



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AUTOANTICUERPOS ANTI-CITOCINAS EN LA INHIBICIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE ESTOS MEDIADORES QUÍMICOS, Y SU RELACIÓN CON INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS EN FELINOS Y HUMANOS.”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. EN C. PAULINA CORTES ACEVEDO

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. GABRIELA BÁRCENAS MORALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN IZCALLI, CAMPUS 1.

COMITÉ TUTOR:

DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN IZCALLI, CAMPUS 1.

DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, CU, UNAM

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Mayo, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Cuautitlán** por haberme abierto sus puertas y permitido ser parte de su comunidad.

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 ofrecerme continuamente su tiempo, conocimientos, observaciones y consejos que me permitieron culminar este trabajo. Gracias, por motivarme a seguir aprendiendo y a dedicarme la investigación, pero sobre todo por ser una segunda madre para mí y una gran amiga.

Al **comité tutor**: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira y Dra. Clara Inés Espitia Pinzón 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 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.

Agradezco el apoyo brindado por **CONACYT** otorgándome la beca nacional número 829997, durante el periodo 2019-2023

Investigación realizada gracias al proyecto **PIAPI**, FES-Cuautitlán, UNAM. “Infección e inmunidad” con Clave **PIAPI2009**

Al **Laboratorio de Virología y Biología Molecular** de la FES Cuautitlán por todas las muestras donadas para la realización de este proyecto.

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 acompañarme en cada paso que doy en la búsqueda de ser mejor persona. Gracias por darme todo lo que soy como persona, mis valores y principios, y por motivarme continuamente a no rendirme.

A mis hermanas, **Teffy y Nanis**, por ser mis compañeras de risas, por apoyarme siempre y confiar en que superaría este reto. Gracias por escucharme en todas esas ocasiones en las que hablaba de mi proyecto porque, aún con caras confundidas, siempre toleraron mis raras teorías.

A mi hermano **Pablito**, mi fiel compañero en este camino, que continuamente me apoya en mis locas ideas y me motiva a mejorar no solo en lo académico también en lo personal, espero te sirva de ejemplo de que todo se puede lograr.

A mi abuelita **Ricarda** por haberme ofrecido su profundo cariño, esperando siempre lo mejor de mí, sé que, aunque no estás presente de cuerpo, siempre estás acompañándome. Espero que al terminar este proyecto te haga sentir orgullosa. Siempre estás en mi corazón y te recuerdo a todo momento

A mis tías: **Bety** por acompañarme en este camino y estar continuamente motivándome a concluir con este proyecto, **Rosita** por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuesta a ayudarnos en cualquier momento, y **Martha** por haber estado conmigo durante esta etapa de mi vida.

A mi primo **Juan**, mi **Tío Rosalio** y mi **Tía Guille**, gracias por ser una parte muy importante en mi vida, su enorme apoyo y cariño en todo este camino me ha permitido culminar esta meta.

A mis tíos **José Luis y Guillermo** quienes me aconsejaban cuando lo necesitaba y que siempre que un problema se presentaba me ofrecían su apoyo incondicional. Son un gran ejemplo a seguir y sepan que este logro también es de ustedes.

A mis amigos **Sandy, Armando, Pili y Miros** que gracias a su apoyo moral me permitieron continuar con este proyecto, porque cada vez que parecía estar tocando fondo estaban ahí para motivarme. Gracias por haberme permitido apoyarlos en sus problemas y haber escuchado los pocos consejos que pude ofrecer. Por todo eso y mucho más, muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ESQUEMAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Citocinas	4
1.3. Transductor de señal y activador de transcripción	8
1.4. Autoanticuerpos contra citocinas y susceptibilidad a infecciones en humanos	10
1.5. Incidencia de autoanticuerpos anti-citocinas en caninos y equinos	13
1.6. Ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bioplex	14
1.7. Cromatografía por afinidad.....	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
5.1. Muestras séricas	26
5.2. Elaboración de los sistemas de citocinas acopladas a microesferas y evaluación de la especificidad e integridad antigénica.....	26
5.2.1. Amino acoplamiento de citocinas a microesferas carboxiladas	26
5.3. Evaluación de los sistemas de citocinas acopladas a las microesferas empleando el sistema mono-Plex (Luminex).....	33

5.4. Determinación de las interferencias entres los sistemas de acoplamiento	34
5.5. Detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas felinas y humanas mediante el ensayo de arreglo de partículas en suspensión múltiple	35
5.6. Técnica de cromatografía de afinidad por columna.....	36
5.6.1. Preparación del material	37
5.6.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína	37
5.6.3. Procedimiento general para la purificación por afinidad.....	40
5.6.4. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad.....	42
5.7. Determinación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-citocinas sobre la actividad biológica de éstas en ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	43
5.7.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica y líneas celulares humanas	43
5.7.2. Ensayo de inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex	46
5.7.3. Análisis de la función neutralizante de autoanticuerpos en la actividad biológica de IFN γ	49
5.7.4. Análisis de la función neutralizante de autoanticuerpos en la vía de señalización de citocinas (IL-12 e IL-6) empleando las líneas celulares HEK-Blue IL-12 y HEK-Blue IL-6.....	51
5.8. Identificación de epítopes mediante microarreglos de péptidos	55
5.9. Síntesis y evaluación de epítopes reconocidos.....	56
5.10. Análisis estadístico	56
6. RESULTADOS.....	57
6.1. Evaluación del acoplamiento proteico, la integridad antigénica y la especificidad de algunos sistemas citocina-microesfera.....	57
6.2. Determinación de las interferencias entre los diferentes sistemas de citocinas-microesferas elaborados	57

6.3. Colección de muestras séricas.....	60
6.4. Análisis serológico de las muestras humanas.....	60
6.5. Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y su relación con los grupos de enfermedad en humanos.....	71
6.6. Análisis de la relación de la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ con el desarrollo del cuadro clínico de COVID-19.	77
6.7. Purificación de autoanticuerpos contra citocinas en humanos mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna.....	77
6.8. Identificación de epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6.....	81
6.9. Evaluación de epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6.....	88
6.10. Identificación de epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ	92
6.11. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina sobre la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6.....	98
6.12. Análisis de la función neutralizante de autoanticuerpos en la actividad biológica de IFN γ	101
6.12.1. Niveles de citocinas en sangre completa activada.....	101
6.12.2. Ensayo de inhibición de la producción de IL-12 inducida por IFN γ en PBMCs.....	103
6.12.3. Ensayo de neutralización IFN γ recombinante.....	103
6.13. Análisis serológico de las muestras felinas.....	106
6.14. Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y su relación con enfermedades en felinos.....	112
6.15. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina sobre la activación de la señalización por STAT-4 mediada por IL-12 o por STAT-3 mediada por IL-6.....	117
6.15.1 Determinación de la concentración de rhIL-12 para estimular de la línea celular HEK-Blue IL-12.....	117
6.15.2 Determinación de la concentración de rhIL-6 para estimular la línea celular HEK-Blue IL-6.....	118

6.15.3 Ensayo de la función neutralizante de autoanticuerpos en la vía de señalización de IL-12 o IL-6	121
7. DISCUSION	125
7.1 Evaluación de los sistemas citocina-microesfera	125
7.2 Autoanticuerpos anti-citocinas en humanos	126
7.3 Relación de la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ con el desarrollo del cuadro clínico de COVID-19.....	130
7.4. Purificación de autoanticuerpos anti-IFN γ	130
7.5. Epítomos reconocidos por autoanticuerpos anti-citocinas y su efecto en la actividad biológica de estos mediadores	131
7.6 Autoanticuerpos anti-citocinas en felinos	133
8. CONCLUSIONES	135
9. REFERENCIAS	137
10. APÉNDICE	146

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Citocinas y sus receptores.	7
Esquema 2. Modelo general de transducción de señales mediada por la mayor parte de los receptores de citocina clases I y II.	9
Esquema 3. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex).	18
Esquema 4. Acoplamiento proteico entre las microesferas y las citocinas.	19
Esquema 5. Cromatografía por afinidad.	21

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Listado e información de algunas de las citocinas y microesferas empleadas.	30
Tabla 2. Número de muestras séricas humanas analizadas, ordenadas por padecimiento en el grupo de pacientes, así como el grupo de individuos clínicamente sanos (controles negativos).	63
Tabla 3. Número de muestras séricas felinas analizadas, ordenadas por padecimiento en el grupo de pacientes, así como el grupo de individuos clínicamente sanos (controles negativos).	64

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Evaluación de los sistemas de citocinas-microesferas acoplados.	60
Figura 2. Determinación de las interferencias entre los diferentes sistemas citocinas acopladas a las microesferas.	61
Figura 3. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas humanas mediante el sistema 37-plex citocina-microesfera.	65
Figura 4. Mapa de calor de los valores de MFI de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras séricas humanas.	67
Figura 5. Patrón de autoanticuerpos contra interferones en pacientes e individuos clínicamente sanos.	69
Figura 6. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas relacionadas a células TH17 en pacientes e individuos clínicamente sanos.	70
Figura 7. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas proinflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos.	71
Figura 8. Patrón de autoanticuerpos contra otras citocinas en pacientes e individuos clínicamente sanos.	72
Figura 9. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas.	75
Figura 10. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas.	76
Figura 11. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas.	77
Figura 12. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas.	78
Figura 13. Niveles de autoanticuerpos anti-IFN γ .	79
Figura 14. Purificación de autoanticuerpos anti-IFN γ de cuatro muestras séricas.	82
Figura 15. Mapeo de epítomos sintetizados a partir de microarreglos peptídicos	84
Figura 16. Localización de los epítomos reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6.	85

Figura 17. Homología entre las secuencias de IL-6 de diferentes especies con los epítomos identificados.	87
Figura 18. Modelaje molecular entre la estructura de la IL-6, el IL-6Ra y de gp130.	88
Figura 19. Homología entre la secuencia de Epitope2 reconocido por autoanticuerpos anti-IL-6 y las secuencias de aa correspondientes a <i>Staphylococcus sp.</i>	89
Figura 20. Evaluación del reconocimiento de los epítomos determinados.	91
Figura 21. Evaluación del reconocimiento de los epítomos en pacientes con Enfermedades Autoinmunes.	92
Figura 22. Evaluación del reconocimiento de los epítomos en pacientes con Enfermedades Infecciosas.	93
Figura 23. Localización de los epítomos reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ .	95
Figura 24. Homología entre las secuencias de IFN γ de diferentes especies con los epítomos identificados.	96
Figura 25. Modelaje molecular entre la estructura de IFN γ , el IFNgR1 y el IFNgR2.	98
Figura 26. Homología entre la secuencia de los epítomos reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ y las secuencias de aa correspondientes a microorganismos.	99
Figura 27. Inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6.	101
Figura 28. Exacerbación de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6.	102
Figura 29. Niveles de citocinas en sangre completa activada.	104
Figura 30. Inhibición de la producción de IL-12 inducida por IFN γ .	106
Figura 31. Neutralización IFN γ recombinante.	107

Figura 32. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas felinas mediante el sistema 34-plex citocina-microesfera.	109
Figura 33. Mapa de calor de los valores de MFI de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas.	111
Figura 34. Patrón de autoanticuerpos contra interferones en pacientes e individuos clínicamente sanos.	112
Figura 35. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas en pacientes e individuos clínicamente sanos.	113
Figura 36. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas positivas a FELV (PCR positivo).	115
Figura 37. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas de pacientes FIVV/FELV (PCR negativo).	116
Figura 38. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas de pacientes FIVV (PCR positivo).	117
Figura 39. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas de pacientes no diagnosticados.	118
Figura 40. Determinación de la concentración de rhIL-12 para estimular de la línea celular HEK-Blue IL-12.	121
Figura 41. Determinación de la concentración de rhIL-6 para estimular de la línea celular HEK-Blue IL-6.	122
Figura 42. Porcentaje de inhibición de la señalización por STAT-4 de IL-12.	125
Figura 43. Gráfica de dispersión de los valores de MFI de autoanticuerpos anti-IL-12 y los valores de porcentaje de inhibición del efecto de la IL-12 sobre la señalización por STAT4 en las HEK-Blue IL-12.	126

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AID	Enfermedades Autoinmunes
AID/ID	Enfermedades Autoinmunes e Infecciosas
AIRE	Regulador autoinmune
APECED	Poliendocrinopatía autoinmune tipo 1
APS-1	Síndrome poli-endócrino autoinmune-1
Asx	Asintomático
BSA	Albumina sérica bovina
C	Grados centígrados
CMC	Candidiasis mucocutánea crónica
CPP	Cuadrantes primarios periféricos
D.O.	Densidad óptica
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FELV	Virus de Leucemia Felina
FIV	Virus de Inmunodeficiencia Felina
g	Gravedades
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos.
GPCR's	Proteína heterodimérica G
HC	Controles Sanos
ID	Enfermedades Infecciosas
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
JAK	Cinasa janus
kDa	Kilodalton
LES	Lupus eritematoso sistémico
M	Molar
MAb's	Anticuerpos monoclonales
MFI	Promedio de intensidad de fluorescencia

μg	Microgramo
min	Minuto
ml	Mililitro
μl	Microlitro
NaN_3	Azida de sodio
NH_2	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
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Ficoeritrina
PT	Paciente
PVA	Poly(vinyl alcohol)
PVP	Poly(vinylpyrrolidinone)
rh	Humana recombinante
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviaciones estándar
SEAP	Fosfatasa alcalina embrionaria secretada
Seg	Segundo
S-NHS	N-hydroxysulfosuccinimida
STAT	Transductor de señales y activador transcripcional
Strep	Estreptavidina
TA	Temperatura ambiente
$\text{TNF}\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
vol	Volumen

RESUMEN

La presencia de autoanticuerpos contra citocinas ha sido cada vez más reconocida como una causa de inmunodeficiencias secundarias en humanos, ya que al neutralizar la función de la citocina blanco pueden estar implicados en el desarrollo de diversas enfermedades. Dentro del área veterinaria existen pocos reportes de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas relacionadas con enfermedades infecciosas o autoinmunes, sin embargo, se podría especular que la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas ejerce un efecto sobre la función biológica de sus moléculas dianas en la especie felina.

Objetivo: Detectar la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas de felinos y humanos con diversas enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas, para analizar su capacidad neutralizante *in vitro* sobre la actividad biológica de estos componentes del sistema inmunitario.

Metodología: Se analizaron un total de 561 muestras séricas, de las cuales 420 correspondían a humanos y 141 a felinos, con diversos padecimientos e individuos clínicamente sanos. Para la detección de los autoanticuerpos anti-citocinas, se acoplaron covalentemente citocinas recombinantes humanas a microesferas. Mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna se purificaron autoanticuerpos contra IFN γ . Así mismo, utilizando ensayos *in vitro* de cultivos celulares se determinó la capacidad neutralizante de los autoanticuerpos contra IL-6, IFN γ e IL-12 sobre sus cascadas de señalización. Finalmente, a partir de microarreglos de péptidos se identificaron y analizaron los posibles epítomos reconocidos por los autoanticuerpos anti-IL-6 y anti-IFN γ .

Resultados: Se detectó la presencia de los autoanticuerpos en el 41% de las muestras séricas pertenecientes a pacientes humanos y en el 39% de los pacientes felinos. Se encontraron distintos patrones de reconocimiento de los autoanticuerpos anti-citocina asociados a las diversas enfermedades; en humanos con problemas autoinmunes se detectaron autoanticuerpos contra IL-10, IL-6 y BAFF, con enfermedades infecciosas encontraron autoanticuerpos contra IL-28B, IFN α , IFN ω , IFN γ o IL-6, mientras que el desarrollo de la proteinosis alveolar pulmonar se relacionó con la presencia de autoanticuerpos contra GM-CSF. Con respecto a la determinación de la capacidad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6, se detectó un efecto de exacerbación de la fosforilación de STAT-3 en pacientes con enfermedades autoinmunes y un efecto de inhibición en aquellos con enfermedades infecciosas, los autoanticuerpos anti-IFN γ presentaron un efecto neutralizante sobre la fosforilación de STAT-1. En felinos, los autoanticuerpos anti-IL-12 presentaron una inhibición de la señalización por STAT-4. Aunado a esto, se identificaron los epítomos principales reconocidos por los autoanticuerpos anti-IL-6 y anti-IFN γ , cuyas secuencias presentaron una alta homología con secuencias proteicas de *Staphylococcus* y *Mycobacterium*, respectivamente.

