secreción de diferentes quimiocinas. La familia del IFNL actúa a través de un receptor de superficie celular compuesto por una cadena  $\alpha$  del receptor IL-28 (IL-28Ra, también conocida como IFNLR1) y la cadena IL-10R2, que también es la subunidad del receptor de IL-10, IL-22 e IL-26 (Egli, Santer, O'Shea, Tyrrell, & Houghton, 2014; Li *et al.*, 2013; Sheppard *et al.*, 2003; Strange *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). Estudios recientes reportan que polimorfismos de nucleótidos únicos en secuencias del receptor IL-28Ra están relacionados con una susceptibilidad a enfermedades autoinmunes en humanos (Syedbasha & Egli, 2017). Por lo tanto, en el presente estudio o trabajo la detección de la presencia de autoanticuerpos contra las citocinas de la familia del IFNL o su receptor (IL-28Ra) podrían estar implicados y ser relevantes en el desarrollo de enfermedades autoinmunes en caninos.

Por otra parte, la detección de anticuerpos contra la IL-28B (IFNL3) y el receptor IL-10Ra, principalmente en pacientes con enfermedades infecciosas (ID) causadas por agentes fúngicos, sugiere una participación de estos en la patogenia de enfermedades infecciosas ya que, como se mencionó anteriormente, este grupo de interferones participa principalmente en respuesta a diversas infecciones virales, sin embargo, no existen reportes sobre la función de IL-28B en la eliminación de este tipo de patógenos. Por otra parte la IL-10 limita (regula) la respuesta inmune innata hacia microorganismos, considerando que es una citocina antiinflamatoria, ejerciendo su función mediante la unión a su receptor heterodimérico, el cual está formado por IL-10Ra y IL-10Rb. Recientemente en humanos se ha reportado que niveles altos de esta citocina favorecen la eliminación de patógenos fúngicos (Cyktor & Turner, 2011) y que la deficiencia en esta citocina puede ser perjudicial para el organismo ya que incrementa la susceptibilidad a infección provocada por la exacerbación de la inflamación (Chaudhry et

al., 2011; Iyer & Cheng, 2012); por lo que los anticuerpos contra el IL-10Ra podrían estar neutralizando su cascada de señalización, favoreciendo así el desarrollo de infecciones fúngicas.

En muestras caninas de pacientes con diferentes tipos de enfermedades (queratitis ulcerativa inmunomediada, lupus eritomatoso sistémico, miastenia gravis, pénfigo, infecciones bacterianas y atopia) se detectaron autoanticuerpos contra IP-10 (CXCL10). Aunque CXCL10 se identificó originalmente como una quimiocina proinflamatoria que mediaba el tráfico de leucocitos, se ha encontrado que activa los linfocitos T (Th1), las células NK, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B; por lo tanto autoanticuerpos contra CXCL10 podrían estar neutralizando las propiedades proinflamatorias favoreciendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes e incrementando la vulnerabilidad en el individuo ante agentes infecciosos (Gotsch *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011; A. Puel *et al.*, 2008; Sun, He, Nair, Yeung, & Egwuagu, 2015).

También se detectaron altos niveles de autoanticuerpos contra IL-12 en pacientes de los tres diferentes grupos de enfermedades (AID, ID, AID/ID) que se analizaron en el presente trabajo, siendo artritis reumatoide, miastenia gravis, síndrome poliglandular autoinmune, tiroiditis, infecciones fúngicas, atopia e infecciones bacterianas y glomerulonefritis autoinmune e infecciosa, los padecimientos de dichos pacientes; concordando algunos de ellos con lo reportado por Meager y colaboradores, quienes establecen una relación entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes de IL-12 y el desarrollo de miastenia gravis y Timoma (Meager *et al.*, 2003).

Debido a la carencia de reportes de autoanticuerpos anti-citocinas relacionados con enfermedades infecciosas y/u otros padecimientos en caninos, no es posible contrastar la información obtenida en el presente estudio con otros trabajos, para establecer una relación más clara de la presencia de éstos autoanticuerpos y ciertos tipos de afecciones. Sin embargo, los datos mencionados en párrafos anteriores pueden compararse con lo descrito por Kampmann en 2005 y DeLeon en el 2014, donde estos autores asocian pacientes humanos con enfermedades autoinmunes e infecciosas, principalmente con micobacterias no tuberculosas, con la presencia de auto-anticuerpos contra ciertos componentes del sistema inmunitario, como son las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 (DeLeon, Chung, Opal, & Dworkin, 2014; Kampmann *et al.*, 2005).

El análisis del presente estudio se enfocó en las 86 muestras que presentaron valores altos de intensidad de fluorescencia ( $\geq 15,000$ ) indicando altos niveles de autoanticuerpos contra 19 citocinas (IL-33, IL-6, BAFF, TNF $\alpha$ , Lta/Ltb, TRANCE, TGF $\beta$ 1, IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IFN-L, IL-28A, IL-28B, IL-12, IL-23, IL-27 IL-10, vIL-10 CMV, vIL-10 EBV, IL22), tres quimiocinas (MDC, IL-8 e I-TAC) y un receptor (IL-6Ra).

Se detectaron altos niveles de autoanticuerpos contra BAFF en pacientes con enfermedades autoinmunes (AID), concordando con lo reportado por el grupo de Price, quien identificó autoanticuerpos contra BAFF en el suero de pacientes con problemas autoinmunes, como el lupus eritomatoso sistémico (LES) y demostró que estos autoanticuerpos neutralizan la actividad de BAFF en cultivos celulares (Price *et al.*, 2013). Además, reporta una correlación positiva entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes contra BAFF y las características asociadas con un perfil de enfermedad de LES más grave. Así mismo, estudios recientes reportan los autoanticuerpos contra BAFF como reguladores naturales de esta citocina (Sarantopoulos & Su, 2013).

Por otra parte, en algunos pacientes con enfermedades autoinmunes (AID) principalmente con enfermedad inflamatoria intestinal, se detectaron autoanticuerpos contra la citocina proinflamatoria TNF $\alpha$ , la cual en altas concentraciones induce el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Bajo esta premisa, se han desarrollado varias terapias basadas en anticuerpos anti-TNF $\alpha$  para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (AID) por lo que la presencia de estos autoanticuerpos en las muestras séricas podría sugerir tratamientos previos de sus padecimientos (Chatzantoni & Mouzaki, 2006; Parameswaran & Patial, 2010). Por otra parte, se podría especular que estos autoanticuerpos anti-TNF $\alpha$  detectados en estas muestras podrían estar exacerbando la función inflamatoria en el individuo hasta el punto de producir el cuadro autoinmune.

Así mismo, en muestras séricas del mismo grupo de enfermedad (AID) con enfermedad inflamatoria intestinal, se detectaron autoanticuerpos contra I-TAC, la cual es una quimiocina que actúa sobre células T y tiene una función potencial como modulador negativo de la activación y migración de leucocitos contrarrestando específicamente las respuestas mediadas por quimiocinas inflamatorias clásicas (Cox, Dean, Roberts, & Overall, 2008; Moser & Willimann, 2004; Petkovic, Moghini, Paoletti, Ugucioni, & Gerber,

2004). Por lo tanto, la presencia de anticuerpos contra I-TAC podrían incrementar el desarrollo de enfermedades inflamatorias.

De igual forma se ha reportado la deficiencia de TGFb1 como una posible causa de este de enfermedades inflamatorias, por lo que resulta interesante la detección de la presencia de autoanticuerpos contra TGFb1 en muestras de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, los cuales podrían considerarse como parte de la patogenia de enfermedades inflamatorias (Kotlarz *et al.*, 2018; Sanjabi, Zenewicz, Kamanaka, & Flavell, 2009).

En muestras positivas del mismo grupo de pacientes (AID), se observó la presencia de autoanticuerpos contra IFNL, IL-28A (IFNL2) e IL-28B (IFNL3), siendo enfermedad inflamatoria intestinal, fiebre periódica de origen desconocido, fibrosis quística e infecciones fúngicas y mutaciones los padecimientos de los individuos; como se mencionó anteriormente este grupo de interferones participa principalmente en respuesta diversas infecciones virales, tiene una función inmunoreguladora potente e induce la secreción de diferentes quimiocinas, por lo que autoanticuerpos contra estas citocinas podrían estar implicados en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Egli *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012).

Por otro lado, en pacientes con enfermedades infecciosas (principalmente por micobacterias u hongos), la detección de autoanticuerpos contra IL-27 y TRANCE podría sugerir que dichos anticuerpos pudieran incrementar la susceptibilidad a agentes infecciosos, ya que se ha reportado que la TRANCE, así como IL-27 (en sinergia con IL-12) inducen la producción de IFN- $\gamma$ , dicha citocina se considera como el principal activador de macrófagos, siendo importante para el control y eliminación de microorganismos intracelulares facultativos (Chen, Huang, & Hsieh, 2001; Lalive *et al.*, 2017); por lo que la inhibición de estas citocinas podría generar una afectación en la eliminación de agentes infecciosos como es *Mycobacterium* y *Aspergillus*.

Aunque ya se cuenta con reportes sobre autoanticuerpos contra citocinas relacionados a un aumento en la susceptibilidad a infecciones, aún no está claro el mecanismo por el cual estos autoanticuerpos son generados, puesto que no hay estudio alguno donde se reporte si los autoanticuerpos dan pie al inicio de la infección o si son precisamente estos padecimientos infecciosos o autoinmunitarios los que inducen la aparición de los

autoanticuerpos, los cuales más tarde llegaran a causar un incremento a la susceptibilidad a dichas infecciones. Sin embargo, autores como Meager y colaboradores especulan que la presencia de estos anticuerpos auto-reactivos contra citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-12 puede deberse a la diferente forma en que éstas últimas son procesadas por las células inmunes, tales como las células dendríticas activadas, lo cual ocurre con el GM-CSF en el pulmón en el síndrome de proteinosis alveolar pulmonar (Meager *et al.*, 2003).

Así mismo, hasta donde se sabe no existen estudios con respecto a una caracterización más detallada de dichos autoanticuerpos anti-citocinas, por lo que lograr la purificación de los mismos es de suma importancia para la realización de análisis más específicos y claros sobre la función que se le podría atribuir a la presencia de autoanticuerpos contra citocinas involucrados en la susceptibilidad a algún tipo de infección o en la exacerbación de las funciones de ciertos tipos de citocinas que podrían estar implicadas en la patogenia de la propia enfermedad. Por ejemplo, determinación del índice de avidéz de autoanticuerpos anti-citocinas, pruebas *in vitro* de inhibición de la producción de citocinas, identificación de los epítomos reconocidos por los autoanticuerpos mediante microarreglos de péptidos; así como, el estudio realizado en el presente trabajo, donde se llevó a cabo la estandarización de ensayos de inhibición *in vitro* de la fosforilación de factores de transcripción como es STAT-3, para evaluar la función neutralizante de los autoanticuerpos sobre la actividad biológica de la citocina blanco.

En el presente estudio se realizó la purificación de autoanticuerpos contra citocinas a partir de cuatro muestras séricas, dos de ellas positivas a auto-anticuerpos contra IL-6 y las dos restantes positivas a autoanticuerpos anti-IL-10, empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Con respecto a este ensayo, se puede mencionar que resultó exitoso, lo cual se demostró cuando se evaluó la eficiencia de la técnica de purificación de los autoanticuerpos purificados empleando el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex).