Conclusiones: En humanos la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en ciertos padecimientos sugiere que, dependiendo del cuadro clínico del paciente, la función de los autoanticuerpos anti-citocinas podría inhibir o exacerbar la actividad de la citocina; lo cual sugiere que la utilización del ensayo de detección de autoanticuerpos anti-citocinas podría ser una herramienta potencial para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o autoinmunes particulares. Finalmente, la alta homología entre las secuencias de los epítomos identificados y las secuencias proteicas de microorganismos sugiere al mimetismo molecular como el posible mecanismo del desarrollo de estos autoanticuerpos.

ABSTRACT

The presence of autoantibodies against cytokines has been increasingly recognized as a cause of secondary immunodeficiencies in humans since they may be involved in the development of various diseases by neutralizing the function of the target cytokine. Within the veterinary area there are few reports of the presence of anti-cytokine autoantibodies related to infectious or autoimmune diseases, and it is possible to speculate that anti-cytokine autoantibodies may be exerting an effect on the biological function of their target molecules in the feline species.

Objective: Detect the presence of autoantibodies against cytokines in serum samples from cats and humans with various infectious or autoimmune diseases, to analyze their *in vitro* neutralizing capacity on the biological activity of these components of the immune system.

Methodology: A total of 561 serum samples were analyzed, of which 420 corresponded to humans and 141 to felines, among patients with various groups of conditions and clinically healthy individuals. For detection of anti-cytokine autoantibodies, recombinant human cytokines were covalently coupled to microspheres. Autoantibodies against IFN γ were purified using the column affinity chromatography technique. Likewise, using *in vitro* assays with cell cultures, the neutralizing capacity of autoantibodies against IL-6, IFN γ and IL-12 on their signaling cascades was determined. Finally, from peptide microarrays, possible epitopes recognized by anti-IL-6 and anti-IFN γ autoantibodies were identified and analyzed.

Results: The presence of autoantibodies was detected in 41% of the serum samples belonging to human patients and in 39% of feline patients. Different recognition patterns of anti-cytokine autoantibodies associated with various diseases were detected, finding in humans with autoimmune problems autoantibodies against IL-10, IL-6 and BAFF, with infectious diseases autoantibodies against IL-28B, IFN α , IFN ω , IFN γ or IL-6 were found and autoantibodies against GM-CSF were related with the development of proteinosis pulmonary alveolar. Regarding the determination of the neutralizing capacity of anti-IL-6 autoantibodies, it reflected an exacerbation effect of STAT-3 phosphorylation in patients with autoimmune diseases and an inhibition effect in those with infectious diseases, anti-IFN γ autoantibodies showed a neutralizing effect on STAT-1 phosphorylation. In cats, anti-IL-12 autoantibodies presented an inhibition effect of STAT-4 signaling. The main epitopes recognized by anti-IL-6 and anti-IFN γ autoantibodies were identified, whose sequences showed high homology with protein sequences from *Staphylococcus* and *Mycobacterium*, respectively.

Conclusions: In humans the presence of autoantibodies against cytokines with certain conditions suggests that, depending on the clinical picture of the patient, the anti-cytokine autoantibodies could inhibit or exacerbate the activity of the cytokine; likewise, it suggests that the anti-cytokine autoantibody detection assay may be used as a tool for the diagnosis of specific infectious or autoimmune diseases. Finally, the high homology between the sequences of the identified epitopes and protein sequences of microorganisms suggests a mechanism of molecular mimicry as a possible cause of the development of these autoantibodies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Las enfermedades infecciosas pueden ser consideradas como eventos normales en la vida de cualquier organismo, en la mayoría de los casos, son eventos transitorios y autolimitados, lo cual no sugiere una anomalía o deficiencia significativa en la defensa inmune del huésped. Sin embargo, si el paciente experimenta infecciones recurrentes, crónicas o inusuales en comparación con los controles de la enfermedad, entonces un deterioro subyacente de la defensa inmune debe ser considerada (Barcenás-Morales, 2019).

En el curso normal de una infección, el agente infeccioso provoca una respuesta inmune innata que presenta signos y síntomas, 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 pacientes con inmunodeficiencias, este término engloba todo un conjunto de situaciones causadas por alteraciones cualitativas y cuantitativas de uno o más componentes específicos o inespecíficos del sistema inmunitario. Atendiendo a su causa las inmunodeficiencias, pueden clasificarse en dos grandes grupos: inmunodeficiencias primarias o congénitas, cuyo origen es un defecto genético intrínseco del sistema inmunitario, 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 inmunodeficiencia primaria es la que se reporta en pacientes con mutaciones en genes que codifican para proteínas de la vía del interferón-gamma (IFN γ) dependiente de interleucina 12 (IL-12), incluyendo mutaciones en los receptores alfa y beta para IFN γ , y en el receptor beta1 para la IL-12; 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, 1998; Picard, 2002; Caragol 2003).

Por otra parte, las inmunodeficiencias secundarias son aquellas que se desarrollan en individuos que inicialmente no presentan algún defecto genético, pero que posteriormente se ven afectados inmunológicamente, estas pueden ser el resultado de diversos factores externos (infecciones, cirugías, traumas, desnutrición, drogas, entre otros), así como de cierto número de enfermedades humanas como el síndrome nefrótico y la enteropatía de la pérdida de proteína (Gupta, 2001).

En años recientes se ha reportado la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas de humanos, como una posible causa de inmunodeficiencias secundarias, ya que dichos autoanticuerpos pueden neutralizar las citocinas e interrumpir la función inmune afectando las actividades celulares y por lo tanto la eliminación de los patógenos, donde finalmente predispone al hospedador a enfermedades infecciosas (Browne, 2014; Chruwkamlow, 2016; Knight, 2016; Barcenás-Morales, 2019).

En general, existe una correlación entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes hacia IFN γ y la susceptibilidad a infecciones micobacterianas que 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 han sido detectados en un paciente con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente y se ha observado también que los anticuerpos neutralizantes hacia citocinas Th17 predisponen a infecciones fúngicas (Madariaga *et al.*, 1998; Doffinger *et al.*, 2004; Höflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005; Dubin & Kolls, 2008; Puel *et al.*, 2008; Baerlecken *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Kisand *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2010).

En pacientes con poliendocrinopatía autoinmune tipo 1 (APECED, del inglés *autoimmune poly-endocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*) causada por mutaciones en el regulador autoinmune (AIRE, del inglés *autoimmune regulator*), también se demostró que las inmunoglobulinas del isotipo G presentes en estos pacientes son las responsables de la actividad neutralizante contra IFN ω , IFN α 2a, IL-17A e IL-22; así mismo, se estableció una relación entre los autoanticuerpos contra IL-

17 y la infección crónica con *Candida* en mucosas, ambas condiciones presentadas por pacientes con APECED (Kärner *et al.*, 2013; Kisand *et al.*, 2011).

Por otra parte, es importante agregar que dentro del área veterinaria solo existe un reporte de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas relacionadas con enfermedades infecciosas en caninos (Autran *et al.*, 2019), en donde se describen valores significativos de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de caninos con varios padecimientos relacionados a la respuesta inmune que incluyen enfermedades infecciosas, autoinmunes y cáncer en comparación a los individuos clínicamente sanos. 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 trastornos del desarrollo, las autoinmunidades ocupan un lugar importante entre las patologías que son similares entre humanos y animales (Gershwin, 2007; Gyles, 2016).

Las enfermedades autoinmunes más frecuentes en razas de felinos son pénfigo, poliartritis inmunomediada, lupus eritematoso sistémico (LES), trombocitopenia, anemia hemolítica inmunomediada, enfermedad inflamatoria intestinal y miastenia gravis autoinmune, sin embargo, actualmente no se cuenta con estudios que relacionen la presencia de autoanticuerpos contra citocinas y la susceptibilidad a infecciones en felinos (Werner *et al.*, 1984; Olivry, 2018; Bizikova *et al.*, 2019).

Más recientemente, se ha reportado la presencia de autoanticuerpos contra interferones (IFNs) tipo I en pacientes que presentan un estado crítico de la enfermedad COVID-19, estableciendo una relación entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes contra IFNs tipo I y la complicación de COVID-19 (Bastard, Lévy, *et al.*, 2021; Bastard, Orlova, *et al.*, 2021).

1.2. Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas y péptidos no estructurales, 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 (Monastero, 2017).

Las citocinas actúan como mediadores y moduladores dentro de ambientes altamente localizables y regulan las respuestas inmunológicas, el desarrollo hematopoyético y la comunicación célula-célula, así como orquestan respuestas a agentes infecciosos y estímulos inflamatorios. 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 (Stenken, 2015; Bellanti, 2016). 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. Los efectos fisiológicos de las citocinas frecuentemente dependen de las concentraciones relativas de las mismas. Así mismo, en algunos casos, las citocinas muestran antagonismo, es decir, los efectos de una citocina inhiben o neutralizan las acciones de otras citocinas (Denkers, 2003; Zhang, 2007; Kindt, Golsby, & Osborne, 2014, Stenken, 2015).

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, y una minoría tiene un efecto endocrino; es decir, una citocina dada puede unirse a los receptores en la membrana de la misma célula que la secreta y ejercer una acción autocrina, adherirse a los receptores en una célula blanco cercana a la célula productora y llevar a cabo un efecto paracrino, en unos cuantos casos, se une

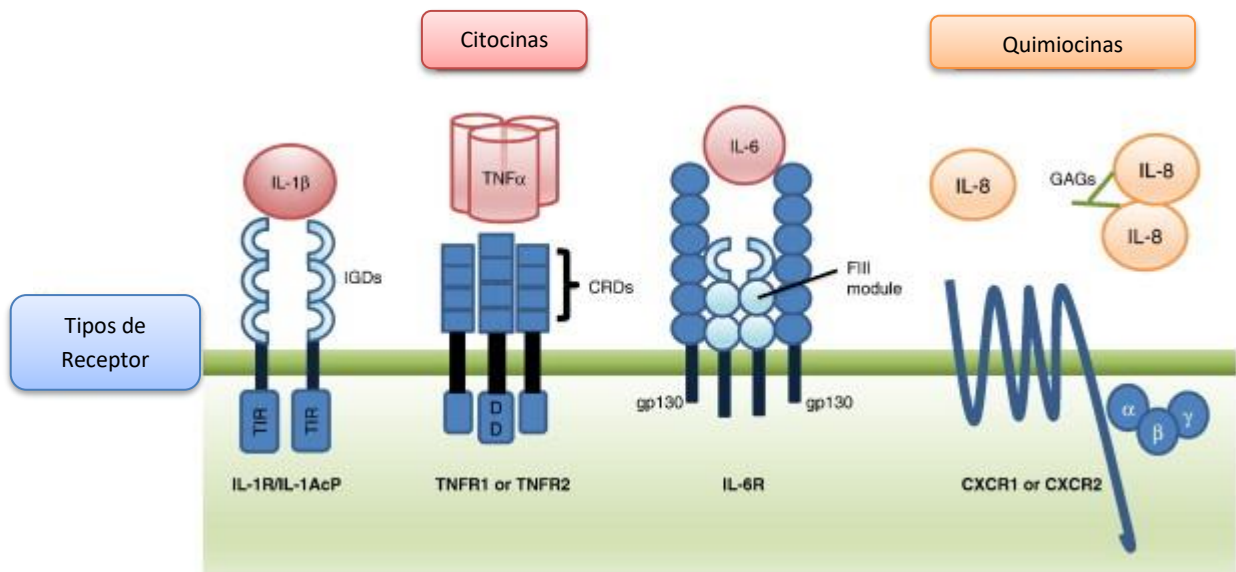
a las células blanco en partes distantes del cuerpo y tiene una acción endocrina (Zhang, 2007; Dinarello, 2007; Turner, 2014).

Las citocinas juegan un papel muy importante en el proceso de montaje de respuestas anti-microbianas, éstas orquestan la respuesta inmune innata induciendo inflamación local protectora y respuestas sistémicas de fase aguda; también las citocinas son importantes en el inicio, la amplificación, dirección, mediación y regulación de la respuesta inmune adaptativa; 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 γ 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 γ y a las moléculas co-estimuladoras, los macrófagos sobre-expresan IL-12 y otras citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Las citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-12 y TNF α , entre otras) y quimiocinas (IL-8, MIP-3 α , MCP-1 β , RANTES, entre otras) son producidas para favorecer la presencia y atraer a otras células inmunocompetentes al sitio de la infección, respectivamente. Sin embargo, muchas tienen funciones homeostáticas en hematopoyesis, el inicio de la respuesta inmune adaptativa y la vigilancia inmune (Bliss *et al.*, 1999; Denkers, 2003; Turner, Nedjai, Hurst, & Pennington, 2014; Holdsworth, 2015).

Actualmente no es posible clasificar a las citocinas a partir de la célula que la originan o por su función biológica, sin embargo, se pueden agrupar en interleucinas (ILs), factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN) y quimiocinas (citocinas quimioatrayentes); éstas últimas 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; Barros de Oliveira, 2011; Zlotnik & Yoshie, 2012). Por otra parte, las quimiocinas controlan la migración direccional de poblaciones específicas de células inflamatorias mediante la unión a sus receptores, activando la maquinaria celular requerida para el movimiento y se pueden unir a glucosaminoglicanos facilitando la organización de quimiocinas en gradientes haptotáticos que dirigen el movimiento celular (Koopmann, Ediriwickrema, & Krangel, 1999; Rossi & Zlotnik, 2000).

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 respuesta 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 en el dominio intracelular lo que permite la transducción de señales, mientras que las quimiocinas ejercen sus funciones quimiotáticas 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 1**) (Kindt *et al.*, 2014; Scholten *et al.*, 2012).



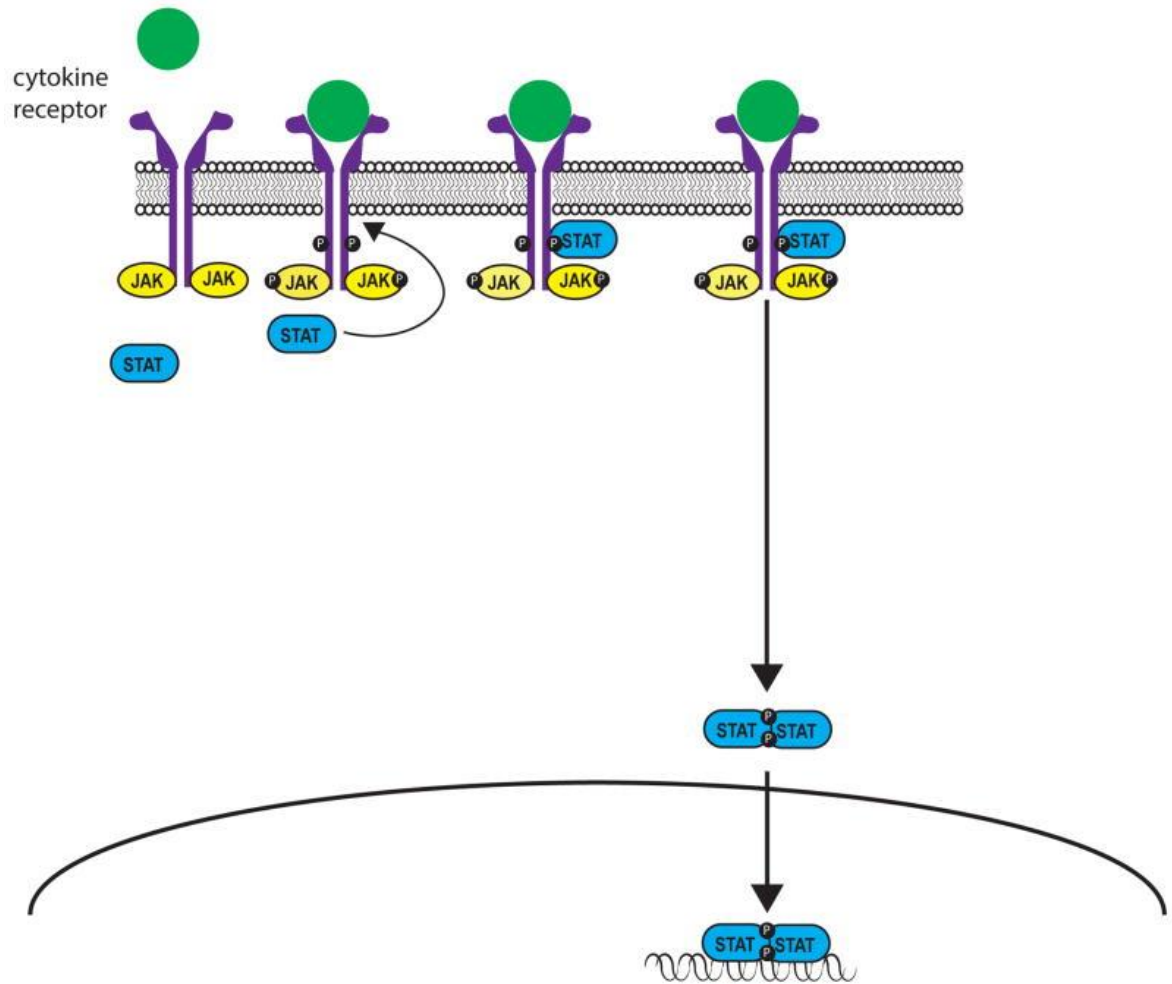
Esquema 1. Citocinas y sus receptores. Las citocinas señalizan vía receptores transmembranales tipo 1, formados por dominios extracelulares para la unión al ligando y dominios intracelulares que permiten la transducción de señales, mientras que la señalización de las quimiocinas ocurre vía la activación 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

Las citocinas ejercen sus efectos biológicos uniéndose a receptores específicos expresados en la membrana de muchos tipos de células, lo que las hace un blanco 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 el desarrollo y control de la respuesta inmunitaria al estimular o inhibir la activación, la proliferación y diferenciación de diversas células; así como, controlar la secreción de anticuerpos u otras citocinas y citotoxinas (Kindt *et al.*, 2014; Seif *et al.*, 2017).