La técnica de cromatografía de afinidad por columna aprovecha la característica de que para la formación del complejo antígeno-anticuerpo intervienen enlaces no covalente considerando la capacidad de disociación de la unión antígeno-anticuerpo en medios

ácidos al debilitar las interacciones electrostáticas, o puentes de hidrógeno (Reverberi, 2007; Ross & Pawlina, 2013). El análisis de las fracciones obtenidas en la purificación de autoanticuerpos contra IL-10, mostró un incremento de los valores de intensidad con el cambio a un pH más ácido (pH 2.0) principalmente para los eluidos E9 y E10 en la muestra PT123, mientras que en la muestra PT172 este efecto es menor. El uso de un desestabilizante de puentes de hidrógeno como el buffer de elución pH 2.8, para disociar la unión entre el anticuerpo específico y el antígeno, conlleva a que los anticuerpos de baja afinidad se disocian más fácilmente del antígeno, mientras que aquellos con mayor afinidad requieran un medio más ácido (pH. 2.0) para ser eluidos de la columna. Por lo tanto, se podría decir que los autoanticuerpos purificados de la muestra PT123 presentan una alta afinidad del autoanticuerpo con su citocina, mientras que en la muestra PT172 la afinidad es menor (Schoenardie, 2014).

Por otra parte en la purificación de autoanticuerpos contra IL-6, en la muestra PT104, el incremento de los valores de intensidad de fluorescencia se presentó en el eluido E-8 disminuyendo gradualmente hasta el eluido E-12, por el contrario en la muestra PT35 dicho efecto no se presenta, por lo que la afinidad de los autoanticuerpos a IL-6 son mayores en la muestra PT104 que en PT35.

Finalmente, la evaluación de la actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina en la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10 o IL-6 ha mostrado resultados interesantes que nos pueden llevar a comprobar que, efectivamente, los autoanticuerpos anti-IL-10 o anti IL-6, presentes en algunas de las muestras séricas, poseen la capacidad de inhibir las vías de señalización de estas citocinas. Cuando el autoanticuerpo reconoce a la citocina impide que dicha citocina se una a su receptor, y de esta forma no se lleve a cabo la activación y fosforilación del factor de transcripción STAT-3, su translocación al núcleo celular y la consecuente activación de los genes inducidos por cada una de las citocinas (Ahmed & Ivashkiv, 2000).

## 8. CONCLUSIONES

**8.1.** Los 11 sistemas de acoplamiento citocina-microesfera establecidos presentaron un alto grado de acoplamiento y una integridad antigénica viable, así mismo no existió una interferencia entre los diferentes sistemas, permitiendo su uso o empleo en forma simultánea (multiplex).

**8.2.** La obtención de valores considerables de Intensidad de Fluorescencia en muestras séricas de caninos confirmó la utilidad de los sistemas microesferas-citocinas humanas recombinantes para la detección de auto-anticuerpos en esta especie, empleando el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bioplex.

**8.3.** La determinación de los niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en las 83 muestras del grupo de pacientes caninos analizadas, reflejó que 29 presentaron valores de intensidad de fluorescencia altos ( $\geq 15,000$ ) para la presencia de autoanticuerpos contra al menos una de ocho citocinas altamente reconocidas (IL-1b, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-28B, G-CSF), seis quimiocinas (I-309, MIP-3a, MDC, IP-10, I-TAC y SDF-1a) y dos receptores (IL-10Ra y IL-28Ra), mientras que en el grupo de controles, todas las muestras resultaron negativas a autoanticuerpos contra todos los analitos evaluados.

**8.4** La asociación jerárquica permitió establecer cinco grupos diferentes de reactividad contra diversos analitos, siendo el primer grupo reactivo a seis quimiocinas (I-309, MIP-3a, MDC, IP-10, I-TAC, SDF-1a) y a dos citocinas (IL-18 e IL-12), el segundo al receptor IL-28Ra, el tercero a IL-28B y al receptor IL-10Ra, el cuarto a la quimiocina IP-10 y el quinto fue reactivo a IL-12.

**8.5.** De las 159 muestras séricas humanas de pacientes analizadas, 86 presentaron valores de intensidad de fluorescencia altos ( $\geq 15,000$ ) para la presencia de autoanticuerpos contra al menos una de 19 citocinas reconocidas por éstos (IL-33, IL-6, BAFF, TNFa, Lta/Ltb, TRANCE, TGFb1, IFNa, IFNg, IFN-L, IL-28A, IL-28B, IL-12, IL-23, IL-27 IL-10, vIL-10 (CMV), IL-10 (EBV), IL22), tres quimiocinas (MDC, IL-8 e I-TAC) y un receptor (IL-6 Ra) mientras que en el grupo de controles, todas las muestras resultaron negativas a autoanticuerpos contra todos los analitos evaluados.

**8.6.** La asociación jerárquica permitió establecer cinco grupos diferentes de reactividad, contra diversos analitos, siendo el primero grupo reactivo a BAFF, el segundo a TNF $\alpha$ , el

tercero a I-TAC, el cuarto a TGFb1, el quinto a IFN-L, IL-28A e IL-28B y el sexto subgrupo a IL-27 y a TRANCE.

**8.7** Se estandarizó la técnica de cromatografía de afinidad en columna logrando realizar la purificación de autoanticuerpos anti-IL-6 y anti-IL10 de muestras séricas humanas.

**8.8.** Los autoanticuerpos contra IL-10 e IL-6 detectados en muestras séricas humanas presentaron un efecto de inhibición de la fosforilación del factor de transcripción STAT-3 en las diferentes concentraciones de las citocinas analizadas, demostrando la función biológica neutralizante de éstos.

## 9. REFERENCIAS

- Ahmed, S. T., & Ivashkiv, L. B. (2000). Inhibition of IL-6 and IL-10 Signaling and Stat Activation by Inflammatory and Stress Pathways. *The Journal of Immunology*, 165(9), 5227–5237. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.9.5227>
- Altare, F., Durandy, A., Lammas, D., Emile, J.-F., Lamhamedi, S., Le Deist, F., ... Casanova, J.-L. (1998). Impairment of Mycobacterial Immunity in Human Interleukin-12 Receptor Deficiency. *Science*, 280(5368), 1432–1435. <https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1432>
- Autran, M. (n.d.). *Detección de la presencia de auto-anticuerpos específicos contra citocinas y el análisis de su actividad biológica neutralizante en caninos, equinos y humanos*. UNAM, FES Cuautitlán.
- Baerlecken, N., Jacobs, R., Stoll, M., Schmidt, R. E., & Witte, T. (2009). Recurrent, Multifocal Mycobacterium avium-intercellulare Infection in a Patient with Interferon- $\gamma$  Autoantibody. *Clinical Infectious Diseases*, 49(7), e76–e78. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1086/605581>
- Barcenas-Morales, G., Jandus, P., & Döffinger, R. (2016). Anticytokine autoantibodies in infection and inflammation: An update. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 16(6), 523–529. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000316>
- Biet, F., Loch, C., & Kremer, L. (2002). Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *Journal of Molecular Medicine*, 80(3), 147–162. <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0307-1>
- Bliss, S. K., Marshal, A. J., & Zhang, Y. (1999). Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF- $\alpha$ , and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1  $\alpha$  and -1  $\beta$  in response to Toxoplasma gondii antigens. *Journal of Immunology*, 162.
- Boraschi, D., & Dinarello, C. A. (2007). IL-18 in autoimmunity: Review. *European Cytokine Network*, 17(4).
- Bremer, H. D., Landegren, N., Sjöberg, R., Hallgren, Å., Renneker, S., Lattwein, E., ... Hansson-Hamlin, H. (2018). ILF2 and ILF3 are autoantigens in canine systemic autoimmune disease. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23034-w>
- Browne, S. (2014). Anticytokine Autoantibody–Associated Immunodeficiency. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 635–657. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120222>
- Browne, S., & Holland, S. (2010a). Anti-cytokine autoantibodies explain some chronic mucocutaneous candidiasis. *Immunology and Cell Biology*, 88(6), 614–615. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Browne, S., & Holland, S. (2010b). Anticytokine autoantibodies in infectious diseases: Pathogenesis and mechanisms. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(12), 875–885. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70196-1)

- Cappellano, G., Orilieri, E., Woldetsadik, A. D., Boggio, E., Soluri, M. F., Comi, C.-F., ... Dianzani, U. (2012). Anti-cytokine autoantibodies in autoimmune diseases. *Am J Clin Exp Immunol*, 1(2), 136–146. Retrieved from www.ajcei.us
- Caragol, I., Raspall, M., Fieschi, C., Feinberg, J., Larrosa, N., Hernandez, M., ... Español, T. (2003). *Clinical Tuberculosis in 2 of 3 Siblings with Interleukin-12 Receptor 1 Deficiency. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* (Vol. 37). <https://doi.org/10.1086/375587>
- Chatzantoni, K., & Mouzaki, A. (2006). Anti-TNF- $\alpha$ ; Antibody Therapies in Autoimmune Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6(16), 1707–1714. <https://doi.org/10.2174/156802606778194217>
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J.-M., ... Rudensky, A. Y. (2011). Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*, 34(4), 566–578. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.018>. Interleukin-10
- Chen, N.-J., Huang, M.-W., & Hsieh, S.-L. (2001). Enhanced Secretion of IFN- $\gamma$  by Activated Th1 Cells Occurs Via Reverse Signaling Through TNF-Related Activation-Induced Cytokine. *The Journal of Immunology*, 166(1), 270–276. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.270>
- Conti, H. R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J. N., Lindemann, M. J., ... Gaffen, S. L. (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(2), 299–311. <https://doi.org/10.1084/jem.20081463>
- Cox, J. H., Dean, R. A., Roberts, C. R., & Overall, C. M. (2008). Matrix metalloproteinase processing of CXCL11/I-TAC results in loss of chemoattractant activity and altered glycosaminoglycan binding. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19389–19399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800266200>
- Cyktor, J. C., & Turner, J. (2011). Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infection and Immunity*, 79(8), 2964–2973. <https://doi.org/10.1128/IAI.00047-11>
- DeLeon, T. T., Chung, H. H., Opal, S. M., & Dworkin, J. D. (2014). Mycobacterium avium Complex Empyema in a Patient with Interferon Gamma Autoantibodies. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health*, 73(1), 15–17.
- Denkers, E. Y. (2003). From cells to signalling cascades: manipulation of innate immunity by Toxoplasma gondii. *Fed. Eur. Microbiol. Soc. Immunol. Med. Microbiol.*, 39, 193–203.
- Dinarello, C. A. (2003). Anti-cytokine therapeutics and infections. *Vaccine*, 21(2), S24–S34.
- Doffinger, R., Helbert, M. R., Barcenas- Morales, G., Yang, K., Dupuis, S., Ceron-Gutierrez, L., ... Kumararatne, D. S. (2004). Autoantibodies to Interferon- $\gamma$  in a Patient with Selective Susceptibility to Mycobacterial Infection and Organ-Specific Autoimmunity. *Clinical Infectious Diseases*, 38(1), e10–e14.

<https://doi.org/10.1086/380453>

Dubin, P. J., & Kolls, J. K. (2008). Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunological Reviews*, 226(1), 160–171. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00703.x>

Egli, A., Santer, D. M., O'Shea, D., Tyrrell, D. L., & Houghton, M. (2014). The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerging Microbes and Infections*, 3(March), 1–12. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.51>

Ercolini, A. M., & Miller, S. D. (2009). The role of infections in autoimmune disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 155(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03834.x>

Gershwin, L. J. (2007). Veterinary autoimmunity: Autoimmune diseases in domestic animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1109, 109–116. <https://doi.org/10.1196/annals.1398.013>

Gotsch, F., Romero, R., Friel, L., Kusanovic, J. P., Espinoza, J., Erez, O., ... Hassan, S. S. (2007). CXCL10/IP-10: A MISSING LINK BETWEEN INFLAMMATION AND ANTI-ANGIOGENESIS IN PREECLAMPSIA? *Journal of Maternal, Fetal and Neonatal Medicine*, 20(11), 777–792. <https://doi.org/10.1021/jm4004285.QSAR>

Gupta, S., & Fernandes, G. (2001). Immunodeficiency: Secondary. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001241.pub2>

Hewagama, A., & Richardson, B. (2009). The genetics and epigenetics of autoimmune disease. *Journal Of*, 33(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.03.007>.The

Höflich, C., Sabat, R., Rosseau, S., Temmesfeld, B., Slevogt, H., Döcke, W.-D., ... Suttrop, N. (2004). Naturally occurring anti-IFN- $\gamma$  autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia cocovenenans*. *Blood*, 103(2), 673 LP-675. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/103/2/673.abstract>

Huse, K., Böhme, H.-J., & Scholz, G. H. (2002). Purification of antibodies by affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51(3), 217–231. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088882>

Invernizzi, P., & Gershwin, M. E. (2009). The genetics of human autoimmune disease. *Journal of Autoimmunity*, 33(3–4), 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.07.008>

Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1), 23–63.

Jackson, A. J., Sobansky, M. R., & Hage, D. S. (2012). Principles and Applications of Immunoaffinity Chromatography. In A. J. Jackson, M. R. Sobansky, & D. S. Hage (Eds.), *Antibodies Applications and New Developments* (pp. 156–174). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/978160805264611201010156>

- Kampmann, B., Hemingway, C., Stephens, A., Davidson, R., Goodsall, A., Anderson, S., ... Levin, M. (2005). Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN- $\gamma$ . *Journal of Clinical Investigation*, 115(9), 2480–2488. <https://doi.org/10.1172/JCI19316>
- Kärner, J., Meager, A., Laan, M., Maslovska, J., Pihlap, M., Remm, A., ... Kisand, K. (2013). Anti-cytokine autoantibodies suggest pathogenetic links with autoimmune regulator deficiency in humans and mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 171(3), 263–272. <https://doi.org/10.1111/cei.12024>
- Kärner, J., Pihlap, M., Ranki, A., Krohn, K., Trebusak Podkrajsek, K., Bratanic, N., ... Kisand, K. (2016). IL-6-specific autoantibodies among APECED and thymoma patients. *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(2), 235–243. <https://doi.org/10.1002/iid3.109>
- Kasama, T., Strieter, R. M., & Standiford, T. J. (1993). Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1-a. *Journal of Experimental Medicine*, 178, 63–72.
- Kindt, T. J., Golsby, R. A., & Osborne, B. A. (2014). *Kuby. Immunology*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES.
- Kisand, K., Bøe Wolff, A. S., Podkrajsek, K. T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K. V., ... Meager, A. (2010). Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), 299–308. <https://doi.org/10.1084/jem.20091669>
- Kisand, K., Lilic, D., Casanova, J. L., Peterson, P., Meager, A., & Willcox, N. (2011). Mucocutaneous candidiasis and autoimmunity against cytokines in APECED and thymoma patients: Clinical and pathogenetic implications. *European Journal of Immunology*, 41(6), 1517–1527. <https://doi.org/10.1002/eji.201041253>
- Kitamura, T., Tanaka, N., Watanabe, J., Uchida, Kanegasaki, S., Yamada, Y., & Nakata, K. (1999). Idiopathic pulmonary alveolar proteinosis as an autoimmune disease with neutralizing antibody against granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(6), 875–880. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499925>
- Kivity, S., Agmon-Levin, N., Blank, M., & Shoenfeld, Y. (2009). Infections and autoimmunity - friends or foes? *Trends in Immunology*, 30(8), 409–414. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.05.005>
- Koopmann, W., Ediriwickrema, C., & Krangel, M. S. (1999). Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage-inflammatory protein-1 $\beta$ . *The Journal of Immunology*, 163(4), 2120. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/163/4/2120.short>
- Kotlarz, D., Marquardt, B., Barøy, T., Lee, W. S., Konnikova, L., Hollizeck, S., ... Klein, C. (2018). Human TGF- $\beta$ 1 deficiency causes severe inflammatory bowel disease and encephalopathy. *Nature Genetics*, 50(3), 344–348. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0063-6>

- Lahera, T. (2010). Conexión entre inmunodeficiencia primaria y autoinmunidad. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 26(1), 198–205.
- Lalive, P. H., Kreutzfeldt, M., Devergne, O., Metz, I., Bruck, W., Merkler, D., & Pot, C. (2017). Increased interleukin-27 cytokine expression in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0919-1>
- Li, Y., Cheng, H., Zuo, X. B., Sheng, Y. J., Zhou, F. S., Tang, X. F., ... Zhang, X. J. (2013). Association analyses identifying two common susceptibility loci shared by psoriasis and systemic lupus erythematosus in the Chinese Han population. *Journal of Medical Genetics*, 50(12), 812–818. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101787>
- Lin, L., Ibrahim, A. S., Xu, X., Farber, J. M., Avanesian, V., Baquir, B., ... Spellberg, B. (2009). Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathogens*, 5(12), e1000703–e1000703. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000703>
- Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N. O., & Stiles, J. K. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(3), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>
- Madariaga, L., Amurrio, C., Martin, G., García-Cebrian, F., Bicandi, J., Lardelli, P., ... Cisterna, R. (1998). Detection of anti-interferon-gamma autoantibodies in subjects infected by *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*.
- Maddur, M. S., Vani, J., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S., & Bayry, J. (2010). Autoimmunity as a predisposition for infectious diseases. *PLoS Pathogens*, 6(11), 1–4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001077>
- Maródi, L., Cypowij, S., Tóth, B., Chernyshova, L., Puel, A., & Casanova, J.-L. (2012). Molecular mechanisms of mucocutaneous immunity against *Candida* and *Staphylococci*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(5), 1019–1027.
- Meager, A., Wadhwa, M., Dilger, P., Bird, C., Thorpe, R., Newsom-Davis, J., & Willcox, N. (2003). Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: Preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. *Clinical and Experimental Immunology*, 132(1), 128–136. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02113.x>
- Morel, L. (2004). Mouse Models of Human Autoimmune Diseases: Essential Tools That Require the Proper Controls. *PLoS Biology*, 2(8), e241. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020241>
- Moser, B., & Willmann, K. (2004). Chemokines: Role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(SUPPL. 2), 84–90. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.028316>
- Niemand, C., Nimmesgern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., ... Müller-Newen, G. (2003). Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in Primary Human

- Macrophages Is Differentially Modulated by Suppressor of Cytokine Signaling 3. *The Journal of Immunology*, 170(6), 3263–3272.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3263>
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 20(10), 87–103.  
<https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10>
- Patel, S. Y., Ding, L., Brown, M. R., Lantz, L., Gay, T., Cohen, S., ... Holland, S. M. (2005). Anti-IFN- $\gamma$  Autoantibodies in Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Journal of Immunology*, 175(7), 4769–4776.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4769>
- Patel, S. Y., Doffinger, R., Barcenas-Morales, G., & Kumararatne, D. S. (2008). Genetically determined susceptibility to mycobacterial infection. *Journal of Clinical Pathology*, 61(9), 1006–1012. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.051201>
- Paulina Cortes. (2016). *ELABORACIÓN DE SISTEMAS DE ACOPLAMIENTO DE QUIMIOCINAS A MICROESFERAS PARA EL ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE AUTO-ANTICUERPOS EN MUESTRAS SÉRICAS*. UNAM FES Iztacala.
- Pedral-Sampaio, D. B., Netto, E. M., Brites, C., Bandeira, A. C., Guerra, C., Barberin, M. G., & Badaró, R. (2003). Use of Rhu-GM-CSF in pulmonary tuberculosis patients: results of a randomized clinical trial. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7(4), 245–252. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702003000400004>
- Petkovic, V., Moghini, C., Paoletti, S., Uguccioni, M., & Gerber, B. (2004). I-TAC / CXCL11 is a natural antagonist for CCR5 Abstract : The selective CXC chemokine receptor. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(September), 701–708.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.1103570.1>
- Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., Al-Jumaah, S., Al-Hajjar, S., Feinberg, J., ... Casanova, J.-L. (2002). Inherited Interleukin-12 Deficiency: IL12B Genotype and Clinical Phenotype of 13 Patients from Six Kindreds. *The American Journal of Human Genetics*, 70(2), 336–348. <https://doi.org/10.1086/338625>
- Price, J. V., Haddon, D. J., Kemmer, D., Delepine, G., Mandelbaum, G., Jarrell, J. A., ... Utz, P. J. (2013). Protein microarray analysis reveals BAFF-binding autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, 123(12), 5135–5145.  
<https://doi.org/10.1172/JCI70231>
- Puel, A., Döffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., ... Casanova, J.-L. (2010). Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(2), 291–297.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20091983>
- Puel, A., Picard, C., Lorrot, M., Pons, C., Chrabieh, M., Lorenzo, L., ... Casanova, J.-L. (2008). Recurrent Staphylococcal Cellulitis and Subcutaneous Abscesses in a Child with Autoantibodies against IL-6. *The Journal of Immunology*, 180(1), 647–654.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.647>

- Reverberi, R. (2007). Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus. Blood Transfus*, 227–240.
- Rosenberg, J. M., Price, J. V., Barcenas-Morales, G., Ceron-Gutierrez, L., Davies, S., Kumararatne, D. S., ... Utz, P. J. (2016). Protein microarrays identify disease-specific anti-cytokine autoantibody profiles in the landscape of immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(1), 204–213.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.032>
- Ross, M., & Pawlina, W. (2013). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*.
- Rossi, D., & Zlotnik, A. (2000). The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annual Review of Immunology*, 18(1), 217–242. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.217>
- Rowley, M., & Whittingham, S. (2015). The Role of Pathogenic Autoantibodies in Autoimmunity. *Antibodies*, 4(4), 314–353. <https://doi.org/10.3390/antib4040314>
- Roy, I., Evans, D. B., & Dwinell, M. B. (2014). Chemokines and chemokine receptors: Update on utility and challenges for the clinician. *Surgery (United States)*, 155(6), 961–973. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2014.02.006>
- Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M., & Flavell, R. A. (2009). Anti-and Pro-inflammatory Roles of TGF- $\beta$ , IL-10 and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.04.008>.Anti-
- Sarantopoulos, S., & Su, M. A. (2013). BAFF-ling autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation*, 123(12), 5006–5008. <https://doi.org/10.1172/JCI73166>
- Schoenardie, E. (2014). Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*. *Post-Graduate Program in Parasitology, Department of Microbiology*, 403–406.
- Scholten, D. J., Canals, M., Maussang, D., Roumen, L., Smit, M. J., Wijtmans, M., ... Leurs, R. (2012). Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *British Journal of Pharmacology*, 165(6), 1617–1643. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01551.x>
- Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., & Bahar, M. (2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0177-y>
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., ... Klucher, K. M. (2003). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology*, 4(1), 63–68. <https://doi.org/10.1038/ni873>
- Strange, A., Capon, F., Spencer, C. C. A., Knight, J., Weale, M. E., Allen, M. H., ... Trembath, R. C. (2010). A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nature Genetics*,