Una de las rutas efectoras más importante es la señalización a través de la cinasa janus (JAK del inglés *janus kinases*) y el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT, del inglés *signal transducers and activators of transcription*), estas rutas son activadas por ligandos de citocinas estimulando la liberación de otras citocinas y desempeñan un papel importante en la transferencia de señales vía receptores de la membrana celular al núcleo (Monastero, 2017). Cuando una citocina se une a su receptor en esta ruta, el receptor se dimeriza y las JAK son activadas, las cuales son tipos de tirosincinasas que se unen a las regiones citoplasmáticas de los receptores de citocinas tipo I y II. 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 2**) (Niemand *et al.*, 2003; Monastero 2017).

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; así mismo, estas citocinas son esenciales para iniciar y desarrollar respuestas inmunes innatas y adaptativas (Seif *et al.*, 2017).



Esquema 2. 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 O'shea, 2015)

1.4. Autoanticuerpos contra citocinas y susceptibilidad a infecciones en humanos

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 (Kivity, 2009; Invernizzi, 2009; Hewagama, 2009).

Los autoanticuerpos anti-citocinas son cada vez más reconocidos como contribuidores potenciales en la adquisición de las inmunodeficiencias. Aunque aún no se ha establecido su participación definitiva en todos los casos, estos autoanticuerpos generalmente IgG policlonales pueden mediar diversas infecciones y manifestaciones inmunológicas dependiendo de su citocina blanco pudiendo afectar las funciones de células del sistema inmunitario, predisponiendo a una amplia variedad de posibles enfermedades y causando una susceptibilidad al huésped a enfermedades infecciosas que amenazan la vida del individuo (Dinarello, 2003; Winthrop, 2009; Ercolini, 2009; Maddur, 2010; Cappellano, 2012; Browne, 2014; Knight, 2016).

En general, una correlación entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes hacia IFN γ 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. En 2004, Döffinger *et al.* describen una infección diseminada causada por *M. tuberculosis* y *M. chelonae*, en un paciente con diabetes autoinmune (tipo I) e hipotiroidismo primario, el cual falleció a causa de la infección. El suero de dicho paciente presentó un alto título de IgG anti-IFN γ capaz de bloquear *in vitro* la respuesta de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores normales hacia esa citocina (Döffinger *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 *Mycobacterium chelonae*. Más tarde, el paciente falleció

debido a una severa sepsis. Los autores encontraron una fuerte actividad anti IFN γ inhibitoria en el plasma del paciente e identificaron un autoanticuerpo hacia IFN γ con alta afinidad neutralizante (Hoflich, *et al.*, 2004).

En el año 2005 Kampmann *et al.* reportan a tres pacientes con altos títulos de anticuerpos que específicamente se unen a IFN γ 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 de pacientes quienes no tienen desórdenes inmunológicos reconocidos previamente. Así mismo, mencionan que los anticuerpos anti-IFN γ pueden ser funcionales ya que pueden bloquear la producción de TNF α en respuesta a una endotoxina o la expresión de genes inducida vía IFN γ , también pueden inhibir la expresión de HLA-II en PBMC (Kampmann *et al.*, 2005).

Ese mismo año, otro grupo de investigadores detectó altos títulos de IgG neutralizante anti-IFN γ en el plasma de seis pacientes que presentaban infección diseminada predominantemente con micobacterias de crecimiento rápido. Demostrando que estos anticuerpos tienen *in vitro* una actividad biológica en la fosforilación de STAT-1 dependiente de IFN γ , así como en la sobre-expresión de TNF α e IL-12 dependiente de IFN γ (Patel *et al.*, 2005).

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

Todas las observaciones mencionadas en los párrafos anteriores sugieren que los autoanticuerpos contra IFN γ pueden inducir una susceptibilidad de inicio tardío a infecciones micobacterianas diseminadas que pueden ser refractarias a la quimioterapia.

Por otra parte, se reportó la presencia de autoanticuerpos contra IL-6 en un niño con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente por el curso de los eventos clínicos en el paciente, los autores concluyeron que la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6 presidió a la infección estafilococal. De igual forma, se han detectado estos autoanticuerpos en pacientes con APECED y timoma (Puel *et al.*, 2008; Kärner *et al.*, 2016).

Así mismo, pacientes que sufren de proteinosis alveolar pulmonar (PAP) presentan anticuerpos neutralizantes contra el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, del inglés *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), mostrando una alta mortalidad; los autores confirman una relación entre la función afectada de GM-CSF por la actividad neutralizante de los autoanticuerpos presentes y PAP. También se han detectado autoanticuerpos anti-GM-CSF en pacientes con meningitis criptococal (Kitamura *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 2014; Saijo *et al.*, 2014).

Las citocinas Th17 están implicadas en la protección contra infecciones fúngicas, incluyendo *Candida sp.* en las superficies mucosales, en varios estudios se ha demostrado que anticuerpos neutralizantes hacia citocinas Th17 predisponen a este tipo de infecciones (Dubin y Kolls, 2008; Conti *et al.*, 2009; 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; Puel *et al.* 2010).

También, se reporta la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en pacientes con APECED causada por mutaciones en el regulador autoinmune (AIRE), así mismo, se demostró en estos pacientes que anticuerpos de la clase IgG son los responsables de la actividad neutralizante contra IFN ω , IFN α 2a, IL-17A e IL-22; estableciéndose una relación entre el desarrollo de autoanticuerpos contra IL-17 y la infección crónica por *Candida* en mucosas (Kärner *et al.*, 2013; Kisand *et al.*, 2011).

Más recientemente, se ha reportado la presencia de autoanticuerpos contra IFNs tipo I en al menos el 10% de los casos de pacientes que presentan un estado crítico

de la enfermedad COVID-19, observando que estos autoanticuerpos fueron más frecuentes en hombres (95%) que en mujeres (5%), así como, en pacientes mayores a 65 años. Estos autoanticuerpos neutralizaron a $IFN\alpha$ o $IFN\omega$, remarcando la importancia de este tipo de IFNs en la inmunidad protectora contra el virus SARS CoV-2 y estableciendo una relación entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes contra IFNs tipo I y la complicación de COVID-19 (Bastard, Lévy, *et al.*, 2021; Bastard, Orlova, *et al.*, 2021; de Prost *et al.*, 2021; Goncalves *et al.*, 2021; Koning *et al.*, 2021; Troya *et al.*, 2021; van der Wijst *et al.*, 2021).

1.5. Incidencia de autoanticuerpos anti-citocinas en caninos y equinos

Por otra parte, es importante agregar que dentro del área veterinaria existen pocos reportes detallados de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas relacionados con enfermedades infecciosas, existiendo únicamente estudios en la especie canina y equina.

Autran *et al.*, en 2019, reportan un trabajo donde se analizaron 101 muestras séricas de caninos de los cuales 51 eran de pacientes, las muestras de los animales enfermos mostraron valores significativos de autoanticuerpos anti-citocinas presentes mas no las de los controles sanos. Se observaron respuestas complejas de autoanticuerpos contra citocinas IL-17, $IFN\gamma$ e IL-6 en los caninos con enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias, mientras que los pacientes con enfermedades infecciosas presentaron autoanticuerpos dirigidos principalmente hacia IFNs tipo I y II, IL-17 e IL-10 y los caninos con infecciones virales mostraron autoanticuerpos anti- $IFN\lambda$, mientras que en los pacientes con cáncer se observaron respuestas únicas de autoanticuerpos contra GM-CSF y G-CSF, y en el caso de individuos con miositis presentaron autoanticuerpos anti-21 (Autran, 2019).

De igual forma, en otro estudio realizado en caninos con 133 muestras séricas (86 de pacientes y 50 de individuos clínicamente sanos), se observó la presencia de autoanticuerpos contra IL-18, IL-12 y diferentes quimiocinas, principalmente en pacientes con enfermedades relacionadas a procesos de inflamación (epidermólisis

bullosa, miositis y pénfigo), mientras que en los pacientes con enfermedades relacionadas a daño en tejido epitelial (epidermólisis bullosa, miastenia gravis, pénfigo) se detectaron autoanticuerpos contra el receptor de IFN λ (IL-28Ra). Las muestras de los pacientes con enfermedades infecciosas causadas por agentes fúngicos resultaron positivas a autoanticuerpos contra la IL-28B (IFN λ 3) y el receptor IL-10Ra. Así mismo, en pacientes con diferentes tipos de enfermedades se detectaron autoanticuerpos contra IP-10 (CXCL10) o IL-12. (Cortes, 2019)

En cuanto a los estudios en equinos, Autran en 2019, analizó 100 muestras equinas (50 pacientes y 50 de controles negativos) para el análisis de la correlación entre la presencia de autoanticuerpos y el desarrollo de enfermedades autoinmunes, infecciosas o ambas; en dicho estudio, se identificaron autoanticuerpos dirigidos hacia las citocinas IFN γ , IL-17 e IL-6 en equinos con enfermedades infecciosas; así mismo, autoanticuerpos contra IL-17 e IL-10 se asociaron principalmente a enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias. (Autran, 2019)

1.6. 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 un analito diferente (proteína, lipopolisacárido, entre otros), las microesferas conjugadas por lo tanto pueden ser mezcladas e incubadas con la muestra en un pozo de microplaca con filtro de fondo, para reaccionar con analitos específicos y posteriormente dicha interacción se evidencia con el uso de 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 la emisión de luz 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 fluorescente informador capturado durante el ensayo.

El ensayo permite la detección y cuantificación de múltiples analitos (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, anticuerpos, entre otros) en una sola muestra, empleando un principio similar al ensayo por inmunoadsorción 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.

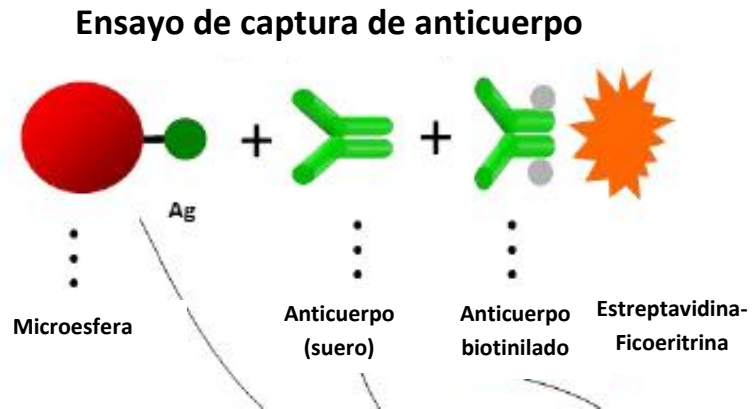
En el caso del ensayo de captura indirecto, cada analito es acoplado covalentemente a las microesferas con una región en particular. Posteriormente, se añade la muestra problema para la unión de los anticuerpos específicos al analito y finalmente se agrega un anticuerpo anti-inmunoglobulina especie específico, el cual puede estar conjugado con un fluorocromo (PE, ficoeritrina) o con biotina, para este último caso es necesario utilizar la estreptavidina-PE como molécula indicadora (**Esquema 3, 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 unido específicamente. 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 3, Panel B**).

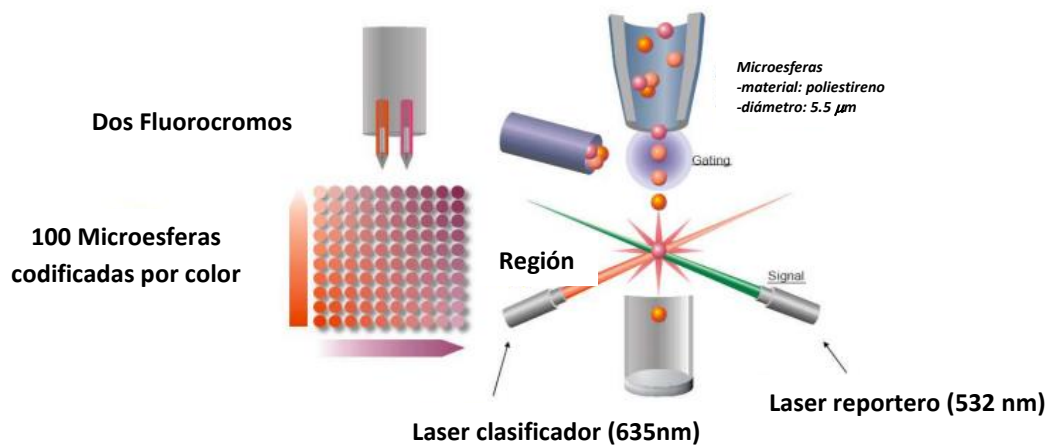
El procedimiento de activación de microesferas para el acoplamiento proteico involucra una reacción carbodiimido en dos pasos; los grupos carboxilo en la superficie

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, este 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 aminas reactivas, de cualquier forma, el ester-NHS tiene mayor estabilidad a pH fisiológico. Estos intermediarios después reaccionan con aminas primarias 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, esta reacción ocurre de forma inmediata y finaliza en cuestión de minutos (**Esquema 4**).