42(11), 985–990. <https://doi.org/10.1038/ng.694>

- Sun, L., He, C., Nair, L., Yeung, J., & Egwuagu, C. E. (2015). Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*, 75(2), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.030>. Interleukin
- Syedbasha, M., & Egli, A. (2017). Interferon Lambda: Modulating immunity in infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00119>
- Thapa, M., Welner, R. S., Pelayo, R., & Carr, D. J. J. (2008). CXCL9 and CXCL10 expression are critical for control of genital herpes simplex virus type 2 infection through mobilization of HSV-specific CTL and NK cells to the nervous system. *Journal of Immunology*, 180(2), 1098–1106.
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Volin, M. V., & Koch, A. E. (2011). Interleukin-18: A Mediator of Inflammation and Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31(10), 745–751. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0050>
- Wang, F., Xu, L., Feng, X., Guo, D., Tan, W., & Zhang, M. (2012). Interleukin-29 modulates proinflammatory cytokine production in synovial inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 14(5), R228. <https://doi.org/10.1186/ar4067>
- Winthrop, K. L., Chang, E., Yamashita, S., Iademarco, M. F., & LoBue, P. A. (2009). Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy. *Emerging Infectious Diseases*, 15(10), 1556–1561. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090310>
- Zlotnik, A., & Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity*, 36(5), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.008>

## 11. APENDICES

### 11.1. Apéndice 1 (Tablas)

Subgrupo	Edad (Géneror F/M) Paciente	ENFERMEDADES AUTOINMUNES																	
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																	
		Citocinas Proinflamatorias						Citocinas Antiinflamatorias						Quimocinas					
		IL-1b	IL-12	IL-15	IL-18	IL-21	IL-28B	Leptin	IL-28Ra	IL-10	vIL-10 (CMV)	G-CSF	IL-10Ra	I-309	MIP-3a	MDC	IP-10	I-TAC	SDF-1a
Anemia hemolítica inmunomediada	D103 F (9)	4418	728	1473	6912	1026	2374	1413	3852	1425	1920	1779	1909	5266	4832	4340	7407	4883	5343
	D120 M (6)	6500	1087	2232	10563	1453	4002	2275	8559	1817	2733	2748	2401	8342	8424	8089	13702	9788	7707
	D127 F (5)	69	6	1	4	1	7	5	45	5	17	16	27	1	96	57	92	28	1
Artritis reumatoide	D117 M (6)	2857	23153	1079	1836	959	2022	1298	13234	905	1056	1332	2110	2430	3125	2928	3932	3622	3065
	D147 F (8)	19	1	8	1	1	20	13	26	1	8	15	14	1	6	38	25	1	1
	D111 F (17)	3678	501	1943	1765	1593	2699	1975	6337	1965	3870	1759	2256	6473	7008	5011	7542	7269	7101
	D22 M (8)	4065	329	3074	849	1732	4840	2135	6872	2392	2743	2311	2835	6184	5521	3303	6152	5794	6802
	D53 F (6)	1157	1534	602	2135	423	724	625	946	525	542	504	541	3410	3152	3431	2998	2709	3238
Epidermolisis bullosa	D150 F (2)	11379	31662	3493	26519	3391	7736	5024	9048	4891	6342	5138	5078	23650	25307	25278	25486	24616	20680
	D13 M (2)	9969	984	17852	1783	8985	10442	9095	24600	10558	6171	5944	8014	7870	4593	5784	8765	9223	6670
	D6 M (3)	5589	732	999	9091	924	1489	1288	6767	1376	3245	1218	1120	5948	5729	5683	6294	5456	7746
Lupus eritematoso sistémico	D128 M (12)	1	1	1	1	1	1	7	3	1	15	2	9	1	1	1	1	1	1
	D149 M (6)	53	7	7	11	6	58	23	59	11	34	20	23	1	134	95	121	106	1
	D1 F (5)	10666	9593	10647	7523	6676	11576	9637	14724	8607	14513	9531	10557	15794	12167	8193	17484	19118	22132
	D18 M (7)	74	2872	40	14	21	100	52	51	33	54	30	66	1	48	65	89	78	1
Miastenia Gravis	D35 F (6)	2706	1940	1311	979	946	2281	1430	5978	1315	2166	1381	1557	4974	6968	4027	6885	5026	5978
	D36 F (4)	42	7	35	6	23	81	47	50	34	38	49	67	1	134	34	20	46	1
	D85 F (9)	5141	8530	2266	2383	1695	2617	2442	6140	2387	3345	2687	2709	10167	11323	9194	15617	11322	14138
	D107 F (2)	8949	4639	3876	2481	3171	6026	5485	21986	4929	5450	5377	5140	2659	6553	5285	7321	7068	2803
	D112 F (3)	3847	29557	8812	1016	4025	7316	4904	2626	4752	4136	3611	5101	5445	14129	7826	16465	15456	11109
Myositis	D2 F (7)	24	3	11	6	7	84	20	1	14	13	12	13	1286	210	38	127	79	1644
	D15 F (6)	2398	912	952	415	517	1046	799	2854	805	675	910	1095	3310	2937	1579	3330	3018	4520
	D25 F (6)	5159	32265	2527	14968	1631	3551	1979	6194	2274	3561	2583	2453	17681	19147	19594	19811	19019	19493
Penfigo	D138 M (9)	45	4	9	14	1	30	19	32	8	35	14	23	1	1	52	5	61	1
	D145 M (10)	22	4	5	4	0	1	9	16	6	15	9	15	1	1	25	8	1	1
	D146 F (4)	35	10	8	8	1	4	2	29	2	17	8	9	1	52	29	64	11	1
	D153 M (3)	12817	31712	3164	26214	3638	8217	4987	9231	4808	6460	4952	4979	23638	25540	25836	25600	24811	21158
	D17 M (6)	6528	304	1084	8458	764	1988	1165	19708	1264	1183	2878	1664	7364	5485	5361	4646	4429	5430
	D12 M (6)	7164	769	6655	26626	3759	5553	4631	6737	5115	4643	3664	4452	21265	18847	20607	20954	18231	16549
Queratitis ulcerativa inmunomediada	D115 F (9)	5087	1305	2273	15671	1533	3027	2189	3923	1932	3234	2404	2578	11600	11047	12031	12979	11515	12333
	D118 M (2)	7099	3413	2539	4047	1737	3083	2382	2833	2367	3005	2122	2741	7169	7874	6829	8986	10151	7882
	D126 F (4)	25	1	19	4	7	8	51	24	22	70	13	23	1	20	1	32	1	1
	D136 2 (M)	19197	28381	4303	16230	10913	21457	14662	17525	15099	10765	18320	20367	17040	21667	22472	21932	20375	14134
	D5 M (3)	4402	899	2475	4703	1881	5376	2439	3911	2484	1951	3490	4444	5027	3162	3272	4742	5099	7346
	D14 M (4)	9796	4563	4715	2378	3302	4342	3886	7346	4116	5392	4364	4100	9801	8248	7118	11389	11663	10343
	D32 F (4)	4184	1106	2797	1065	1443	3439	2311	6368	2416	2690	2073	2691	6448	8357	6291	18770	7364	8100
Síndrome paraneoplásico y tiroiditis	D109 M (10)	5941	3655	2143	4377	1290	2669	2333	10120	2196	2540	3557	2109	9741	9983	6475	10989	9307	11806
Síndrome poliglandular autoinmune sin infecciones	D151 F (2)	2897	31042	813	8155	799	2000	956	1798	1059	812	1157	1138	4780	5212	5153	4993	4586	3506
Tiroiditis	D106 F (8)	7396	3838	6247	7434	3163	4913	4943	12432	4620	5188	4790	4646	9508	10113	9297	11416	11383	11760
	D119 M (1)	2779	20380	558	1316	429	1468	673	9732	653	635	717	1225	1756	2211	1741	2212	2464	1763
	D137 M (7)	20	7	13	19	1	1	1	128	1	115	0	1	1	1	161	13	60	1
	D139	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1	1	1
Trombocitopenia inmunomediada	D105 M (3)	4000	434	1590	1526	1655	2666	2570	3180	2181	1947	2028	2202	513	4153	3812	4991	3846	405
Total de muestras con altos niveles de auto-anticuerpos anti-citocinas		1	8	1	5	0	1	0	4	1	0	1	1	6	5	5	9	7	5

**Tabla 1. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en perros con enfermedades autoinmunes (N=44).** El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15,000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente Género (Edad)	ENFERMEADES INFECCIOSAS																	
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																	
		Citocinas Proinflamatorias						Citocinas Antiinflamatorias						Quimiocinas					
		IL-1b	IL-12	IL-15	IL-18	IL-21	IL-28B	Leptin	IL-28Ra	IL-10	vIL-10 (CMV)	G-CSF	IL-10Ra	I-309	MIP-3a	MDC	IP-10	I-TAC	SDF-1a
Infección Bacteriana	D140 F (3)	6261	2416	3554	4386	3207	5145	4745	13495	3697	4189	4465	4136	4722	7947	7451	9501	7542	4969
	D3 F (9)	28	11	22	13	12	76	35	27	25	27	25	30	600	196	49	89	147	958
	D21 F (5)	5246	1584	2001	3052	1000	2913	1788	8568	1375	1926	2096	1947	9456	6479	4913	16870	5961	8128
Infección Fúngica	D133 M (8)	61	19	42	27	26	136	79	81	42	96	72	69	1	240	194	244	244	1
	D142 F (8)	4484	934	1622	5519	1565	3166	1861	12996	1609	2334	2282	2341	12302	13625	12903	13420	12999	12485
	D8 F (1)	19219	1486	20271	8506	11436	18632	13033	8654	18193	10295	9695	15090	14717	12710	14841	21169	19228	15879
	D124 F (8)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	D114 F (8)	5954	27169	2076	5265	1500	1982	2210	11877	2136	3269	1805	1851	6001	6603	5544	9207	7203	6184
	D129 M (5)	8905	417	10695	2011	4764	15889	10179	6317	7079	5043	9344	17889	10991	7573	5651	13377	14794	8429
	D38 F (3)	54	1	20	14	31	198	53	12	44	91	125	158	1	12	10	1	1	1
	D113 M (4)	5320	2337	5962	714	3502	6199	5097	2007	4812	4299	2701	3840	3757	3712	2516	4361	3712	3630
Infección Viral	D132 M (4)	209	8	130	31	188	340	221	61	215	208	372	357	1	1	60	1	1	1
	D141 M (2)	921	6213	505	434	532	472	695	882	607	519	417	430	1	1113	960	1525	1194	1
	D62 M (3)	15215	24264	13454	11252	6317	11368	10269	2929	10211	7225	7218	10033	5231	5371	8429	6491	5975	5327
	D24 M (9)	1713	155	456	479	258	1349	479	1502	427	1057	357	356	1515	1568	1028	1768	1589	3338
	D40 F (10)	2052	1262	870	705	639	1731	1079	4285	1118	1718	1082	1097	3815	5324	3152	5339	4131	4792
	D123 F (1)	7535	6752	2437	1086	1596	2082	2153	9627	2080	2046	2630	1804	4556	5184	4062	6626	5408	11665
	D23 M (10)	5171	3045	3650	4480	2129	3404	2523	9111	2844	4171	2369	2702	6141	6556	5310	7599	6605	8474
	D144 M (4)	37	43	25	15	21	45	35	34	27	37	34	45	1	117	54	94	10	1
D122 M (3)	6663	6211	1705	1878	1193	3295	1682	9672	1741	2722	1933	1669	5483	7340	5726	6478	5796	7012	
Total de muestras con altos niveles de autoanticuerpos anticitocinas		2	2	1	0	0	2	0	0	1	0	0	2	0	0	0	2	1	1