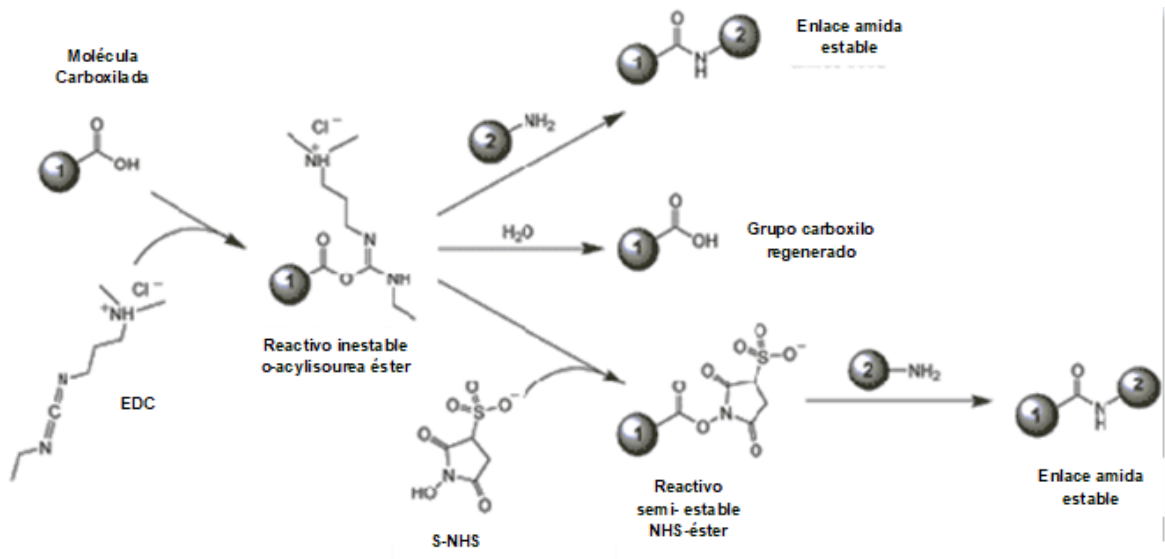
PANEL A)



PANEL B)



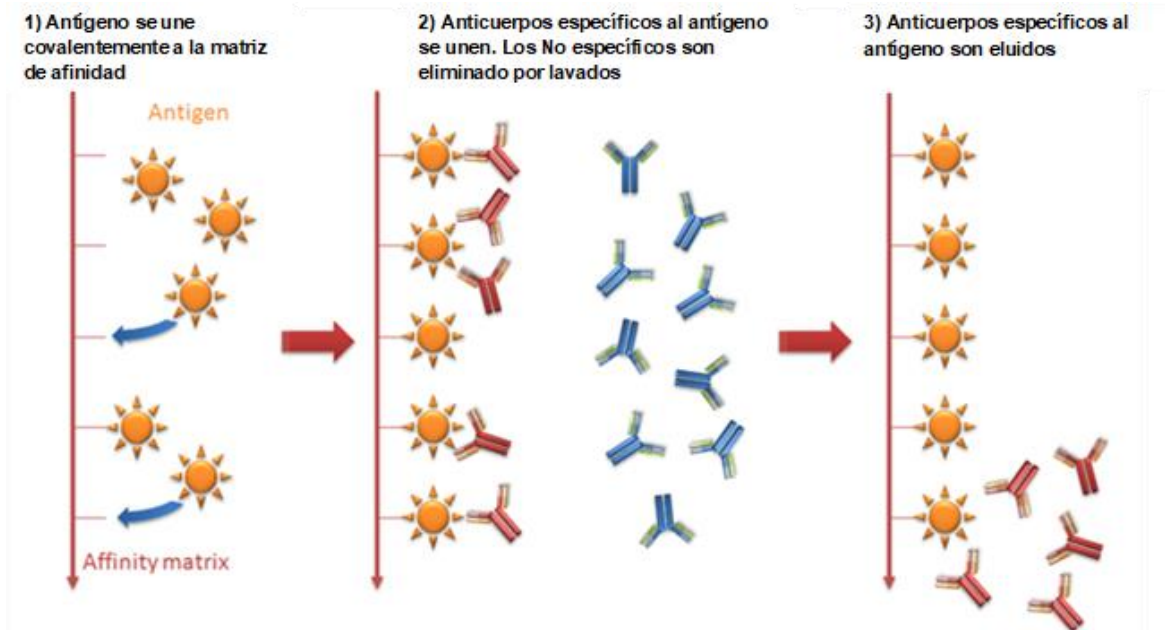
Esquema 3. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex).
Panel A Inmunoensayo indirecto para la detección de autoanticuerpos contra los diferentes mediadores químicos. **Panel B** Microesferas codificadas ópticamente utilizando una mezcla de diferentes colorantes fluorescentes que son decodificados por un citómetro de flujo (Modificado de MicroPlex® Non-Magnetic Microspheres | Coupled to Protein or Nucleic Acid, n.d.).



Esquema 4. Acoplamiento proteico entre las microesferas y las citocinas. Reacción que se presenta entre el grupo carboxilo de las microesferas y las citocinas empleando EDC y S-NHS (Modificado de ThermoScientific, 2011).

1.7. 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 5**). 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 el ensayo de microesferas en suspensión múltiple para determinar en cuales de ellas se encuentran los anticuerpos purificados (Huse, Böhme, & Scholz, 2002; Jackson, Sobansky, & Hage, 2012).



Esquema 5. Cromatografía por afinidad. La purificación de anticuerpos por afinidad implica tres pasos principales: 1) Acoplamiento del antígeno (citocina) 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

Resulta interesante dar continuidad al análisis de la detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de pacientes con enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas, teniendo como base la función tan importante que presentan las citocinas en el desarrollo y regulación de la respuesta inmunitaria necesaria para el control de las infecciones y de enfermedades autoinmunes, 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; dichos reportes indican la importancia de considerar que estas condiciones podrían afectar las actividades biológicas de las citocinas y de esta forma alterar las funciones de las células inmunitarias involucradas en el control y la eliminación de los patógenos (Browne & Holland, 2010b; Doffinger *et al.*, 2004; Dubin & Kolls, 2008; Höflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005; Maddur *et al.*, 2010; Patel, *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2005; Puel *et al.*, 2008).

Por otra parte, es importante agregar que dentro del área veterinaria existen pocos reportes de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas relacionadas con enfermedades infecciosas, sin embargo, recientemente resultados preliminares de los estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, sugieren la posible relación entre el tipo de padecimiento y los niveles de autoanticuerpos contra una o más citocinas; demostrándose, que sistemas de citocinas humanas recombinantes acoplados a microesferas, funcionan adecuadamente para llevar a cabo la detección de autoanticuerpos contra citocinas o quimiocinas en muestras séricas de otras especies, como son los caninos y equinos (Autran, 2019; Cortes, 2016). Por lo tanto, considerando los resultados de un estudio previo del grupo de trabajo, donde se analizaron un total de 100 muestras séricas de caninos (50 sueros de individuos clínicamente sanos como controles negativos y 50 de pacientes), de los sueros del grupo de pacientes, con problemas infecciosos o enfermedades autoinmunes, se reportaron 44 individuos positivos a la presencia de autoanticuerpos contra al menos

una citocina, principalmente hacia IFN γ , IL-17F, IL17A, IL17B, TGF- β 1, TNF α , IL-28B e IL-6, resultando negativos todos los individuos del grupo control (Autran, 2019).

Así mismo, en otro estudio realizado en 133 muestras séricas de caninos (86 pacientes y 50 individuos clínicamente sanos), se detectaron, en 29 caninos con diversos padecimientos, altos niveles de autoanticuerpos contra al menos una citocina, encontrando patrones de reactividad principalmente hacia IL-12, IL-18, IL-28B, IL-28Ra, IL-10Ra e IP10 (CXCL10) (Cortes, 2019).

Por otra parte, también existe un reporte en donde se detectaron autoanticuerpos contra diferentes quimiocinas en muestras séricas de pacientes caninos, siendo los autoanticuerpos contra Eotaxin, I-309, MIP-3 α , MDC, IP-10, I-TAC y SDF-1 α los más frecuentes (Cortes, 2016).

Otra especie en la que se ha realizado la detección de autoanticuerpos es la equina, en este estudio se menciona la presencia de autoanticuerpos contra IFN γ , IL-17, IL-10 e IL-6 en equinos con enfermedades infecciosas, autoinmunes y autoinflamatorias (Autran, 2019)

Por lo tanto, es posible especular que la existencia de autoanticuerpos anti-citocinas pudieran estar ejerciendo un efecto sobre la función biológica de sus moléculas dianas en otras especies, como es la felina. Así mismo, es importante dar continuidad a estudios de detección de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas humanas donde éstos pudieran estar implicados en la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Resultando interesante realizar el análisis de la presencia y la determinación de la capacidad neutralizante de autoanticuerpos contra citocinas detectados en muestras séricas de pacientes con diversas enfermedades infecciosas o autoinmunes, empleando diversos ensayos *in vitro* para evaluar la inhibición de la función biológica de estos mediadores químicos, así como, la identificación de algunos determinantes antigénicos de las citocinas mediante la técnica de microarreglos de péptidos sobrelapados, para lograr una mejor caracterización de dichos autoanticuerpos anti-citocinas.

Debido a que la presencia de autoanticuerpos contra citocinas 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; considerando que estos autoanticuerpos pueden provocar la pérdida del efecto al tratamiento y probablemente alteraciones de la función del sistema inmune, y por lo tanto, afectando la respuesta inmunitaria y predisponiendo al hospedero a una susceptibilidad a diversos agentes infecciosos.

3. HIPÓTESIS

3.1. Las citocinas humanas recombinantes acopladas a microesferas son de utilidad para determinar la presencia de autoanticuerpos contra estos mediadores químicos en muestras séricas felinas de pacientes con enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas, utilizando el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bio-plex (Luminex).

3.2. Los autoanticuerpos contra citocinas detectados en muestras séricas de individuos (felinos y humanos) con enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas presentan una capacidad inhibitoria sobre la actividad biológica de estos mediadores químicos, existiendo una relación entre la presencia de dichos autoanticuerpos y los cuadros clínicos de los pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Detectar la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas de felinos y humanos con diversas enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas, para analizar su capacidad neutralizante *in vitro* sobre la actividad biológica de estos componentes del sistema inmunitario.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Analizar muestras séricas de pacientes felinos y humanos para la detección de autoanticuerpos contra citocinas, empleando el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).

4.2.2. Realizar la purificación de autoanticuerpos anti-citocinas detectados en sueros, mediante la técnica de cromatografía de afinidad en columna.

4.2.3. Determinar la actividad neutralizante de los autoanticuerpos, sobre la función biológica de la citocina blanco, empleando ensayos *in vitro* con células mononucleares de sangre periférica o líneas celulares.

4.2.4. Identificar los posibles epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-citocinas mediante microarreglos de péptidos sobrelapados.

4.2.5. Evaluar el reconocimiento de algunos de los determinantes antigénicos previamente identificados mediante una variante de la técnica multiplexing, Luminex.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Muestras séricas

La colección de sueros humanos empleada en este estudio fue proporcionada por el Dr. R. Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.). Mientras que la colección de las muestras séricas correspondientes a felinos analizadas en este trabajo fue donada por el banco de sueros del Laboratorio de Virología Genética y Biología molecular, de la FES-Cuautitlán Campo 4, UNAM. El diagnóstico de los pacientes pertenecientes a ambas colecciones fue realizado por cada una de las instancias que facilitaron dichas muestras.

5.2. Elaboración de los sistemas de citocinas acopladas a microesferas y evaluación de la especificidad e integridad antigénica

De los diferentes sistemas citocina-microesfera empleados en el presente estudio algunos fueron donados por el Departamento de Bioquímica (Dr. Doffinger), mientras que aquellos que no se encontraban disponibles fueron elaborados en el laboratorio de trabajo. Los sistemas elaborados 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.

5.2.1. Amino acoplamiento de citocinas 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 μm , vía grupos carboxilos en la superficie de estas microesferas. Esto se realizó mediante reacciones vía carbodiimida donde participan 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 y aún después del almacenamiento (Rosenberg et al., 2016).

5.2.1.1. Preparación de la proteína

Las proteínas (citocinas humanas recombinantes) empleadas en el presente estudio se adquirieron comercialmente, los números de catálogo y marca de estas se muestran en la **Tabla 1**. Los liofilizados de las proteínas que se encontraban libres de azida de sodio, BSA, glicina, Tris o aditivos que contengan aminas, se resuspendieron en PBS, pH 7.4; mientras que las muestras de proteína que así lo requirieron se dializaron durante la noche contra PBS, pH 7.4, empleando la unidad de mini diálisis “Slyde-A-lyzer” (Thermo Scientific, 69580), siguiendo las indicaciones del instructivo. Brevemente, consistió en depositar 100 μ l de la proteína en cada unidad 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 este tiempo el PBS fue descartado y reemplazado, dejándose en agitación durante toda la noche.

Una reacción de acoplamiento requiere de 5 a 12 μ g de proteína dependiendo de la proteína usada. Si el acoplamiento de una proteína 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 (~ 10 μ g/100 μ l).

rh-Citocina*	Núm. de Catálogo	Marca	Región de las Microesferas	Núm. de Catálogo Luminex
IL-17A	317-ILB	R&D Systems	21	LC10021-01
IL-17F	H7916	Sigma	45	LC10005-01
IFN γ	IMMUKIN (407617-1)	IMMUKIN	26	LC10026-01
IL-6	H7416-10UG	Sigma	28	LC10028-01
IL-10	11340107	ImmunoTools	92	LC10092-01
IL-10Ra	9100-R1	R&D Systems	24	LC10024-01
vIL-10 EBV	915-VL/CF	R&D Systems	99	LC10099-01

Tabla 1. Listado e información de algunas de las citocinas y microesferas empleadas. Se indica el número de catálogo y la marca correspondiente de las citocinas y microesferas de diferentes regiones adquiridas comercialmente. ***rh-Citocina**: Citocina humana recombinante.

5.2.1.2. 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 breve y vigorosamente 1 ml de cada región (1.25×10^7 microesferas/ml) en el agitador vórtex y posteriormente se sonicaron en un baño ultrasónico durante 1 min por 4 veces.

NOTA: Fue importante considerar que las microesferas COOH estuvieran completamente resuspendidas como partículas monodispersas sencillas, por lo que se realizó la detección de agregados de microesferas por microscopía, reconociéndolos 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 para la eliminación de agregados, la sonicación fue repetida hasta dejar de observarlos.

3. Se transfirieron 1000 μ l de microesferas COOH monodispersas (1.25×10^7 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 hacia el lado contrario al botón y se removió el sobrenadante desde la pared opuesta al mismo.

4. Se resuspendieron las microesferas en 1 ml de solución amortiguadora de lavado (solución amortiguadora MES ~100 mM, pH 6.0) (SIGMA, M1317-100ML) y se agitaron en vórtex 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 μ l de solución amortiguadora de activación (solución amortiguadora MES ~100 mM, pH 6.0) y se agitó en vórtex 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 μ l (1x ~10 μ l) de EDC, se agitó breve e inmediatamente se agregaron 110 μ l (1x ~10 μ 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 este paso de activación.

7. Posterior a la incubación, se agregaron 1,000 μ l de PBS, pH 7.4 a las microesferas activadas, se agitaron en el vórtex 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 este paso.

8. El botón de las microesferas activadas fue resuspendido con 1,000 μ l de PBS, pH 7.4, se agitó en vórtex a velocidad media por 30 seg y se sonicó en el baño ultrasónico durante 60 seg dos veces.

5.2.1.3. 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 relación de $\sim 10 \mu\text{l}/100 \mu\text{l}$, dependiendo de la cantidad disponible de cada citocina; como un control negativo se utilizó el sistema acoplado a 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 μl 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 (con la proteína ya acoplada).

12. Se resuspendió el botón de microesferas acopladas en 1,000 μl de solución amortiguadora de bloqueo (10 mM PBS, 1% BSA, 0.05% w/v NaN_3). 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 μl de solución amortiguadora de bloqueo-almacenamiento (10 mM PBS, 1% BSA, 0.05% w/v NaN_3). Se mantuvieron a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta ajustar la concentración a 3×10^6 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 5.2.1.4). y se ajustó la concentración a 3×10^6 microesferas por ml.

16. Finalmente, después de ajustar los volúmenes de cada uno de los sistemas preparados para obtener el número de microesferas/ml, se hicieron alícuotas usando 20 μl de suspensión de microesferas/vial, se etiquetaron y se almacenaron a -70 $^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior.

5.2.1.4. Conteo de microesferas con cámara de Neubauer

Inicialmente, se tomaron 3 μl de la suspensión de microesferas acopladas y se depositaron en 57 μl de PBS, para alcanzar un volumen final de 60 μl a una dilución 1/20. Posteriormente, el conteo de éstas se realizó empleando un volumen de 10 μl 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 el número 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 3×10^6 microesferas por ml, para lo cual se determinó el volumen final de cada sistema 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 (3×10^6 microesferas por ml).

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

Por lo tanto,

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

5.3. 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 una alícuota ($20 \mu\text{l}$), la cual se agregó en $4,980 \mu\text{l}$ de solución amortiguadora pre-bloqueadora (10 mM PBS pH 7.4, 1% BSA, 0.05% de NaN3) 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 50 μ l por pozo de los anticuerpos anti-citocinas específicos biotinilados (diluidos 1:100) en los pozos correspondientes, 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.

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

6. Posteriormente se adicionaron 50 μ l/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).

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

8. Finalmente se agregó un volumen de 100 μ l/pozo de PBS-T y las microplacas se colocaron en el lector luminex para llevar a cabo el análisis correspondiente.

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

5.4. 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.

5.5. Detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas felinas y humanas mediante el ensayo de arreglo de partículas en suspensión múltiple

La detección de autoanticuerpos en muestras séricas humanas se realizó en microplacas de 96 pozos (Multiscreen HTS Milipore, UK, Cat MSBVN1210), siguiendo la metodología para la evaluación de los sistemas (**Punto 5.3**) y utilizando 50 μ l de cada muestra diluida (1/200).

Brevemente, se sirvieron 50 μ l de las muestras problemas (diluidas 1/200) a cada pozo conteniendo los sistemas citocinas-microesferas, 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 μ l del anticuerpo de detección (anti-IgG humana) conjugado con PE (Leinco Technologies I-127) diluido 1/100 y se incubó durante una hora en las condiciones anteriores. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados de la microplaca. Finalmente se agregaron 150 μ l 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).