**Tabla 2. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en perros con enfermedades infecciosas (N=20).** El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15, 000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente Género (Edad)	ENFERMEDADES AUTOINMUNES E INFECCIOSAS																	
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																	
		Citocinas Proinflamatorias								Citocinas Antiinflamatorias				Quimiocinas					
		IL-1b	IL-12	IL-15	IL-18	IL-21	IL-28B	Leptin	IL-28Ra	IL-10	vIL-10 (CMV)	G-CSF	IL-10Ra	I-309	MIP-3a	MDC	IP-10	I-TAC	SDF-1a
Atopia e infecciones bacterianas	D125 M (11)	600	222	465	300	246	953	504	705	414	1657	564	686	1475	2336	1547	2737	2229	2368
	D116 M (2)	5839	29397	9857	2684	7600	9390	8863	4385	8966	8742	6239	7416	2378	6833	11143	10697	12745	3154
	D121 F (2)	973	856	1442	4300	1025	2390	1508	3044	1411	1866	1589	2263	2608	10112	9490	17265	8606	1833
	D130 F (6)	89	13	32	9	31	165	41	144	48	53	105	110	1	100	62	134	74	1
	D148 F (5)	51	15	19	17	17	90	21	74	24	34	26	42	1	40	75	91	79	1
	D10 F (2)	9941	7629	7115	6021	4136	7072	5913	12487	5901	4733	4052	4518	13311	10075	9642	20847	12846	15823
	D9 F (4)	3746	791	1235	6262	1136	1256	1655	8768	1627	1923	1246	1220	5304	5148	4381	5020	3744	6035
Enfermedad inflamatoria crónica intestinal e infecciones recurrentes	D20 M (2)	6589	9747	2544	2971	2264	3618	2488	10155	1958	2089	24301	2579	7006	6607	5231	7651	6430	7687
	D37 M (3)	67	4	63	15	46	100	61	96	61	57	73	92	1	85	41	154	116	1
	D110 F (3)	5441	2948	1964	3825	1259	2431	1839	9256	1745	1986	2953	1818	9822	9578	6628	9343	9460	11543
	D111 M (1)	897	1255	1382	8657	874	1850	1396	2393	1176	2103	1270	1452	3736	8781	7195	9543	8379	5828
	D131 M (7)	39	27	20	15	11	55	37	44	8	48	28	30	1	66	72	70	11	1
	D134 F (3)	7309	6760	3684	6127	3284	5436	5276	21185	3986	4589	5230	4546	8936	10829	10740	14052	11647	7841
	D143 F (3)	12197	3077	5177	1746	8699	19097	14095	5787	10087	10519	18840	19118	4494	7056	6100	7702	7789	3915
Glomerulonefritis (autoinmune e infecciosa)	D152 M (5)	2557	31257	737	7483	599	1629	991	1445	844	790	969	836	4532	4832	4875	4549	3739	3198
Inmunodeficiencia e infecciones fúngicas	D135 M (2)	32	8	17	7	17	69	48	28	33	33	55	60	1	117	56	112	25	1
	D4 M (2)	5737	794	3695	2041	2342	4067	3082	4217	3094	3462	2642	3353	8080	7322	5809	8908	8017	10498
	D39 F (4)	41	3	29	1	14	79	27	24	23	25	37	44	22	142	20	97	75	6
	D72 F (3)	3149	28852	1984	6649	1118	2016	1463	5222	1462	1736	1869	1460	9906	9979	10927	12119	9770	12155
Total de muestras con altos niveles de auto-anticuerpos anti-citocinas		0	3	0	0	0	1	0	1	0	0	2	1	0	0	0	2	0	1

**Tabla 3. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en perros con enfermedades autoinmunes e infecciosas (N=19).** El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15, 000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Muestra	INDIVIDUOS CLÍNICAMENTE SANOS																	
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																	
		Citocinas Proinflamatorias							Citocinas Antiinflamatorias				Quimiocinas						
IL-1b	IL-12	IL-15	IL-18	IL-21	IL-28B	Leptin	IL-28Ra	IL-10	vIL-10 (CMV)	G-CSF	IL-10Ra	I-309	MIP-3a	MDC	IP-10	I-TAC	SDF-1a		
Controles Negativos	HC1	50	3	34	6	22	102	53	47	32	33	43	65	148	133	46	55	69	1
	HC2	43	4	44	11	35	80	48	51	41	46	49	71	7	107	66	69	54	1
	HC3	46	3	41	10	20	74	41	41	37	40	41	60	1	108	16	51	55	1
	HC4	431	191	297	202	253	674	345	1860	323	381	387	483	1961	2690	1665	2390	2226	2682
	HC5	5750	2248	1319	1741	1287	1389	1933	1911	2029	2974	1330	1417	3242	3818	2801	3703	4338	5793
	HC6	1886	598	757	902	616	1477	1014	6270	868	1782	847	1009	4387	9071	2282	3248	2892	11605
	HC7	1678	537	648	897	590	1409	874	5940	847	1603	841	921	4163	8993	1956	2994	2783	11048
	HC8	1778	622	697	926	679	1588	1023	6500	967	1798	923	978	4624	9957	2521	3918	3329	11407
	HC9	2009	616	679	846	644	1597	957	7182	920	1851	954	1096	4594	11456	2586	3755	3145	11674
	HC10	2130	652	804	983	683	1681	1173	6824	1019	1774	1096	1202	4835	11981	2514	3882	3308	11853
	HC11	2155	606	791	933	677	1659	926	6379	853	1722	953	1064	4598	10890	2349	3510	3028	11044
	HC12	1945	557	583	840	547	1395	941	5658	865	1476	863	885	4307	9577	2235	3211	2696	9999
	HC13	554	180	226	402	225	431	374	1331	311	582	295	332	1177	2661	590	806	748	1887
	HC14	1593	436	560	754	425	1135	828	4437	755	1300	758	762	3602	8322	1774	2564	2284	7936
	HC15	1723	571	732	930	533	1478	993	5772	887	1651	910	1057	4429	9343	2321	3152	3227	10686
	HC16	2154	654	741	957	638	1629	1096	6960	1010	1853	996	1112	4723	10373	2400	3717	3190	12857
	HC17	663	58	419	159	457	611	697	1879	585	619	1981	531	1	497	504	1025	808	1
	HC18	691	74	431	199	498	671	638	1912	631	642	2176	579	1	587	602	1136	1191	1
	HC19	650	91	450	209	505	769	657	2558	664	684	2855	491	1	844	713	1428	1567	1
	HC20	668	68	485	184	552	783	705	1696	674	663	1959	610	1	663	660	1018	1225	1
	HC21	608	64	479	164	479	782	683	1499	720	702	1963	603	1	515	544	890	961	1
	HC22	639	51	395	147	442	636	568	1515	596	595	1884	457	1	335	589	925	1033	1
	HC23	644	61	422	156	495	657	631	1462	635	574	2135	466	1	561	588	987	1404	1
	HC24	665	65	410	162	422	682	538	1444	593	615	1929	551	1	552	562	1025	1052	1
	HC25	620	74	429	181	473	781	649	2101	684	667	2021	580	1	718	560	1065	1106	1
	HC26	621	59	411	143	444	674	590	1740	612	566	1934	536	1	438	596	1016	1056	1
	HC27	604	15	339	111	466	546	553	1197	483	465	1394	559	1	154	313	462	747	1
	HC28	588	24	392	97	408	587	596	1740	551	427	1293	580	1	265	338	526	706	1
	HC29	591	23	362	112	389	618	601	936	554	448	1258	581	1	187	366	564	692	1
	HC30	654	49	405	119	473	676	758	952	634	450	1412	608	1	216	421	514	650	1
	HC31	765	68	504	133	561	843	736	1259	781	516	1542	728	1	240	317	441	788	1
	HC33	602	67	382	107	414	568	549	1312	548	417	1067	535	1	113	234	381	691	1
	HC34	2754	1252	1006	973	1022	843	1338	1484	1331	1850	1316	1145	1	1562	1998	1459	2032	1
	HC36	7123	3413	1680	1856	1884	1932	2263	2824	2462	4270	2065	2178	4121	5458	5054	5268	6011	7039
	HC42	107	40	10	6	1	1	1	112	1	1	1	2	1	119	4	74	5	1
	HC48	2699	433	1364	6088	1010	3010	1658	2903	1293	7257	2601	3093	5098	5122	5666	6636	5378	5357
	HC63	1	34	1	5	1	1	1	12	1	1	1	1	361	63	1	9	4	311
	HC65	2643	361	1114	1879	1132	5262	1609	2536	1423	1937	1829	1864	6100	7209	4321	6999	5493	5244
	HC66	4513	6999	1845	845	1480	2487	2073	2673	1716	1289	2678	1883	2297	2536	1553	4229	3688	2866
	HC68	7062	3205	4930	1181	990	6999	1531	4369	922	2256	1150	2554	4067	4415	3093	3973	4201	1895
	HC71	5729	1363	2238	1856	1611	1852	1500	6999	1446	6999	2111	1652	5981	6104	4794	6615	6171	6990
	HC72	1670	2419	787	4256	467	2758	763	3071	538	623	1201	861	3735	3929	3271	3882	2955	3166
	HC73	1033	937	294	495	232	1687	320	711	253	306	498	328	1640	1534	864	1537	1421	1655
	HC80	1	12	13	10	8	1	7	51	9	10	2	9	1	74	29	22	25	1
	HC82	2380	2880	1990	3803	1031	2427	1474	3590	1252	1348	2149	2090	5218	5398	5333	6215	5309	4748
	HC84	27	30	21	5	19	12	25	14	13	20	25	35	94	77	12	75	67	189
	HC85	2036	6021	2144	5224	1971	4065	2667	7429	1961	2574	3267	4145	4091	6162	4565	6902	6794	2589
	HC86	6010	1277	3545	2623	2076	2995	2322	6999	1967	2025	3202	3230	5706	6553	5441	6999	6999	6872
	HC89	1026	1892	584	2006	327	1952	507	1552	408	433	808	585	2454	2576	1959	2498	2274	1990
HC93	5631	914	2059	2005	1577	2222	2226	5901	1966	3904	2286	1913	5650	5304	4085	5903	6106	4800	
Total de muestras con altos niveles de auto-anticuerpos anti-citocinas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 4. Niveles de anticuerpos anticitocinas en individuos clínicamente sanos (N=50). El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15, 000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.**