Para el caso de las muestras felinas se empleó un anti-IgG felino biotinilado (Sigma-Aldrich, SAB3700075) por lo que posterior a la incubación con dicho anticuerpo se agregaron 50 μ l de una solución de estreptavidina-ficoeritrina a una dilución 1/50 en solución amortiguadora bloqueadora. Y se continuó con los lavados y lectura de la placa como se describió anteriormente.

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).

5.6. Técnica de cromatografía de afinidad por columna

Posterior a la confirmación de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en las diferentes muestras séricas, se llevó a cabo el procedimiento de purificación de los autoanticuerpos, empleando el kit de acoplamiento proteico de micro enlace (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 μ l 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_3), pH= 7.4.
- d) Solución de Cianoborohidruro de sodio al 5M (NaCNBH_3 , 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_3 .
- f) Solución amortiguadora de Elución (Elution Buffer): 50 ml, pH 2.8, contiene aminas primarias.
- g) Tubos de colección para microcentrífuga: Viales con tapa y con una capacidad de 0.5 ml.
- h) Solución amortiguadora de almacenamiento: Se prepararon 100 ml de la solución amortiguadora de fosfatos (PBS; igual que la solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2) conteniendo 0.05 % de NaN_3 .

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.

5.6.1. 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 μm o añadir ázida de sodio a una concentración final de 0.02% y almacenar a 4 °C.

Muestra de proteína: Se disolvió la citocina recombinante en 400 μl de solución amortiguadora de acoplamiento, tratando de ajustar a una concentración final de 0.5-1 mg/ml.

5.6.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína

A) Preparación de la columna e inmovilización de la proteína

En todos los pasos se mezcló la resina de acoplamiento con la solución amortiguadora, para lograr esto 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 completamente, y luego cuidadosamente se agita la columna en un vórtex a baja velocidad. Es importante que la resina permaneciera húmeda todo el tiempo. Los pasos de centrifugación se realizaron a 1000 x 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 μl 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 μl 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 μl) 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 cuidadosamente en un vórtex a baja velocidad.

5. En una campana de extracción, se destapó la columna y se añadieron 5 μl 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 adicionó una concentración final de 0.05% de Tween-20 (se agregaron a la columna 0.5 μl de Tween-20 para 400 μl de muestra utilizada), lo cual 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 (Vial: B) con un ensayo de proteínas y se sugiere comparar con la concentración inicial (Vial: A).

8. Se removió la tapa de la columna y se insertó el tapón. Se adicionaron 500 μl 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).

B) Bloqueo de los sitios activos de unión remanentes

1. Se destapó la columna y se insertó el tapón. Posteriormente se adicionaron a la resina 500 μ l de solución amortiguadora de enfriamiento, 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 5.7.3**).

5.6.3. 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 µl de la muestra sérica diluida vol:vol (Vial E) 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 µl 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 paso dos veces más (Viales: F, G y H).
7. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 µl 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 este paso una vez más (Viales: I y J).

8. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 μ l de la solución amortiguadora de acoplamiento, en incrementos de 100 μ l, 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 μ l 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 μ l de Tris 1M, pH 9.0 (5 μ l para 100 μ l 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).

5. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 300 μ l de la solución amortiguadora de elución (pH 2.0) 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-8). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 18 μ l de Tris 1 M, pH 9.0 (para 300 μ l 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 μ l 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 μ l de una solución de BSA al 4.5%; y se conservaron en refrigeración hasta el análisis.

5.6.4. 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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.

5.7. Determinación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-citocinas 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, Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC's), HEK-Blue o sangre completa, las cuales se estimularon de forma exógena con la citocina humana recombinante 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%CO₂ y 100% humedad) se compararon los niveles de los efectos de las citocinas neutralizadas por la presencia o ausencia de los autoanticuerpos; por lo tanto, se analizó 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 IL-6, sobre la producción de IL-12 mediada por IFN γ o la vía de la señalización de STAT-4 mediada por IL-2.

5.7.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica y líneas celulares humanas

5.7.1.1. Línea Celular 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 1×10^7 cels/ml, empleando el medio de cultivo DMEM Suplementado 10% SFB, penicilina-estreptomicina 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 cm², con rosca con filtro, Cat. # 174952., Thermo Scientific, Fisher®, Tripsina (Sigma Aldrich®, Cat. No. 7924).

5.7.1.2. Células Mononucleares de Sangre Periférica

La obtención de PBMC's humanas se realizó a partir de sangre completa de donadores clínicamente sanos, bajo su consentimiento informado. Para su purificación se empleó un gradiente de densidad (Ficoll-Paque® Cat. No. GE-17-1440-02), las células fueron lavadas centrifugando a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C y la suspensión celular fue ajustada a una concentración de 3×10^5 cel/ml en RPMI 1640-Completo a 37 °C, CO₂ al 5%. La viabilidad de las células y el conteo celular se determinó por medio del método de exclusión del colorante azul de tripán al 0.4%.

5.7.1.3. Línea celular HEK-Blue IL-12

Las células HEK-Blue IL-12 se adquirieron comercialmente de la compañía Invivogen, (Núm. Cat. Hkb-il12) son células HEK293, las cuales están diseñadas para detectar IL-12 mediante la activación de la cascada de señalización de STAT 4 y se generaron introduciendo genes del receptor de IL-12, así como de los factores que intervienen en su cascada de señalización. Así mismo, esta línea celular cuenta con el gen de SEAP (por sus siglas en *inglés Secreted embryonic alkaline phosphatase*) el cuál es utilizado como gen reportero.

La expansión inicial de las células se realizó descongelando el vial en agitación a 37 °C a baño maría, una vez descongeladas las células se transfirieron a un tubo que contenía 15 ml de Medio de Crecimiento DMEM suplementado con 4.5 g/l glucosa, 2mM L-glutamina, FBS inactivado por calor (30 min a 56 °C), Pen-Strep (100 U/ml-100 µg/ml), 100 µg/ml Normocina). Se centrifugó el tubo a 300 g por 5 min, se removió el sobrenadante que contenía el agente crioprotector y se resuspendieron las células en 1 ml de Medio de Crecimiento (sin antibióticos de selección), posteriormente, se transfirieron a un frasco de cultivo de 25 cm² que contenía 5 ml del Medio de Crecimiento y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂, es importante mencionar que se deben realizar dos pases de las células en Medio de Crecimiento, cada uno de estos pases debe llevarse a cabo cuando las células alcancen el 70-80% de confluencia.

Para el mantenimiento de las células, estas se subcultivaron en Medio Selectivo, el cual contiene el Medio de Crecimiento y la Solución de Selección a 1x (HEK-Blue *Selection*) empleando frascos de cultivo de 150 ml (Frascos tipo T75 de cultivo celular, 75 cm², con rosca con filtro, Cat. # 174952., Thermo Scientific, Fisher). Los pases de las células deben realizarse dos veces por semana, desprendiendo las células utilizando PBS y el raspador de células evitando que las células alcancen el 100% de confluencia.

La preparación de las células para el ensayo de inhibición se realizó lavando con PBS tibio, desprendiendo las células utilizando el raspador de células, se contaron y se evaluó la viabilidad de las células. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 rpm y se resuspendieron en Medio de Prueba DMEM suplementado con 4.5 g/l glucosa, 2mM L-glutamina, FBS inactivado por calor (30 min a 56 °C), Pen-Strep (100 U/ml- 100µg/ml), sin Normocina y sin HEK-Blue *Selection*, preparando la suspensión celular a una concentración de 320,000 células/ml (3.2 X10⁵ células/ml).

5.7.1.4. Línea celular HEK-Blue IL-6

Las células HEK-Blue IL-6 se adquirieron comercialmente de la compañía Invivogen, (Núm. Cat. Hkb-il6) son células HEK293, las cuales están diseñadas para detectar IL-6 mediante la activación de la cascada de señalización de STAT 3 y se generaron introduciendo genes del receptor de IL-6 y del factor de transcripción STAT 3. Así mismo, esta línea celular cuenta con el gen de SEAP, el cuál es utilizado como gen reportero.

La expansión, el mantenimiento y la preparación de la línea celular HEK-Blue IL-6 para el ensayo del análisis de la función neutralizante de autoanticuerpos en la vía de señalización IL-6 empleando las líneas celulares HEK-Blue IL-6 se realizó siguiendo la metodología descrita para HEK-Blue IL-12.

5.7.2. Ensayo de inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex

La evaluación de la función biológica de los autoanticuerpos contra IL-6 se determinó midiendo los niveles de fosforilación de STAT-3, los cuales se cuantificaron mediante el uso del kit Bio-Plex Pro *Cell Signaling Assays* (Bio-Rad, Núm. Cat. 10024929) empleando la citocina rhIL-6 (Sigma Aldrich).

Se emplearon dos muestras diferentes de sueros humanos con niveles altos de autoanticuerpos anti-IL-6, simultáneamente se incluyó como control negativo un suero de un individuo clínicamente sano (negativo a la presencia de autoanticuerpos) previamente evaluados.

5.7.2.1 Pre-incubación de la rhIL-6 con las muestras séricas para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT-3

Las muestras séricas positivas o negativas a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6 se pre-incubaron con 25 μ l de rhIL-6 a una concentración de 50 ng/ml. Como control positivo del sistema se empleó la citocina con el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 a una concentración de 2 μ g/ml. El control negativo del sistema fue cada una de las condiciones anteriores sin rhIL-6, volumen que fue sustituido por DMEM. Así mismo, se incluyó la condición sin estímulo y sin muestras séricas (50 μ l de DMEM por vial).

5.7.2.2. Activación de la fosforilación de STAT3 en Hep3B con IL-6

De una suspensión celular Hep3B 2×10^6 células/ml se depositaron 500 μ l/vial (1×10^6 células) en tubos de 1.5 ml. Cada vial se centrifugó a 1000 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron con 50 μ l de cada una de las soluciones pre-incubadas que se describieron en el punto anterior. Todos los viales continuaron con una incubación de 30 min a TA.

5.7.2.3. Lisis celular.

Las células se lavaron con 500 μ l de solución de lavado en frío y se centrifugaron a 1000 x g por 5 min. El sobrenadante se retiró con una micropipeta. Posteriormente se les adicionó 250 μ l de la 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.

5.7.2.4. Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de trabajo para proteína sugerida para análisis de señalización es 200 μ g/ml (0.15-10 μ g/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).

5.7.2.5. 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 μ l de éstas con 2.85 ml de la solución de lavado (volumen necesario para 56 pozos, empleando 50 μ l/pozo). Se agitaron las microesferas de captura en el vórtex por 15 segundos.

5.7.2.6. 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 μ l de este anticuerpo con 1,425 μ l de la solución de dilución (volumen suficiente para 56 pozos de la placa, 25 μ l/pozo).

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

5.7.2.7. Medición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex

1. Se humedecieron las microplacas de 96 pozos con filtro-BV de 1.2 μ m el tamaño del poro (Millipore, Núm. Cat. MSBVN1210) agregando 150 μ l 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 x g durante 10 minutos.
3. Posteriormente en cada pozo de la microplaca humedecida se depositaron 50 μ l de la suspensión de microesferas-anticuerpo de captura (anti-phosphoSTAT-3) ya preparadas (previamente agitadas en el vórtex), y se removió el líquido por medio de filtración a vacío. Se realizaron dos lavados con 150 μ l por pozo de buffer de lavado.
4. A continuación, se agregaron en los pozos correspondientes 50 μ l 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 μ l de buffer de lavado. Se agregaron 25 μ l por pozo del anticuerpo de detección (anti-phosphoSTAT-3 biotinilado) 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 μ l de solución de lavado de lavado, dejando 2 min en agitación lenta (500 rpm) entre cada lavado.
7. Posteriormente se adicionaron 50 μ l/pozo de la solución de estreptavidina acoplada a 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 μ l/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.

5.7.3. Análisis de la función neutralizante de autoanticuerpos en la actividad biológica de IFN γ

La evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IFN γ sobre la actividad biológica de esta citocina, se determinó realizando la medición de niveles de citocinas en sobrenadantes de sangre completa, de donadores clínicamente sanos y de pacientes positivos a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ , previamente estimulada con PHA, PHA/IL-12, LPS o LPS/IFN γ . Así mismo, se analizó la función de dichos autoanticuerpos en la inhibición de la producción de IL-12 inducida por IFN γ en PBMCs de donadores clínicamente sanos, estimulando con LPS o LPS/IFN γ , en presencia o ausencia de muestras séricas positivas o negativas a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ . Por otra parte, se llevó a cabo un ensayo directo de la neutralización IFN γ recombinante en presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ , donde se incubó esta citocina recombinante con las muestras séricas positivas o negativas a

la presencia de autoanticuerpos contra IFN γ , para posteriormente determinar la concentración de IFN γ empleando la técnica de Luminex.

5.7.3.1. Niveles de citocinas en sangre completa activada

Los niveles de IFN γ e IL-12 se midieron en sobrenadantes de sangre completa previamente estimulada. Se emplearon cuatro muestras diferentes pacientes con niveles altos de autoanticuerpos anti-IFN γ , simultáneamente se incluyó como control negativo 15 muestras de individuos clínicamente sanos (negativos a la presencia de autoanticuerpos).

La sangre completa por analizar se diluyó 1:5 en medio RPMI en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning) y se activó por estimulación. Para medir la producción de IFN γ , la estimulación se realizó empleando fitohemaglutinina (PHA; 10 μ g/ml; Sigma-Aldrich) sola o en coestimulación con 20 μ g/ml de IL-12; mientras que para medir la producción de IL-12, se utilizó 1 μ g/ml de LPS solo o en combinación con 20,000 IU/ml de IFN γ .

Los sobrenadantes se colectaron posterior a una incubación de 24 hrs (a 37C, 5%CO $_2$ y 100% humedad). Los niveles de citocinas se midieron mediante el ensayo de arreglo de suspensión de microesferas, empleando un kit personalizado adquirido de R&D Systems, UK; y el lector luminex.

5.7.3.2. Ensayo de inhibición en la producción de IL-12 inducida por IFN γ empleando PBMCs

Para el ensayo de inhibición de la producción de IL-12 inducido por IFN γ se incubaron 1×10^5 PBMCs de un individuo clínicamente sano en 100 μ l de medio RPMI en presencia de 20% de muestra sérica de un control sano o de un paciente positivo a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ y se estimularon con (1 μ g/ml) de LPS solo o en coestimulación con IFN γ (2×10^4 IU/ml, Imukin, Boehringer Ingelheim). Los sobrenadantes se colectaron posterior a una incubación de 24 hrs (a 37C, 5%CO $_2$ y

100% humedad). Los niveles de IL-12 (pg/ml) se midieron mediante el ensayo de arreglo de suspensión de microesferas empleando un kit personalizado adquirido de R&D Systems, UK; y el lector luminex..

5.7.3.3. Ensayo directo de la neutralización IFN γ recombinante

La capacidad de los autoanticuerpos anti-IFN γ de neutralizar el IFN γ recombinante se confirmó incubando IFN γ (2×10^4 IU/ml, Imukin, Boehringer Ingelheim) en medio RPMI con 20% de muestra sérica de un control sano o de un paciente positivo a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ . La concentración de IFN γ (pg/ml) se midió mediante el ensayo de arreglo de suspensión de microesferas empleando un kit personalizado adquirido de R&D Systems, UK en el lector luminex.

5.7.4. Análisis de la función neutralizante de autoanticuerpos en la vía de señalización de citocinas (IL-12 e IL-6) empleando las líneas celulares HEK-Blue IL-12 y HEK-Blue IL-6

La evaluación de la función biológica inhibidora de los autoanticuerpos contra IL-12 se determinó midiendo la activación de la cascada de señalización de STAT-4, mediante el uso de las células HEK-Blue IL-12 estimuladas con la citocina rhIL-12 (R&D System, Cat # 892625). De la misma forma, la evaluación de la función neutralizante de autoanticuerpos contra IL-6 se determinó utilizando células HEK-Blue IL-6 estimuladas con la citocina rhIL-6 (Sigma, Cat # H7416) para medir la activación de la cascada de señalización de STAT-3.

5.7.4.1 Determinación de la concentración de rhIL-12 y rhIL-6 para estimular la línea celular HEK-Blue correspondiente

Para determinar la concentración trabajo de las citocinas que se utilizaron como estímulos de las células HEK-Blue IL-12 y HEK-Blue IL-6, en la realización de los ensayos de inhibición, se prepararon curvas estándar de respuesta empleando 12

diferentes concentraciones de cada citocina; para el caso de la rhIL-12 se trabajaron las concentraciones de 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 y 0.31 ng/ml, incluyendo también las condiciones sin estímulo (Medio de Prueba) y el control negativo de estímulo (rhTNF α a 20 ng/ml), mientras que para la curva estándar de respuesta a rhIL-6 se emplearon las concentraciones 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.097 y 0.048 ng/ml, de la misma forma se incluyeron las condiciones sin estímulo (Medio de Prueba) y el control negativo de estímulo (rhIL-4 a 3 ng/ml).