Subgrupo	Paciente	ENFERMEADES AUTOINMUNES																								
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																								
		Citocinas Proinflamatorias												Citocinas Antiinflamatorias								Quimiocinas				
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFa	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC			
Pt19	1264	739	2103	1191	1119	639	18272	9765	376	1416	980	3219	1182	4627	5175	5994	1804	866	1119	1042	1826	345	804	1472		
Pt20	131	92	157	124	179	109		106	82	108	338	240	1863	4011	111	425	173	172	283	148	422	314	83	92		
Pt21	223	187	256	310	7704	267	2008	779	219	191	1131	204	796	1847	25936	4439	488	314	4032	446	135	897	207	1494		
Pt23	336	179	530	134	23860	144	6841	2007	73	199	414	118	266	1093	1025	1632	351	207	1263	254	1179	668	238	1352		
Pt98	1156	692	2834	47	2707	634	1195	196	122	191	652	564	712	887	3992	9625	548	2770	11097	499	544	495	175	27299		
Pt99	1025	244	8123	90	379	1145	251	113	37	264	1194	1521	177	292	2550	13281	171	4474	14386	382	208	342	548	2703		
Pt100	1188	109	73	34	1539	84	438	29171	95	67	206	117	1046	699	5821	761	233	4902	1139	1563	1069	494	393	31378		
Pt101	1200	24	277	17	6268	160	493	68	50	75	198	185	692	1104	2163	2620	462	3031	4202	1406	936	559	401	5310		
Pt102	163	218	568	163	605	180	1180	257	144	335	199	459	261	561	1710	2874	224	3709	361	211	250	6270	120	4629		
Pt103	86	490	117	329	100	28	181	61	45	67	45	158	78	153	415	386	77	6408	64	39	99	182	30	3669		
Pt104	589	22909	628	36	5010	45	319	30	95	68	602	139	1344	1182	3209	569	264	4785	597	1082	996	402	818	15363		
Pt105	179	11	46	11	20	0	27	12	9	15	5	9	6	22	38	62	15038	2673	7	222	10	21	2	266		
Pt106	195	125	4069	176	1417	641	436	541	51	155	829	1773	5469	4305	2500	8404	332	10831	10389	206	223	547	170	5025		
Pt107	564	64	7	19	831	217	428	3	6427	9	12	339	9588	11076	3972	3391	814	4694	5578	880	279	1049	402	9838		
Pt108	570	561	417	1	1413	182	245	45	44	91	978	266	387	351	1358	4786	235	5710	4484	683	966	298	114	4661		
Pt109	355	266	8039	343	695	127	495	223	308	540	234	461	241	995	3583	1154	282	3654	446	270	149	739	100	17142		
Pt110	170	364	2574	275	208	154	790	289	132	297	143	259	151	486	2054	813	27168	5483	224	155	182	1454	176	9288		
Pt111	251	100	1671	237	69	60	288	145	60	249	375	204	1175	1774	331	561	448	7842	675	353	546	462	272	5753		
Pt112	129	178	20187	322	1470	879	1799	668	243	725	173	207	177	575	9783	7572	369	4898	1117	265	269	2442	208	2153		
Pt113	2052	110	514	153	9930	1091	1797	76	182	144	261	2253	1215	1747	12685	12833	1285	10541	15172	1656	1289	2584	1049	30497		
Pt114	195	184	265	148	159	126	251	281	36	130	239	283	1113	1760	1130	1597	207	4760	2252	324	379	396	102	4671		
Pt115	426	109	748	65	481	520	632	65	106	129	226	1193	5807	6770	1098	6140	430	6883	1136	711	2327	1104	159	8972		
Pt116	7201	370	367	1	1447	65	267	26720	29	215	448	51	398	4160	10450	1512	244	12688	7635	2367	728	455	1572	1589		
Pt117	563	2958	102	147	1766	88	170	68	2012	68	96	611	307	273	6353	4936	491	9487	1049	535	225	362	472	480		
Pt118	920	5101	6272	38	2028	231	257	54	24	103	10893	529	649	657	1933	7373	358	3208	1758	667	135	286	928	832		
Pt119	1156	751	1552	38	2674	53	258	142	45	122	262	84	1252	1576	1702	2197	403	14114	1246	519	165	340	261	595		
Pt120	1095	57	446	26	3742	234	473	144	56	85	174	214	597	6232	3150	4575	286	6916	1542	6805	536	744	364	9314		
Pt121	253	224	1635	285	484	1257	2168	479	451	1326	254	377	524	3973	2289	8309	372	3748	641	590	524	2845	241	5972		
Pt122	1	194	214	124	146	134	117	65	85	5754	56	154	305	2493	600	2069	100	13140	99	1412	67	185	36	6845		
Pt123	332	422	2357	174	227	253	835	436	166	340	145	147	142	209	3945	2996	254	18212	836	204	411	960	127	4365		
Pt124	342	82	2283	30	2306	72	236	65	77	97	469	77	491	500	1882	904	314	13256	296	266	1131	300	7160	13014		
Pt125	141	227	77	178	169	97	280	80	74	264	124	231	158	724	3568	1771	170	2682	659	120	224	462	48	19559		
Pt126	113	420	877	896	196	116	134	118	174	254	124	167	97	276	4766	626	273	14877	850	131	126	344	78	7318		

Continúa...

Tabla 5. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en humanos con enfermedades autoinmunes (N=118). El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15, 000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente	ENFERMEDADES AUTOINMUNES																							
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																							
		Citocinas Proinflamatorias											Citocinas Antiinflamatorias							Quimioquinas					
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFa	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC		
Enfermedad Inflamatoria Intestinal	Pt127	129	4600	98	117	86	90	303	157	82	125	56	59	48	294	4820	1216	155	11029	89	289	72	7540	91	1741
	Pt128	421	492	1167	14	551	309	714	99	83	85	1782	249	778	489	1857	5639	721	14082	926	1308	1717	965	822	25045
	Pt129	1309	104	2323	105	2175	45	473	56	101	128	266	138	1408	2914	14897	1107	290	4559	633	1505	345	1174	1106	7065
	Pt130	76	212	1697	134	414	141	558	136	141	334	124	87	297	682	4616	1484	205	6474	861	138	134	1217	99	3949
	Pt131	1	692	93	112	321	107	270	145	71	374	76	115	73	358	625	1657	26033	4176	166	355	186	603	60	7293
	Pt132	122	176	33	105	91	729	141	45	31	287	27	77	30	221	1655	6342	25662	3221	104	328	49	286	26	7596
	Pt133	312	5079	286	223	566	141	615	266	188	500	140	386	141	342	3388	1412	309	10337	754	169	610	8761	141	4139
	Pt134	773	170	1440	24	499	123	162	46	19	73	271	463	1146	364	3652	10304	143	2585	690	516	72	279	86	5278
	Pt135	970	115	862	5	1456	510	330	41	34	157	328	1990	266	526	1186	12173	659	2620	2392	407	320	383	101	7779
	Pt136	499	102	127	1	1937	106	467	201	37	65	2139	299	2438	3091	1055	477	183	4498	530	375	393	846	3174	14490
	Pt137	262	1136	3253	265	122	314	7026	287	233	1343	120	114	90	369	2432	4737	287	3138	304	219	245	11264	246	3896
	Pt138	1156	45	110	1	2130	418	356	144	44	52	514	444	282	335	8974	7504	250	6360	1971	462	288	505	338	5940
	Pt139	81	105	66	117	116	124	185	172	85	1016	86	88	93	290	879	2152	190	7147	92	130	365	358	109	24386
	Pt140	139	29	80	52	71	132	116	33	41	117	45	54	53	112	1808	1889	56	3025	339	54	39	176	20	692
	Pt141	44	110	127	139	508	407	576	132	180	443	132	230	184	631	3139	3662	177	6686	528	226	140	746	85	4299
	Pt142	2608	266	94	38	201	577	647	65	43	21	90	531	389	567	3677	5745	167	4410	4868	678	69	921	1046	1968
	Pt143	141	91	650	168	140	25	83	26942	48	127	95	104	180	368	517	752	23989	3138	688	222	205	160	841	926
	Pt144	96	388	99	128	601	96	425	106	94	179	244	352	154	203	1975	1031	155	4869	384	285	138	537	68	3755
	Pt145	826	46	2047	1	2188	120	1182	122	19	21	386	70	312	462	2779	1191	446	7115	1116	363	159	1364	301	3037
	Pt146	647	171	4709	172	1466	38	169	2691	40	181	8025	478	1002	1087	3748	1148	5270	12058	1183	723	710	275	25511	2010
	Pt147	1659	926	493	1	1564	200	701	111	42	50	157	103	355	3769	2459	3142	173	4865	1752	530	4410	702	1271	6412
	Pt148	11102	254	370	38	5928	1054	938	215	116	141	367	1997	1080	861	15707	14346	26894	4156	15050	1900	420	977	2385	5239
	Pt149	381	184	178	1	1653	589	541	95	67	302	667	462	644	315	1093	12881	26463	9363	1840	307	252	656	246	8050
	Pt150	1531	153	194	37	934	48	660	190	176	72	1349	129	855	1019	3528	1113	119	10734	1661	898	1130	1066	811	1415
	Pt151	1	103	584	100	2282	107	415	147	57	184	58	65	85	294	3370	1117	159	3957	618	68	219	785	65	1811
	Pt152	808	61	627	1	537	110	361	109	38	35	2631	144	186	180	2065	2216	91	8025	753	4711	529	419	4525	693
	Pt153	1457	1029	178	8	533	51	404	71	55	39	62	262	1252	9355	2415	1262	27825	2927	1799	400	170	435	516	1185
	Pt154	4820	2685	1802	306	6206	201	867	168	67	293	15540	711	2826	3571	9767	1872	231	2627	5763	2191	715	1097	1515	15280
Pt155	1182	114	492	1	417	98	380	85	82	37	1167	1292	3257	3301	3007	3787	94	6091	2026	524	203	498	402	1468	
Pt156	1681	30	87	1	294	52	147	102	41	13	340	26	313	345	3524	252	362	5896	2040	782	106	172	225	25679	
Pt157	801	10666	12692	634	1458	158	1224	231	55	231	6665	225	838	860	3088	643	3505	4159	1248	631	512	1654	431	9325	
Pt158	1180	97	104	1	3159	978	1149	160	16	68	1688	807	2369	2727	2436	15417	25183	9207	2309	28160	416	1179	343	8593	
Pt159	244	153	572	301	3232	148	342	218	184	1346	544	1437	1934	10535	1139	271	269	15933	345	756	326	393	275	6311	

Continúa...