El ensayo se realizó utilizando placas de 96 pozos con fondo plano para cultivo celular (CytoOne Cat. # CC7682-7596), a las cuales se les agregó 20 μ l de cada una de las condiciones en los pozos correspondientes y 20 μ l de Medio de Prueba. Cada una de las condiciones se evaluó por triplicado. Una vez adicionados los volúmenes correspondientes a cada pozo, las placas se agitaron empleando un agitador orbital horizontal (Thermomixer comfort, Eppendorf, Núm. Cat. 22331), durante 3 minutos. Posteriormente, se agregaron 160 μ l/pozo de una suspensión celular HEK-Blue IL-12 o HEK-Blue IL-6 a una concentración de 3.2×10^5 células/ml (Aprox. 50,000 células/pozo) y se incubó por 24 hrs a 37 °C y 5% CO₂, para posteriormente realizar la colecta de los sobrenadantes.

Previo a la finalización del tiempo de incubación se prepararon 100 ml de la Solución Quanti-blue, utilizando 1 ml del reactivo QB y 1 ml de buffer QB en 98 ml de agua destilada. La solución Quanti-blue es estable por 2 semanas a 2-8 °C y 2 meses a -20 °C. Se mezcló utilizando vortex y se incubó por 10 min antes de su uso a 2 -8 °C.

Transcurridas las 24 hrs de incubación, a cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano (Thermo Scientific Nunc Cat. # 439454) se agregaron 180 μ l de la solución Quanti-blue. A continuación, se añadieron 20 μ l por pozo de los sobrenadantes correspondientes. Las placas se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 60 min, e inmediatamente se realizó la lectura de la densidad óptica (D.O.) a 620 nm.

La determinación de la concentración de citocina para estimular las líneas celulares HEK-Blue IL-12 o HEK-Blue IL-6 se realizó tomando en cuenta los valores promedio

de D.O. de cada una de las condiciones, eligiendo la concentración de citocina que estimuló a la línea celular con un porcentaje de respuesta alrededor del 50 %.

5.7.4.2 Ensayo de la función neutralizante de autoanticuerpos en la vía de señalización de IL-12 empleando la línea celular HEK-Blue IL-12

La evaluación de la función biológica de los autoanticuerpos contra IL-12 se llevó a cabo empleando una metodología similar a la determinación de la concentración de rhIL-12 para estimular de la línea celular HEK-Blue IL-12 (**punto 5.7.4.1**).

Empleando placas de 96 pozos con fondo plano para cultivo celular (CytoOne Cat. # CC7682-7596), las muestras séricas positivas o negativas a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-12 se diluyeron 1/10 con Medio de Prueba, para posteriormente utilizar 20 μ l de cada una de las muestras séricas diluidas o de Medio de Prueba, los cuales fueron pre-incubados con 20 μ l de una solución de rhIL-12 a una concentración de 20 ng/ml. Como control positivo del sistema de inhibición se empleó el anticuerpo monoclonal anti-IL-12 a una dilución 1/100. Cada una de estas condiciones se evaluó en ausencia de la citocina recombinante. Así mismo, de referencia se incluyó la curva estándar de respuesta a rhIL-12 empleando seis diferentes concentraciones (80, 40, 20, 10, 5, 2.5 ng/ml), las condiciones sin estímulo (Medio de Prueba) y el control negativo de estímulo (rhTNF α a 20 ng/ml). Una vez adicionados los volúmenes correspondientes a cada pozo, las placas se agitaron empleando un agitador orbital horizontal (Thermomixer comfort, Eppendorf, Núm. Cat. 22331), durante 3 minutos y después se incubaron en oscuridad y sin agitación durante 60 min a temperatura ambiente.

Posterior a la incubación, se agregaron 160 μ l/pozo de una suspensión celular HEK-Blue IL-12 a una concentración de 3.2×10^5 células/ml (Aprox. 50,000 células/pozo) y se incubó en oscuridad por 24 hrs a 37 °C y 5% CO₂, para la colecta de los sobrenadantes.

Previo a la finalización del tiempo de incubación se prepararon 100 ml de la Solución Quanti-blue, utilizando 1 ml del reactivo QB y 1 ml de buffer QB en 98 ml de agua destilada. La solución Quanti-blue es estable por 2 semanas a 2-8 °C y 2 meses a -20 °C. Se mezcló utilizando vortex y se incubó por 10 min antes de su uso a 2-8 °C.

Transcurridas las 24 hrs de incubación, a cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano (Thermo Scientific Nunc Cat. # 439454) se agregaron 180 µl de la solución Quanti-blue. A continuación, se añadieron 20 µl por pozo de los sobrenadantes correspondientes. Las placas se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 60 min, e inmediatamente se realizó la lectura de la D.O. a 620 nm.

Los valores de porcentaje de inhibición se calcularon utilizando los valores promedio de D.O. para cada una de las muestras y empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición: } 100 - (D.O. \text{ muestra} - D.O. \text{ Med.}) * \left(\frac{100}{D.O. \text{ rhIL} - 12 \text{ with Med.}} \right)$$

5.7.4.3 Ensayo de la función neutralizante de autoanticuerpos en la vía de señalización de IL-6 empleando la línea celular HEK-Blue IL-6

La evaluación de la función biológica de los autoanticuerpos contra IL-6 se llevó a cabo empleando una metodología similar a la realizada para el ensayo de la función neutralizante de autoanticuerpos en la vía de señalización de IL-12 (**punto 5.7.4.2**).

Brevemente, empleando placas de 96 pozos con fondo plano para cultivo celular (CytoOne Cat. # CC7682-7596), las muestras séricas positivas o negativas a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6 se diluyeron 1/10 con Medio de Prueba, para posteriormente utilizar 20 µl de cada una de las muestras séricas diluidas o de Medio de Prueba, los cuales fueron pre-incubados con 20 µl de una solución de rhIL-6 a una concentración de 0.75 ng/ml. Como control positivo del sistema de inhibición se empleó el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 a una dilución 1/100. Cada una de estas condiciones se evaluó en ausencia de la citocina recombinante. Así mismo, de referencia se incluyó la curva estándar de respuesta a rhIL-6 empleando seis diferentes concentraciones (3,

1.5, 0.75, 0.37, 0.19, 0.09 ng/ml), las condiciones sin estímulo (Medio de Prueba) y el control negativo de estímulo (rhIL-4 a 20 ng/ml). Una vez adicionados los volúmenes correspondientes a cada pozo, las placas se agitaron empleando un agitador orbital horizontal (Thermomixer comfort, Eppendorf, Núm. Cat. 22331), durante 3 minutos y después se incubaron en oscuridad y sin agitación durante 60 min a temperatura ambiente.

Posterior a la incubación, se agregaron 160 μ l/pozo de una suspensión celular HEK-Blue IL-6 a una concentración de 3.2×10^5 células/ml (Aprox. 50,000 células/pozo) y se incubó en oscuridad por 24 hrs a 37 °C y 5% CO₂, para la colecta de los sobrenadantes.

Transcurridas las 24 hrs de incubación, a cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano (Thermo Scientific Nunc Cat. # 439454) se agregaron 180 μ l de la solución Quanti-blue, preparada previamente. A continuación, se añadieron 20 μ l por pozo de los sobrenadantes correspondientes. Las placas se incubaron en oscuridad a 37 °C durante 60 min, e inmediatamente se realizó la lectura de la D.O. a 620 nm. Los valores de porcentaje de inhibición se calcularon utilizando los valores promedio de D.O. para cada una de las muestras, como se indicó anteriormente (**punto 5.7.4.2**).

5.8. Identificación de epítopes mediante microarreglos de péptidos

Para la determinación de epítopes reconocidos por los diferentes autoanticuerpos detectados, se emplearon microarreglos de péptidos sobrelapados en microchips generados por un método innovador llamado "*Combinatorial Synthesis of Peptide Arrays onto a Microchip*", la eficiencia y lo práctico de este método radica en la cantidad tan baja de muestra sérica y de péptidos necesarias para el análisis. Dicho servicio se solicitó a la compañía alemana "PEPperPRINT".

5.9. Síntesis y evaluación de epítopes reconocidos

Posterior a la identificación de los epítopes reconocidos para IL-6 se realizó la síntesis del péptido biotinilado correspondiente, posteriormente utilizando el sistema de estreptavidina-microesferas se evaluó el reconocimiento de los epítopes por los autoanticuerpos presentes en las muestras séricas, esto se realizó en forma mono-plex empleando la metodología para la evaluación de los sistemas acoplados (**punto 5.2.2**). Brevemente, en microplacas de 96 pozos, las microesferas acopladas con estreptavidina se incubaron con 50 μ l del péptido biotinilado sintetizado, durante una hora a 37 °C y en la oscuridad empleando un agitador orbital, se removió el líquido mediante sistema de vacío para proceder inmediatamente con una serie de lavados con 200 μ l de PBS-Tween 20. Después, se incubaron con las muestras que resultaron positivas a la presencia de autoanticuerpos anti-citocina, en las mismas condiciones que la primera incubación y se lavó la placa. Posteriormente se agregaron 50 μ l/pozo de una solución de anticuerpo Anti-IgG-Fc (especie específico) conjugado con PE y se incubó la microplaca durante 30 min con agitación constante a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados y se procedió a realizar el análisis en el dispositivo BioPlex.

5.10. Análisis estadístico

Las gráficas y el análisis estadístico se llevaron a cabo usando el programa informático GraphPad Prism versión 6.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, (<http://www.graphpad.com>).

La determinación de una posible relación entre la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y el desarrollo de diversas enfermedades 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).

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación del acoplamiento proteico, la integridad antigénica y la especificidad de algunos sistemas citocina-microesfera

Se realizó el acoplamiento de aquellos sistemas citocinas-microesfera que no se tenían disponibles, los cuales fueron evaluados de forma monoplex utilizando los anticuerpos biotinilados específicos para cada una de ellas. Cada sistema se evaluó por duplicado y se obtuvieron promedio de intensidad de fluorescencia (MFI, del inglés *Mean fluorescence intensity*) y las desviaciones estándar (SD) de cada uno de ellos. En la **Figura 1** se observan los valores MFI (\pm SD) obtenidos para cada uno de estos sistemas, donde se puede apreciar que dichos valores de MFI fueron mayores a 10,000, 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 y especificidad de los sistemas.

6.2. Determinación de las interferencias entre los diferentes sistemas de citocinas-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 (7plex, todos los sistemas simultáneamente). En la **Figura 2** se muestran los resultados de este análisis, confirmando la especificidad de los sistemas y donde es posible observar que no mostraron interferencias considerables, presentando valores de MFI muy similares cuando se analizaron en forma individual y en forma múltiple (7plex), es decir no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las lecturas de ambas formas (monoplex y multiplex), empleando la *t* student como prueba de hipótesis, $p < 0.05$.

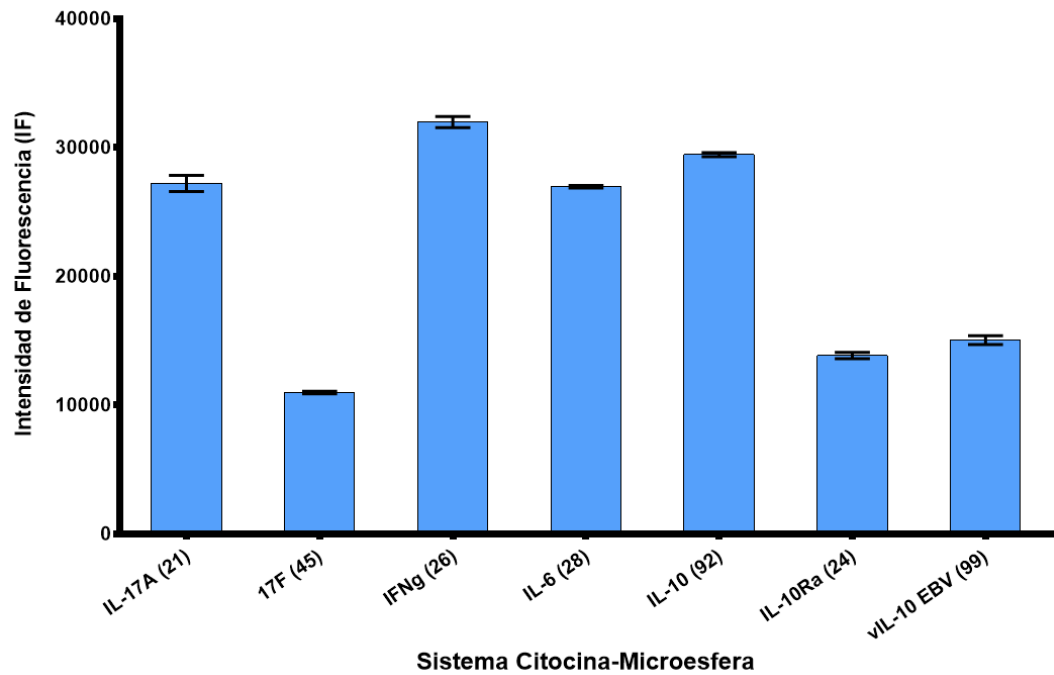


Figura 1. Evaluación de los sistemas de citocinas-microesferas acoplados. Valores de MFI obtenidos en los sistemas de acoplamiento de las citocinas a los diferentes grupos de microesferas, utilizando los anticuerpos monoclonales biotinilados específicos para cada citocina. Se muestra el valor promedio \pm SD de duplicados de la intensidad de fluorescencia obtenida para cada sistema de forma monoplex.

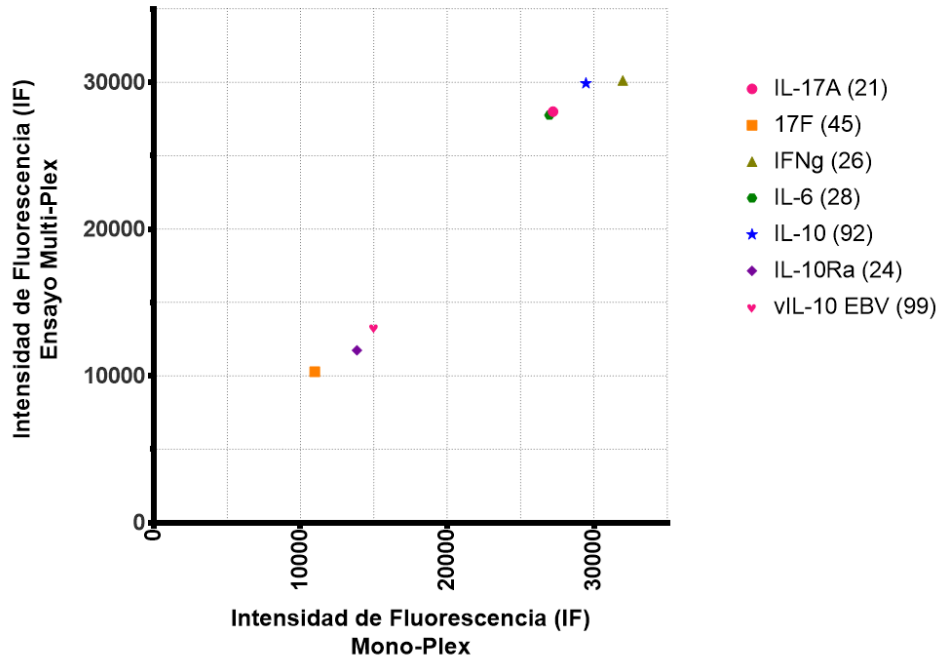


Figura 2. Determinación de las interferencias entre los diferentes sistemas citocinas acopladas a las microesferas. Los valores MFI de duplicados para cada sistema citocina-microesfera medidos en forma múltiple (7plex, eje Y) y monoplex (eje X), empleando los anticuerpos monoclonales biotinilados específicos 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. Colección de muestras séricas

Se analizaron un total de 420 muestras séricas humanas, de las cuales 334 corresponden a pacientes con distintos padecimientos y 86 a individuos clínicamente sanos (controles negativos). Las muestras se clasificaron de acuerdo con el tipo de enfermedad que presentaban los pacientes como se muestra en el **Tabla 2**.