Tabla 5. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en humanos con enfermedades autoinmunes (N=118). El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15,000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente	ENFERMEDADES AUTOINMUNES																							
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																							
		Citocinas Proinflamatorias												Citocinas Antiinflamatorias								Quimiocinas			
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFa	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC		
Enfermedad Inflamatoria Intestinal	Pt160	819	69	145	1	1078	209	445	111	45	58	1784	220	432	532	1974	2862	277	6434	1284	316	400	2135	260	23245
	Pt161	3548	2737	1849	1700	9034	565	2970	465	129	672	670	961	2464	3580	4367	2550	703	7788	3600	2385	2286	4245	1356	11935
	Pt162	2224	2082	162	207	1967	355	2326	74	68	49	217	778	4766	6221	3857	3260	989	8664	3079	663	264	2110	394	19301
	Pt163	238	72	91	2	3061	53	215	72	24	39	714	76	1649	392	2947	779	122	7990	272	275	159	663	93	2808
	Pt164	753	54	170	1	1127	102	397	73	64	31	1440	375	951	599	1316	622	123	7691	931	1464	116	442	264	1773
	Pt165	1157	117	137	41	751	89	288	119	54	86	2662	985	1459	1210	1709	282	743	4124	1224	409	404	344	227	17999
	Pt166	325	59	81	1	1806	340	195	105	121	42	1052	2863	27739	28458	491	369	276	11926	262	410	110	338	89	7153
	Pt167	2805	70	121	1	2489	114	208	88	101	60	501	119	1360	1027	2236	329	226	14555	1435	440	133	4953	337	5859
	Pt168	177	95	115	8	201	25	336	157	26	72	862	268	341	615	460	243	299	7046	134	347	238	442	435	21051
	Pt169	1167	37	35	1	1623	35	405	75	87	32	167	30	221	667	2075	272	92	15203	1420	418	80	539	292	508
	Pt170	336	112	134	102	20410	180	10516	191	348	148	135	1152	1058	1352	185	197	216	15832	558	70	1049	193	141	337
	Pt171	261	199	128	178	283	185	4283	385	291	115	756	265	1998	337	316	170	230	576	292	28	270	85	145	160
	Pt172	3072	366	263	509	237	28891	5114	2580	552	448	1938	1005	903	2822	2125	2875	491	14795	840	6463	974	540	355	696
	Pt173	1872	3197	121	105	1319	2494	1401	765	253	272	230	155	1518	753	513	405	466	225	3904	195	160	430	128	703
	Pt174	1175	263	53	62	208	206	556	1015	70	46	127	130	169	399	1530	427	154	136	265	712	136	364	133	467
	Pt175	1453	152	314	160	323	27160	1826	2471	101	231	301	159	462	189	2805	1819	287	1176	623	999	481	598	510	1287
	Pt176	17	99	212	40	7459	322	5802	37	31	271	178	93	401	215	210	74	100	8159	483	118	162	139	37	683
	Pt177	391	154	164	67	15421	179	9789	128	134	97	153	68	120	70	316	169	107	11630	233	56	327	74	36	197
	Pt178	217	93	213	46	10973	300	10902	76	67	94	105	65	83	50	346	147	80	9602	233	86	234	145	41	475
	Pt179	1846	895	791	511	23075	798	24683	8076	875	601	561	13245	7385	659	12277	12034	671	8906	945	490	2458	1431	244	3423
	Pt29	99	80	56	147		71	2358	58	14	92	113	190	150	135	546	87	119	140	83	113	132	1	84	1
	Pt42		390	578	210	26727	667			168	317	3491	3138	2741	2895	4186	3100	270	834			1284	311	349	643
	Pt25	235	104	1850	125	513	65	1777	1017	61	160	438	1805	12253	14024	323	1032	828	196	784	206	578	50	207	579
	Pt3	204	230	143	320		105	1165	68	75	148	277	112	300	396	334	176	383	481	2935	346	325	68	4015	3333
	Pt180	1325	1259	1006	1407	7718	27819	936	17403	1234	859	6577	8991	8041	557	19660	9280	1246	789	15209	1927	2524	1391	980	2016
	Pt181	1	557	725	177	895	27507	317	341	864	307	295	985	59	1363	3535	3716	96	116	361	165	278	532	102	1035
	Pt182	1	157	187	75	230	536	113	70	420	173	186	316	1233	887	1173	1006	45	105	145	64	95	183	39	347
	Pt183	1464	941	4095	2366	1231	15846	124	301	547	34	64	187	59	1363	1163	7127	91	68	617	310	50	182	780	249
Pt184	1	63	63	30	88	25746	74	20	30	74	74	154	46	120	804	200	20	29	88	36	46	88	20	158	
Pt185	1	200	227	106	412	28283	214	63	106	237	196	442	106	548	2041	808	40	49	236	72	106	218	42	691	
Pt186	1076	676	877	219	15367	321	27523	10977	270	364	900	3271	1233	887	23534	1157	399	19782	1226	297	499	318	154	2253	
Pt187	1	244	42	356	352	392	229	30	312	906	933	204	341	202	522	131	36	99	196	151	202	156	57	23403	

Continúa...

Tabla 5. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en humanos con enfermedades autoinmunes (N=118). El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15, 000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente	ENFERMEDADES AUTOINMUNES																									
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																									
		Citocinas Proinflamatorias													Citocinas Antiinflamatorias							Quimiocinas					
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFa	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC				
Síndrome de Fiebre Periódica	Pt59	1313	104	275	110		37	1207	3601	95	206	1132	573	3267	398	163	4407	350	278	9635	301	377	133	192	187		
	Pt46		92	271	135	17941	306			91	102	115	618	1403	339	27086	3824	80	285		1995	53	152	61			
	Pt47		49	608	91	23187	228			59	51	118	135	230	190	1368	258	95	325		271	82	70	170			
	Pt48		556	327	99	22586	21465			51	48	153	192	416	927	1474	310	103	249		485	55	51	107			
	Pt49		227	106	31	19823	417			69	185	758	52	445	291	283	643	50	420		347	1937	70	197			
	Pt50		208	312	208	24412	269			88	228	329	246	1989	959	13575	800	141	213		1165	193	92	718			
	Pt51		137	524	115	25275	374			63	94	201	215	903	1111	27018	820	105	561		1598	217	98	227			
	Pt52		91	277	66	23263	243			88	61	130	134	235	115	1051	712	68	164		280	256	37	350			
	Pt53		406	399	169	19463	649			193	751	298	913	819	1195	656	4281	297	834		777	534	222	1673			
	Pt54		73	312	81	21972	545			36	144	153	154	449	446	743	142	85	435		160	176	54	450			
	Pt55		174	313	231	24097	373			71	201	313	267	624	287	430	1638	271	435		572	171	99	316			
	Pt56		180	444	147	25042	467			140	150	193	427	432	358	873	736	228			254	395	106	552			
Pt57		137	204	106	24962	723			1198	28125	170	2403	776	1007	517	6358	853			571	252	296	252				
Pt41		467	619	264	29790	627			569	341	1542	528	1916	940	1328	5163	239	1390		1030	239	406	306				
Fiebre periódica de origen desconocido	Pt40		116	313	111	28573	557			4772	1121	1382	159	801	342	420	449	163	791		682	181	55	357			
	Pt43	228	1094	454	299	21733	495	895	1033	556	258	721	303	522	393	1280	264	296	536	326	4855	581	172	102	284		
	Pt44		117	610	184	21140	198			44	50	803	870	4656	805	18167	8281	121	194		504	259	75	280			
	Pt45		163	281	152	24871	317			106	47	846	171	736	1715	1264	2036	113	617		346	239	130	258			
	Pt58	585	335	595	695	7075	728	2468	17378	65	405	375	28188	29532	29654	579	11223	1264	486	783	768	795	269	359	583		
Pt60	394	187	10569	780		93	10214	5212	56	210	484	1092	846	543	6628	5582	417	305	319	328	336	634	157	741			
Total de muestras con altos niveles de autoanticuerpos anti-citocinas		0	1	1	0	23	8	3	5	0	1	1	1	2	2	7	1	9	5	3	1	0	0	1	15		

**Tabla 5. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en humanos con enfermedades autoinmunes (N=118).** El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15, 000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente	ENFERMEDADES INFECCIOSAS																							
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																							
		Citocinas Proinflamatorias											Citocinas Antiinflamatorias						Quimioquinas						
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFA	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC		
Infecciones fúngicas	Pt6	29000	738	2198	168		177	8664	2115	99	260	455	400	513	4598	3314	2616	466	23052	691	11543	2415	138	271	181
	Pt15	6923	453	5681	438	4126	252	6057	16273	115	820	1239	1458	2298	1556	1274	23773	982	588	2300	4826	904	136	1520	225
	Pt16	277	211	110	236		146	2686	580	66	182	347	293	327	386	505	449	612	296	790	317	549	95	413	179
	Pt17	499	144	528	190		49	3727	6091	31	339	285	749	288	444	742	9041	733	346	1533	482	434	106	1401	360
	Pt18	307	296	365	469		108	1302	771	296	281	311	158	5690	656	865	1992	535	1776	329	5722	876	79	339	122
	Pt61		45	36	149	156	26			97	43	179	123						93			109	18606		277
	Pt62		788	157	97	11797	136			92	79	280	82	548	1054	737	444	155	211			85	129	71	129
	Pt63	726	372	613	3952	1143	338		2566	653	601	2872	808	3142	5640	1103	1241	593	636		505	1081	178	337	163
	Pt64	504	198	534	149	5889	99	4501	226	148	245	470	226	353	1767	957	447	330	554	425	858	370	527	241	736
	Pt65	223	1065	795	113	6433	76	12536	817	32	131	570	154	550	732	2163	421	154	181	245	7000	248	83	115	152
Pt66	302	193	2306	189	6367	115	3147	7178	77	222	386	1036	403	416	1349	5841	403	271	567	552	309	111	211	162	
Pt67	400	193	878	459	519	309	986	1820	324	458	392	411	371	336	1180	1429	516	163	289	473	166	102	308	231	
Pt69	208	57	335	90		47	28234	30650	14	153	127	163	2551	2164	1351	2172	301	246	716	289	734	33	83	67	
Infección por Micobacterias no tuberculosas	Pt8	353	337	231	283		164	1924	739	168	346	865	307	567	1150	662	1941	407	527	715	534	2438	342	81	
	Pt10	255	220	2131	334		110	2863	716	28	194	7350	170	320	705	1436	2072	284	390	340	2350	4864	133	202	140
	Pt12	561	759	400	376		230	6789	2364	735	605	1000	602	4595	17828	1358	3184	1198	909	2276	1063	3033	171	730	600
	Pt13	318	214	257	414		48	2979	178	35	274	368	163	509	1091	550	897	325	370	585	296	472	49	195	53
	Pt14	404	290	375	437		126	5996	24552	62	552	501	3687	1341	655	862	29000	961	400	721	564	389	127	601	1543
	Pt35	235	14090	2108	75		118	9755	16851	101	192	2216	3311	421	500	6761	16536	300	279	1659	254	521		1418	
	Pt37		604	1854	358	28861	506			13601	235	1858	401	736	496	1306		509	520			984			
Infección por Micobacterias Tuberculosas	Pt5	513	337	797	510	2145	161	7600	1790	260	424	1126	396	4021	10766	5323	2257	1142	550	1366	631	737	104	848	330
	Pt7	1077	236	8064	199		99	5865	4386	130	262	290	778	511	759	7867	7185	467	409	498	499	525	421	393	178
	Pt9	656	375	2245	338		89	14323	11299	59	383	652	557	375	1232	3519	4737	629	595	749	761	506	168	724	258
	Pt11	632	287	2462	390		228	7244	4808	82	426	3094	1740	1842	2126	9152	4605	674	499	5213	838	1017	223	368	362
	Pt31	201	81	3762	843	548	61	3767	3952	68	161	1271	677	2926	2695	556	6419	203	143	28612	201	3437	173	170	142
	Pt32	539	304	1106	425	3977	85	3520	6899	79	283	1615	977	847	1158	26949	3786	468	251	25497	2284	1027	80	177	78
	Pt34	447	305	241	109		258	1270	9002	40	243	739	19219	7735	5930	1919	8856	278	307	22182	392	371	160	201	169
	Pt36	1177	758	577	514		1330	21936	8547	138	727	2420	1086	3381	3864	6557	4461	1200	1092	824	1031	891	300	539	368
Pt38	582	467	13771	153		122	4604	27156	77	373	825	5553	834	1295	5200	26881	788	412	1822	1048	336	1170	247	673	
Toxoplasmosis	Pt68	298	205	27994	25039	380	6472	1926	9036	260	27744	495	217	583	1194	26317	1617	724	276	720	419	7986	48	217	140
Total de muestras con altos niveles de autoanticuerpos anti-citocinas		1	0	1	1	1	0	2	5	0	1	0	1	0	1	2	4	0	1	3	0	0	1	0	0

Tabla 6. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en humanos con enfermedades infecciosas (N=30). El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15, 000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente	ENFERMEDADES AUTOINMUNES E INFECCIOSAS																							
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																							
		Citocinas Proinflamatorias											Citocinas Antiinflamatorias							Quimiocinas					
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFa	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC		
Enfermedad Celiaca y candida	Pt1	813	335	1558	594		154	4208	7184	66	557	317	1989	1503	1919	2453	9156	1203	666	2211	1008	29000		698	
	Pt27		1115	805	320	28612	1248			4703	425	3220	2647	3257	3814	5227	3365	469	1596			1390	248	1331	564
FQ e infecciones fúngicas	Pt39	2314	282	1370	547		126	2659	3534	111	251	485	25242	30394	30464	360	3753	650	354	3527	546	1806	158	365	313
	Pt33	1234	416	664	833	5595	212	4343	24260	129	635	666	9585	1732	13875	418	22748	1586	588	2115	486	1554	575	2423	1050
IBD e Infecciones fúngicas	Pt2	850	971	1475	475		285	3404	12371	481	826	1436	1497	771	821	8045	8413	1138	822	969	1830	1040	1722	721	552
	Pt26	11694	249	4524	190		29	1790	99	69	49	104	47	15141	226	2594	464	88	387	255	152	227	1	97	1
	Pt28	385	3231	6580	201		666	2072	26500	25	277	345	6926	659	733	26262	25232	552	233	24479	8733	309	230	414	175
Total de muestras con altos niveles de autoanticuerpos anti-citocinas		0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	1	2	1	1	2	0	0	1	0	1	0	0	0

**Tabla 7. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en humanos con enfermedades autoinmunes e infecciosas (N=7).** El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15,000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente	OTRAS ENFERMEDADES																							
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																							
		Citocinas Proinflamatorias												Citocinas Antiinflamatorias								Quimiocinas			
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFa	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC		
Mutaciones	Pt4	296	263	4534	418		112	3771	905	45	283	722	1530	909	894	5859	652	348	334	376	759	1042	300	212	163
	Pt22	92	66	192	112	913	24403	438	6990	93	75	583	1880	486	794	2101	12723	124	66	686	116	129	94	82	2630
	Pt24	235	262	4553	1336	1026	1229	3717	611	48	237	708	5692	19444	19647	603	685	330	568	889	403	670		226	
	Pt30	504	237	276	175		454	5142	576	157	336	1169	11456	1599	2316	195	645	395	404	555	376	458	854	497	367
Total de muestras con altos niveles de auto-anticuerpos anti-citocinas		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 8. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en humanos con otras enfermedades (n=4).** El color negro representa valores de IF <10,000, **el color azul** representa valores de IF entre **10,000 y 15, 000**, mientras que **el color rojo** representa valores de IF **≥15,000**.

Subgrupo	Paciente	INDIVIDUOS CLÍNICAMENTE SANOS																							
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																							
		Citocinas Proinflamatorias											Citocinas Antiinflamatorias							Quimiocinas					
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFa	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC		
Controles Negativos	Hc1	392	7999	3189	114	1155	58	1954	893	39	262	211	488	570	1034	5635	734	488	175	262	1601	628	267	305	151
	Hc2	635	629	903	158	2716	149	2128	1	75	552	214	657	607	649	812	3235	582	524	610	942	928	159	740	198
	Hc3	297	559	1377	92	3474	59	2277	2	62	189	235	8218	4649	4755	2280	1694	267	143	246	538	329	287	174	424
	Hc4	215	680	1652	98	4157	54	2658	212	49	118	268	7999	3842	6257	2661	1585	193	109	250	367	327	548	133	400
	Hc5	183	78	318	97	1176	34	1858	555	33	164	214	263	785	890	283	530	290	171	345	7999	236	98	189	116
	Hc6	7999	174	2480	106	2467	53	3967	3725	322	93	473	174	175	254	1981	2624	179	134	189	476	186	694	86	106
	Hc7	822	650	475	137	1177	91	6845	1	64	613	647	1185	818	1254	1794	891	725	526	699	1010	682	151	1408	248
	Hc8	355	643	661	102	1631	109	7838	1	361	458	638	344	470	1091	5339	3383	331	370	643	1142	917	112	355	189
	Hc9	549	94	91	69	559	75	1574	1	30	231	146	1129	4654	773	682	2452	320	164	200	968	186	201	251	184
	Hc10	282	142	576	108	854	86	7999	348	67	455	1236	334	5567	7151	710	459	669	236	386	427	807	57	265	103
	Hc11	316	125	238	93	407	64	4342	3316	22	221	2018	438	7887	7999	2546	2223	435	241	413	954	511	67	291	176
	Hc12	247	140	327	114	1011	98	1638	6024	78	182	231	568	443	6149	833	5001	356	197	7999	1839	1266	335	173	339
	Hc13	706	102	277	123	1752	68	3869	444	45	238	340	498	1436	697	1105	560	430	295	254	295	302	104	268	198
	Hc14	1121	791	5361	305	1852	145	2119	882	192	280	532	1207	1850	1529	6143	222	381	223	878	1436	379	291	257	409
	Hc15	3341	813	1184	407	1018	143	2671	1348	192	212	565	1313	6785	8316	4267	1663	393	236	928	1406	658	491	212	256
	Hc16	977	811	901	177	826	151	4030	1706	190	164	557	1146	1499	1224	2483	1351	315	173	1135	1299	934	122	157	160
	Hc17	1819	818	3730	417	1247	131	2772	847	229	274	669	1286	2294	7763	4280	418	678	284	935	1952	618	149	451	208
	Hc18	1005	753	842	164	860	141	5467	212	209	184	537	1090	1600	1345	4319	503	259	187	944	1416	588	187	157	369
	Hc19	1369	834	1581	659	5465	177	3862	7964	199	397	689	4353	4182	3415	2547	5784	620	241	851	2372	566	323	453	365
	Hc20	1893	778	901	185	1215	155	3004	2531	200	170	541	1124	1598	1544	2084	1220	156	177	754	1312	346	269	675	381
	Hc21	908	748	7999	197	340	132	2556	1478	203	141	512	1048	1456	1385	7999	1089	103	201	886	1446	425	213	329	229
	Hc22	995	738	1505	72	532	146	2825	621	211	170	599	1106	1599	1341	2906	83	314	177	1190	2186	269	89	726	143
	Hc23	1124	753	736	52	565	132	2904	452	194	232	633	1185	4280	2065	2341	217	349	206	1337	1698	1055	92	164	169
	Hc24	1102	783	1829	75	557	140	4648	1421	273	273	816	1714	1869	3292	2718	423	315	247	1799	1393	263	109	187	179
	Hc25	1076	771	805	69	669	119	2996	7999	297	189	593	1927	2467	3630	3159	8338	200	212	1070	1387	259	117	671	229
	Hc26	2651	1437	1228	94	537	204	4616	7417	198	655	705	1654	1549	1403	4097	7841	611	613	1172	2123	1293	156	376	269
	Hc27	1479	752	1088	159	689	123	2230	1172	202	246	479	1273	2277	1381	4452	296	360	229	7999	1436	886	119	164	597
	Hc28	1123	763	793	144	541	149	3446	441	184	282	559	1225	1480	1210	2036	37	480	228	1680	1732	1462	139	229	313
	Hc29	926	747	743	166	512	114	1796	290	190	155	495	1039	1492	1256	7999	26	105	210	662	1303	409	287	210	231

Continúa...

**Tabla 9. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en individuos clínicamente sanos (n=50).** El color negro representa valores de IF <10,000, el color azul representa valores de IF entre 10,000 y 15, 000, mientras que el color rojo representa valores de IF ≥15,000.

Subgrupo	Paciente	INDIVIDUOS CLÍNICAMENTE SANOS																							
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados																							
		Citocinas Proinflamatorias												Citocinas Antiinflamatorias							Quimiocinas				
IL-33	IL-6	IL-12	IL-23	BAFF	TNFa	Lta/Ltb	TRANCE	IL-17F	IFNa	IFNg	IFN-L	IL-28A	IL-28B	IL-6 Ra	IL-27	TGFb1	IL-10	vIL-10 (CMV)	vIL-10 (EBV)	IL-22	MDC	IL-8	I-TAC		
Controles Negativos	Hc30	1000	750	676	138	599	127	1867	6320	182	139	480	1647	1418	1111	1978	5210	112	190	541	1389	259	173	128	215
	Hc31	641	170	105	239	1	195	1733	1868	196	138	467	707	510	124	1700	368	246	279	196	2	290	42	188	202
	Hc32	963	746	685	106	557	132	3425	1670	700	137	611	1076	1420	1139	1969	630	106	183	730	1302	364	198	289	184
	Hc33	1083	780	790	101	669	161	2330	297	189	245	547	1195	3488	1850	2267	59	321	251	1401	1715	1516	72	174	114
	Hc34	1919	860	896	126	537	136	2421	552	193	548	528	1382	1620	1458	2556	1	405	285	734	1644	299	179	224	532
	Hc35	1	309	243	386	1	295	4051	3571	230	342	692	2256	3100	232	491	378	320	531	251	1	463	260	281	308
	Hc36	63	75	339	102	273	90	1087	2263	1232	43	285	125	215	237	537	1342	95	124	101	163	61	76	73	407
	Hc37	149	103	148	102	205	302	2770	1342	72	71	464	285	488	209	925	7268	120	167	159	194	339	110	116	157
	Hc38	1121	849	860	152	600	152	3171	7021	323	264	641	1509	2634	3905	2886	4611	258	262	731	1515	392	173	171	414
	Hc39	1	226	207	158	698	180	332	125	557	233	223	194	790	101	1546	1510	86	137	305	125	129	250	80	491
	Hc40	1	183	43	106	230	200	103	44	669	249	293	230	896	126	347	559	60	229	148	75	94	175	58	317
	Hc41	1	129	77	291	225	318	189	56	537	614	659	246	243	386	605	1991	42	158	220	59	74	175	38	1466
	Hc42	1	100	66	126	332	147	434	56	512	231	177	164	339	102	2921	627	69	66	343	101	96	394	67	1129
	Hc43	1505	871	900	960	1386	150	4876	4561	207	555	859	2117	1712	1726	2576	7999	971	258	1653	2417	1583	276	809	354
	Hc44	1226	880	2768	521	1496	149	7126	7877	199	363	563	1362	1734	2140	3185	3284	643	946	1258	2094	865	160	386	438
	Hc45	1491	775	2619	476	1617	144	3048	6821	218	301	664	1576	1543	1403	3088	6614	481	258	760	1473	299	206	453	685
	Hc46	1084	750	812	401	1177	148	6585	7172	197	252	766	1741	1587	1356	6364	4543	328	193	919	1414	326	564	265	210
	Hc47	1164	893	1411	553	1728	146	3627	782	213	279	1500	1224	1651	5909	2464	166	451	350	856	1430	755	92	270	178
	Hc48	1099	781	953	414	2321	171	3091	6118	185	293	614	1691	2020	2202	2006	5093	338	327	999	2749	715	168	211	200
	Hc49	1085	836	969	241	1706	164	3615	2150	208	262	737	1149	2636	1852	2595	2007	537	298	1000	1553	439	627	322	257
Hc50	991	742	907	105	912	119	3120	3874	211	153	561	1071	1615	1769	2851	1927	238	171	963	1293	289	157	177	197	
Total de muestras con altos niveles de autoanticuerpos anti-citocinas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabla 9. Niveles de autoanticuerpos anticitocinas en individuos clínicamente sanos (n=50).** El color negro representa valores de IF <10,000, **el color azul** representa valores de IF entre **10,000 y 15,000**, mientras que **el color rojo** representa valores de IF **≥15,000**.

## 10.2. Apéndice 2 (Preparación de Soluciones)

### 1) Solución Amortiguadora de fosfatos (PBS), pH= 7.2

Cloruro de sodio (NaCl)	8.00 g
Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.21 g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.34 g
Agua destilada	1,000 ml

### 2) Solución Amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X, pH= 7.2 - 7.4

Cloruro de sodio (NaCl)	80.00 g
Cloruro de potasio (KCl)	1.60 g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.91 g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10.0 g
Agua destilada	1,000 ml

### 3) Solución Bloqueadora BSA-PVP-PVA

BSA (1%)	1.0 gr
PVA (0.5 %)	0.5 gr
PVP (0.8%)	0.8 gr
Buffer de fosfatos (PBS)	100 ml

### 4) Solución pre bloqueadora

Buffer de fosfatos (PBS)	100 ml
BSA (0.5%)	0.5 gr

### 5) Solución de Lavado (PBS-T)

Buffer de fosfatos (PBS)	500 ml
Tween 20 (0.05%)	0.25 ml