De la colección de muestras séricas de felinos, se analizaron 141 muestras de las cuales 128 pertenecen a pacientes y 13 a individuos clínicamente sanos (controles negativos) (**Tabla 3**).

6.4. Análisis serológico de las muestras humanas

En forma general, los niveles de autoanticuerpos contra citocinas se reportan en valores MFI, los cuales se emplearon para todos los análisis realizados, considerando la evaluación por duplicado de cada una de las diferentes muestras. Los valores MFI de individuos clínicamente sanos se utilizaron para definir el valor de corte para todos los autoanticuerpos anti-citocinas, por lo tanto, el cálculo del valor de corte se hizo en función del promedio general de $MFI \pm 4SD$, estableciéndose un valor de corte generalizado de $MFI < 6400$, permitiendo definir como muestras negativas a todas aquellas que presentaron éstos valores de MFI; mientras que todas aquellas muestras séricas que obtuvieron valores $MFI \geq 6400$ fueron consideradas como positivas. Las microesferas de BSA (control negativo) se incluyeron en el análisis de los sueros de pacientes e individuos clínicamente sanos, encontrándose valores negativos (MFI de 6 a 1661) para todos ellos.

Los resultados del análisis para la identificación de las muestras séricas positivas a la presencia de autoanticuerpos contra citocinas mostraron que 167 de 300 (56%) sueros del grupo de pacientes resultaron positivos a autoanticuerpos contra al menos una citocina, considerando que presentaron valores $MFI \geq 6400$, mientras que en ninguna de las muestras séricas del grupo de individuos clínicamente sanos (controles negativos) se detectaron estos autoanticuerpos (**Figura 3**).

Enfermedad	Número de muestras
Enfermedades Autoinmunes	32
Enfermedades Infecciosas	269
Enfermedades Autoinmunes/Infecciosas	9
Otras Enfermedades	24
Subtotal	334
Controles negativos	
Individuos clínicamente sanos	86
Total de muestras analizadas	420

Tabla 2. Número de muestras séricas humanas analizadas, ordenadas por padecimiento en el grupo de pacientes, así como el grupo de individuos clínicamente sanos (controles negativos).

Enfermedad	Número de muestras
FELV (PCR positivo)	88
FIV (PCR positivo)	5
FELV/FIV (PCR negativo)	31
No diagnosticado	13
Subtotal	137
Controles negativos	
Individuos clínicamente sanos	4
Total de muestras analizadas	141

Tabla 3. Número de muestras séricas felinas analizadas, ordenadas por padecimiento en el grupo de pacientes, así como el grupo de individuos clínicamente sanos (controles negativos).

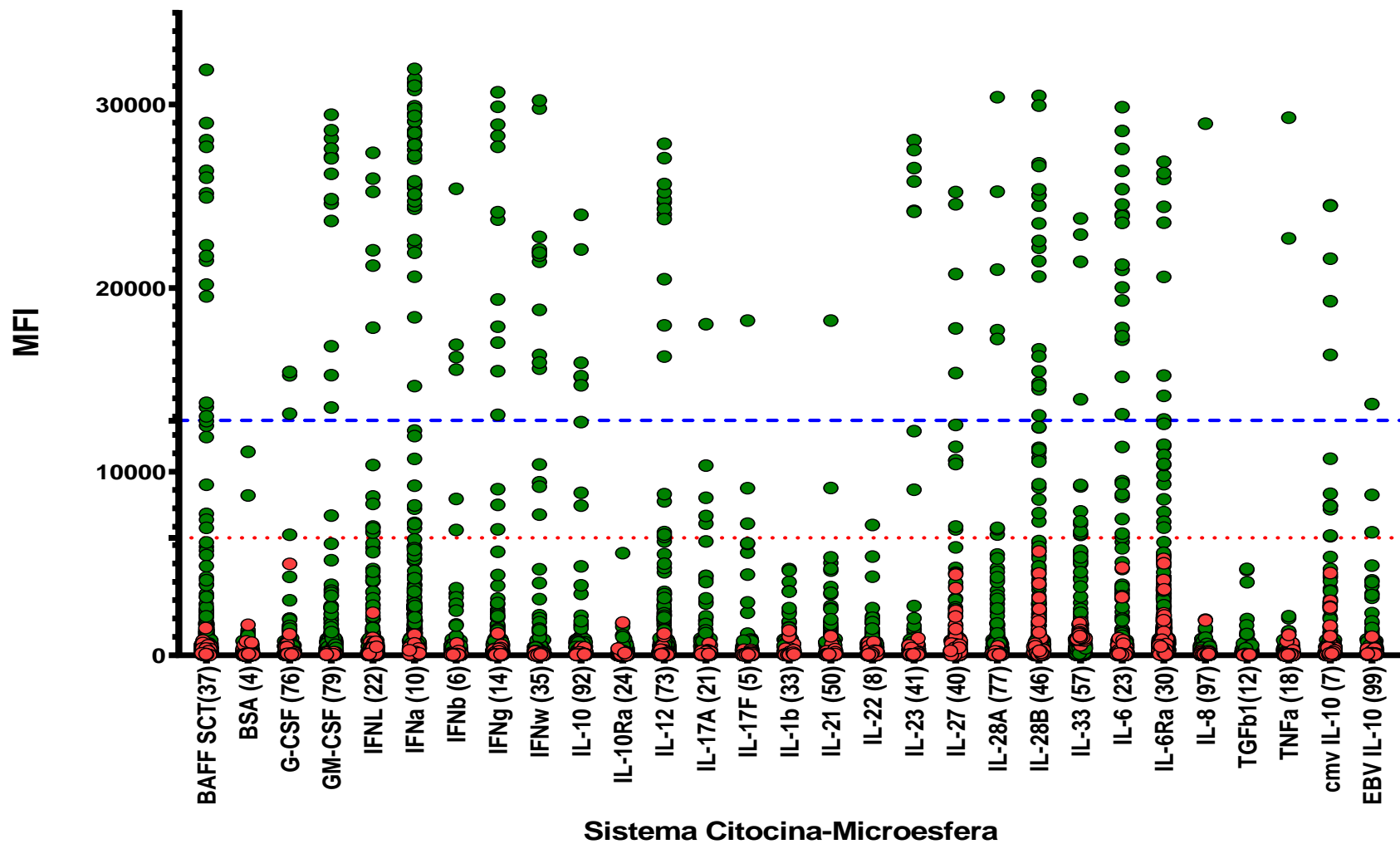


Figura 3. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas humanas mediante el sistema 37-plex citocina-microesfera. Se grafican los valores promedio de la MFI para los 37 sistemas. Se incluye el sistema de la BSA como control negativo. Donde (●) representa las muestras séricas de pacientes, y los (●) representan individuos clínicamente sanos (controles negativos).

Así mismo, se observó que en 123 de las 334 (41%) muestras de pacientes se detectaron valores de MFI considerables (≥ 12800) para la presencia de autoanticuerpos contra al menos una de 23 citocinas reconocidas por éstos ($IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\omega$, $IFN\gamma$, $IFN\lambda$, IL-28A, IL-28B, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-23, IL-6, IL-12, IL-33, $TNF\alpha$, BAFF, IL-10, vIL-10 de CMV y EBV, IL-8, IL-27, G-CSF, GM-CSF) y un receptor (IL-6Ra), lo cual indica altos niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en estas muestras.

De forma esquemática, en la **Figura 4** se muestran los mapas de calor (**Panel A:** Pacientes y **Panel B:** Individuos clínicamente sanos) de los resultados obtenidos a partir de la población humana de estudio, incluyendo las 23 citocinas y el receptor contra los cuales se detectaron autoanticuerpos en las muestras que presentaron valores de MFI ≥ 12800 . El programa *Multiple Experiment Viewer* (MEV 4_9_0®) reporta los valores MFI empleando una escala de colores, el gradiente de negro a azul representa los valores bajos (< 6400), de verde a naranja los valores intermedios ($\geq 6400 < 12800$) y de rojo los valores altos (≥ 12800). En el **Panel A** de esta Figura se observa que el grupo de pacientes presentó una diversidad en la detección de autoanticuerpos con alta reactividad hacia diferentes citocinas, siendo autoanticuerpos contra $IFN\alpha$, IL-28B, IL-6 y BAFF los que presentan mayor número de muestras positivas a ellos con valores MFI altos (≥ 12800), mientras que en el grupo de individuos clínicamente sanos no se observa la presencia de autoanticuerpos con reactividad hacia ninguna de las citocinas evaluadas, presentando valores bajos de MFI (MFI de 6 a 5654) (**Figura 4, Panel B**).

Para un análisis más detallado de los resultados, las muestras séricas correspondientes a los pacientes se clasificaron en cuatro grupos, aquellos que presentaban **Enfermedades Autoinmunes** (n=32), **Enfermedades Infecciosas** (n=269), **Enfermedades Autoinmunes/Infecciosas** (n=9) y **Otras Enfermedades** (n=24), como se mostró en la **Tabla 1**.

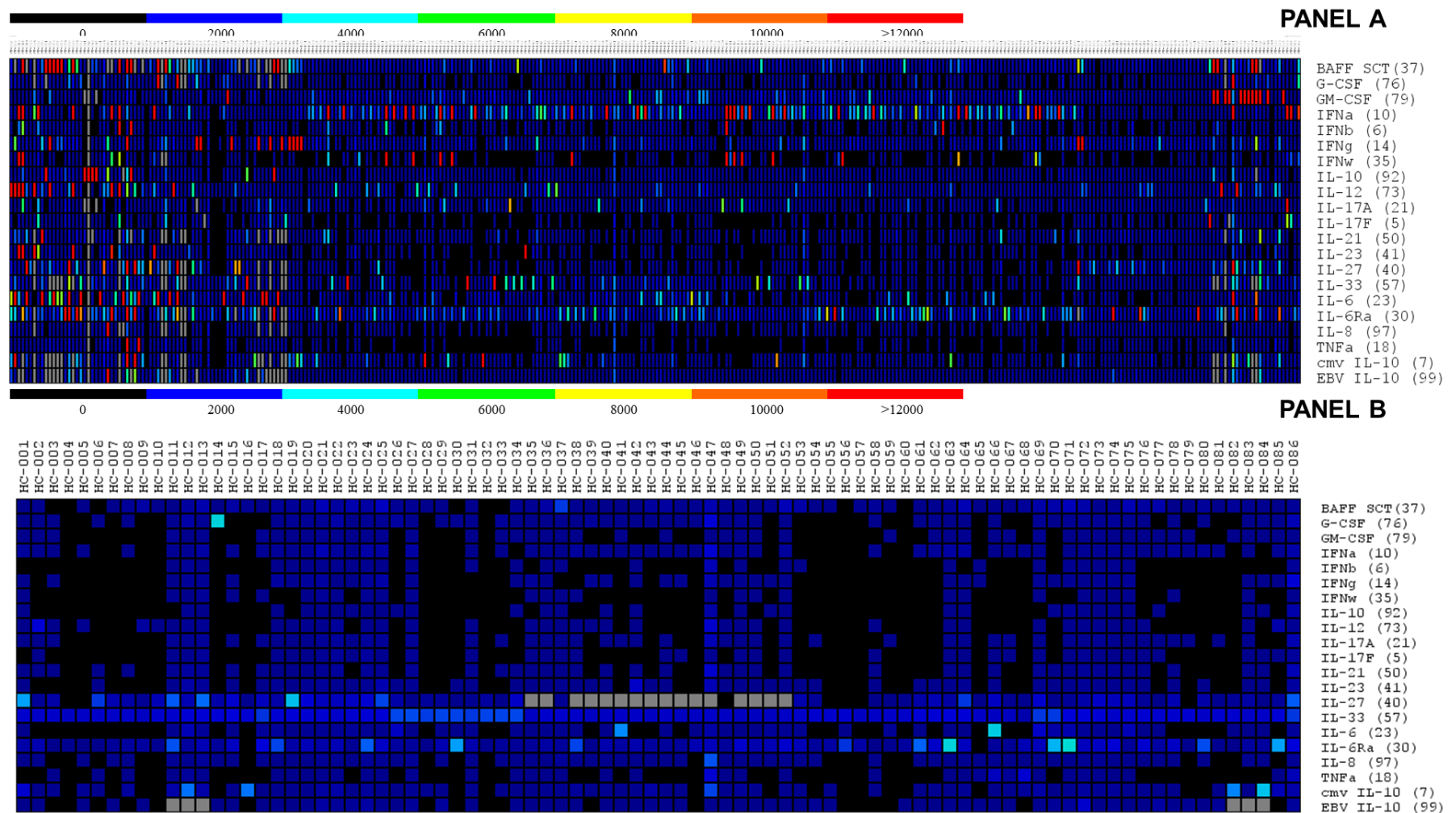


Figura 4. Mapa de calor de los valores de MFI de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras séricas humanas. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6400, los colores de verdes a naranjas valores >6400 pero <12800 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12800. **Panel A:** Sueros de pacientes, **Panel B:** Sueros de Individuos clínicamente sanos.

Tomando en cuenta la actividad de las citocinas que fueron reconocidas por autoanticuerpos, se decidió considerar la clasificación de éstas en IFNs, citocinas relacionadas a linfocitos Th17, citocinas proinflamatorias y otras citocinas.

En la **Figura 5** se reportan los resultados de la presencia de autoanticuerpos contra siete interferones de las 334 muestras séricas de pacientes humanos analizadas y de las 86 muestras correspondientes a los individuos clínicamente sanos, donde se puede observar que se detectaron valores altos de MFI (≥ 12800) para autoanticuerpos contra IFN α principalmente en pacientes del grupo de **Enfermedades Autoinmunes**. En el grupo de **Enfermedades Infecciosas** se detectaron autoanticuerpos contra IFN α , IFN ω e IFN γ . Así mismo, se detectaron autoanticuerpos contra IFN α en pacientes del grupo de **Otras enfermedades**.

Por otra parte, en el análisis de la presencia de autoanticuerpos contra cuatro citocinas producidas por los linfocitos Th17 o relacionadas a estas células, se observó que los autoanticuerpos contra la IL-23 fueron los que tuvieron mayores valores de MFI, principalmente en los grupos de pacientes con **Enfermedades Autoinmunes (Figura 6)**.

Así mismo, en la **Figura 7**, se muestran los resultados de autoanticuerpos contra citocinas proinflamatorias, en donde se observan niveles altos de autoanticuerpos (MFI ≥ 12800) contra IL-6 e IL-33 en pacientes con **Enfermedades Infecciosas**, contra IL-6, IL-6Ra, IL-12 y BAFF en pacientes con **Enfermedades Autoinmunes**; mientras que en el grupo de **Otras Enfermedades** se detectaron principalmente autoanticuerpos contra BAFF.

Por otro lado, analizando los autoanticuerpos contra otras citocinas (**Figura 8**) se detectaron altos niveles de MFI para la presencia de autoanticuerpos contra GM-CSF en pacientes principalmente del grupo de **Otras Enfermedades**, mientras en pacientes con **Enfermedades Autoinmunes** presentaron autoanticuerpos anti-IL-10.

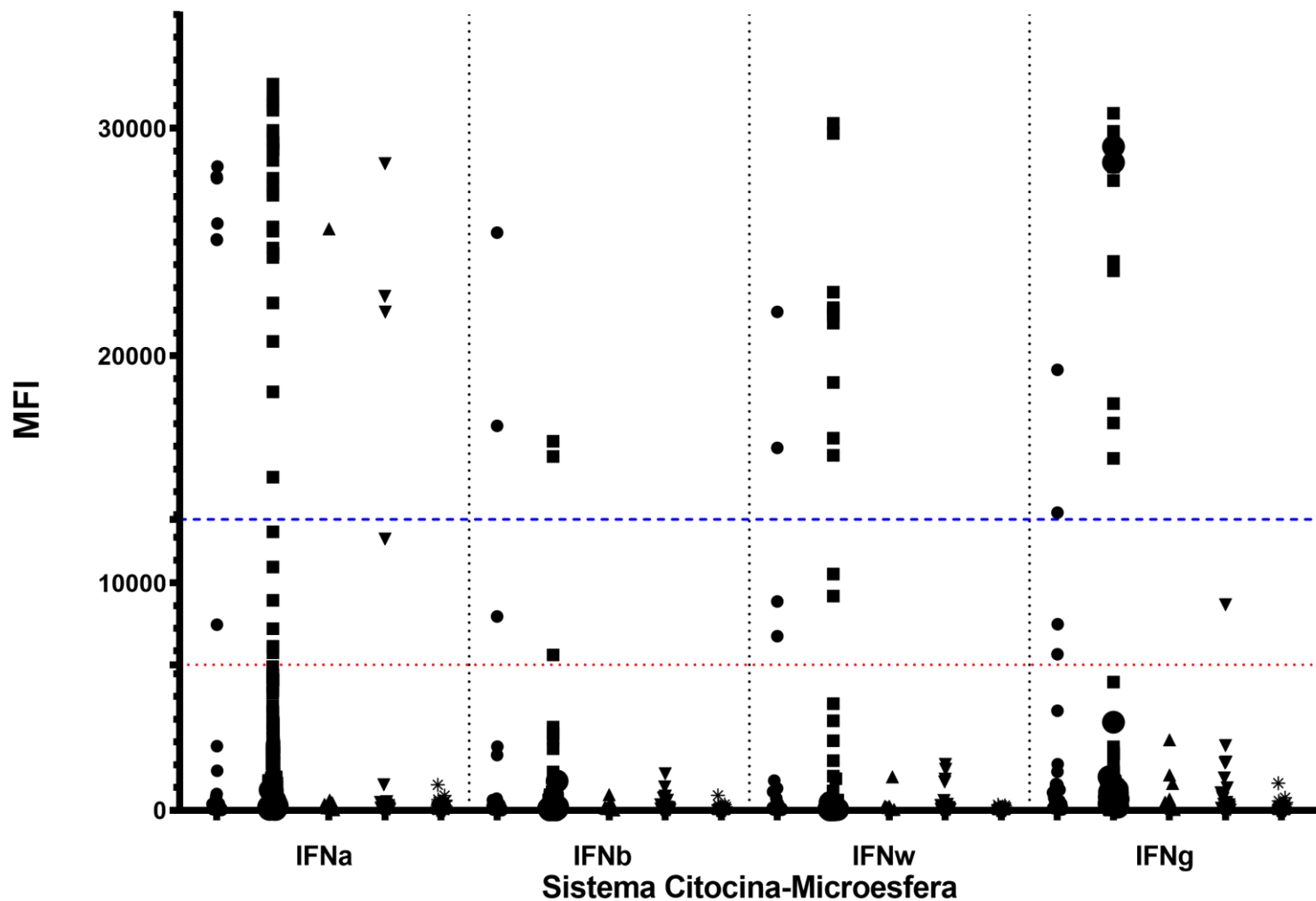


Figura 5. Patrón de autoanticuerpos contra interferones en pacientes e individuos clínicamente sanos. Valores de MFI de muestras séricas de humanos (n=420) analizadas. Considerando la enfermedad las muestras séricas de los pacientes fueron clasificadas en los grupos siguientes: ● Enfermedades Autoinmunes (n=32), ■ Enfermedades Infecciosas (n= 269), ▲ Enfermedades Autoinmunes/Infecciosas (n=9), ▼ Otras Enfermedades (n=24); se incluyen también * los Individuos Sanos (n=86).

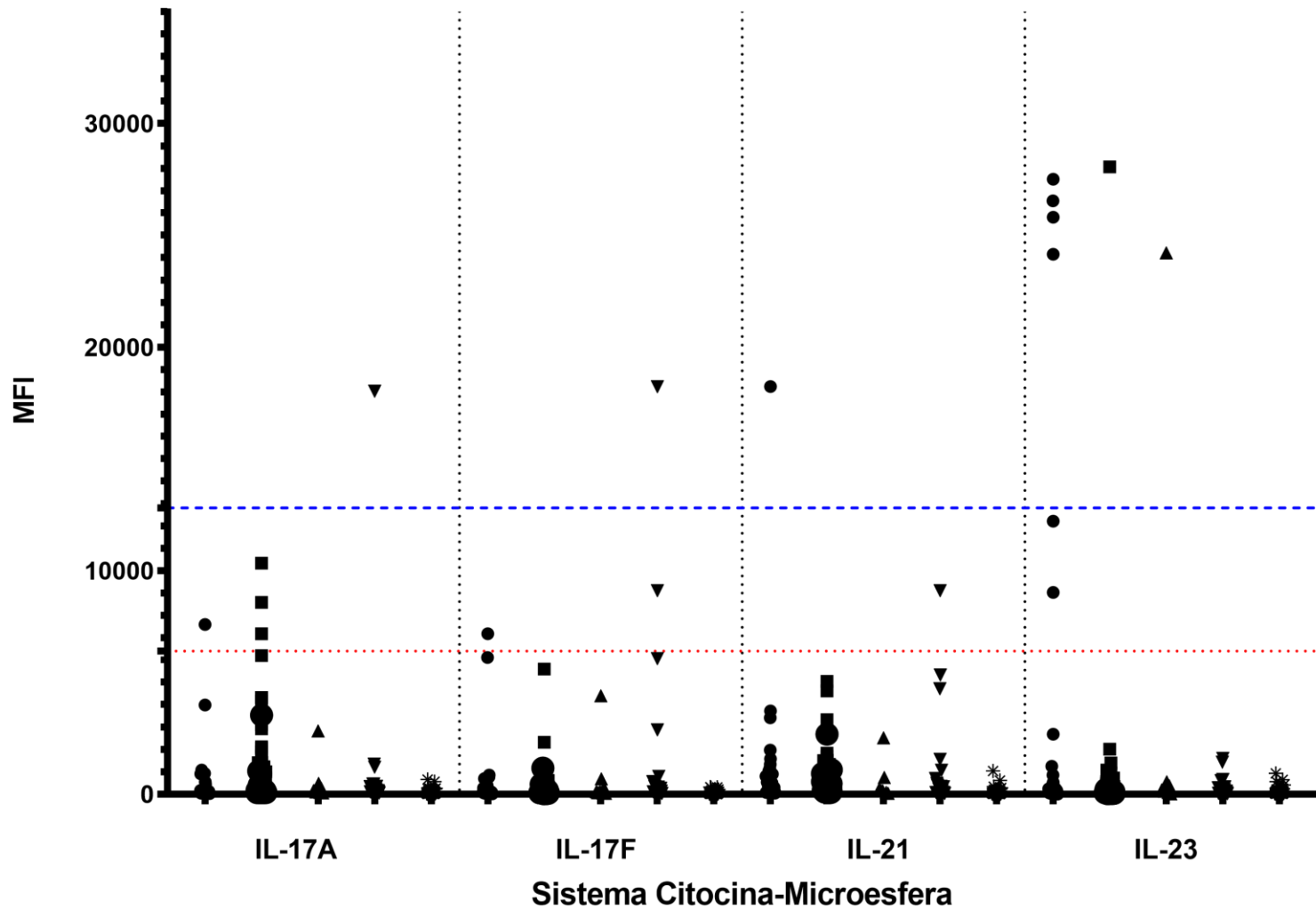


Figura 6. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas relacionadas a células TH17 en pacientes e individuos clínicamente sanos. Valores de MFI de muestras séricas de humanos (n=420) analizadas. Considerando la enfermedad las muestras séricas de los pacientes fueron clasificadas en los grupos siguientes: ● Enfermedades Autoinmunes (n=32), ■ Enfermedades Infecciosas (n= 269), ▲ Enfermedades Autoinmunes/Infecciosas (n=9), ▼ Otras Enfermedades (n=24); se incluyen también * los Individuos Sanos (n=86).

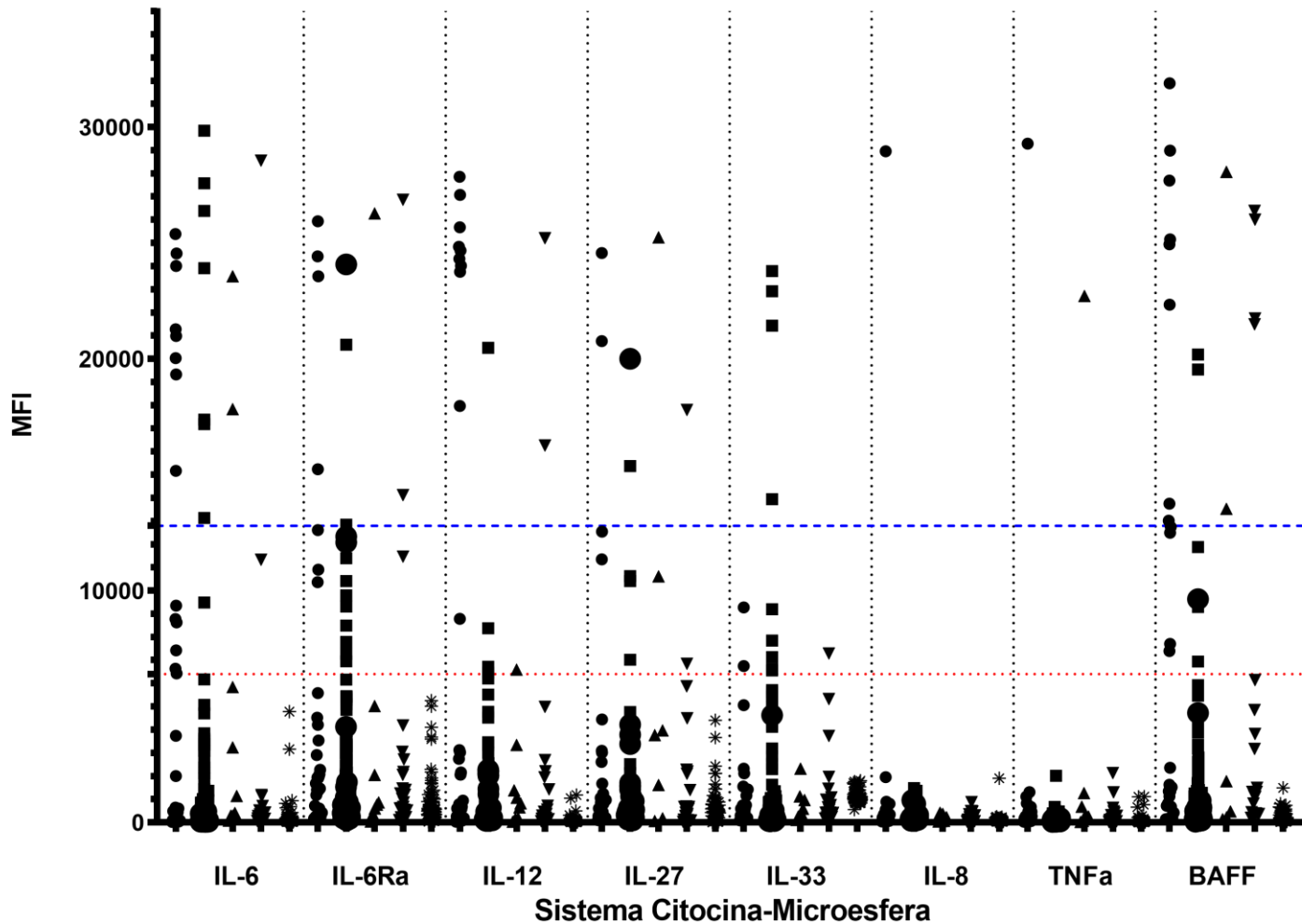


Figura 7. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas proinflamatorias en pacientes e individuos clínicamente sanos. Valores de MFI de muestras séricas de humanos (n=420) analizadas. Considerando la enfermedad las muestras séricas de los pacientes fueron clasificadas en los grupos siguientes: ● Enfermedades Autoinmunes (n=32), ■ Enfermedades Infecciosas (n= 269), ▲ Enfermedades Autoinmunes/Infecciosas (n=9), ▼ Otras Enfermedades (n=24); se incluyen también * los Individuos Sanos (n=86).

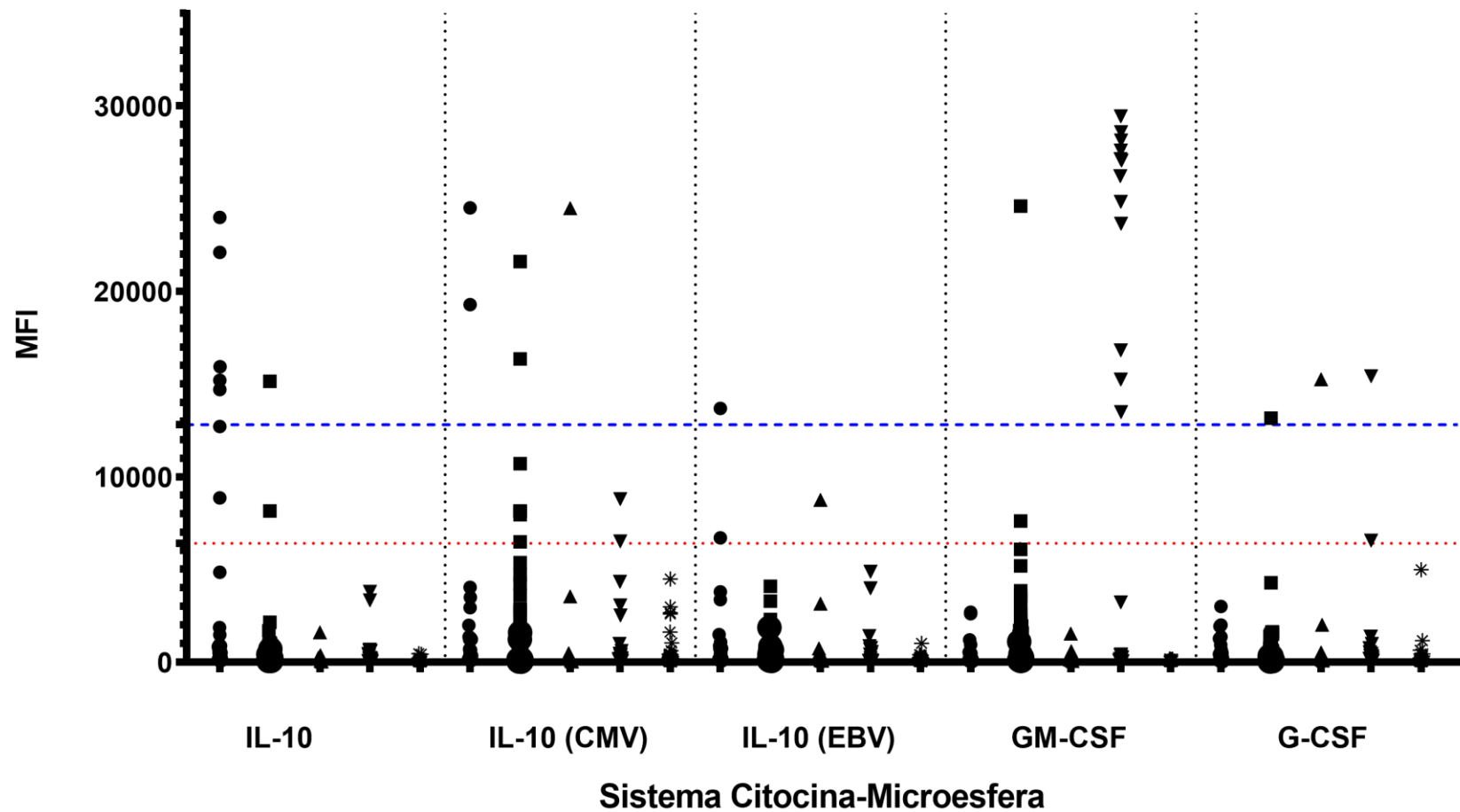


Figura 8. Patrón de autoanticuerpos contra otras citocinas en pacientes e individuos clínicamente sanos. Valores de MFI de muestras séricas de humanos (n=420) analizadas. Considerando la enfermedad las muestras séricas de los pacientes fueron clasificadas en los grupos siguientes: ● Enfermedades Autoinmunes (n=32), ■ Enfermedades Infecciosas (n= 269), ▲ Enfermedades Autoinmunes/Infecciosas (n=9), ▼ Otras Enfermedades (n=24); se incluyen también * los Individuos Sanos (n=86).

6.5. Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y su relación con los grupos de enfermedad en humanos

El análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y su relación con los grupos de enfermedad en humanos se realizó considerando únicamente los valores de MFI mayores 12800. Como se mencionó anteriormente, de acuerdo con el tipo de enfermedad que presentaban los pacientes las muestras séricas se clasificaron en cuatro grupos (**Enfermedades Autoinmunes**, **Enfermedades Infecciosas**, **Enfermedades Autoinmunes/Infecciosas** y **Otras Enfermedades**), así mismo cada grupo se dividió a su vez en distintos subgrupos en base al diagnóstico específico de cada paciente.

El análisis de estos datos se llevó a cabo de acuerdo al programa MEV, el cual realiza agrupaciones jerárquicas entre los autoanticuerpos anti-citocinas evaluadas y las muestras analizadas de acuerdo al grupo de enfermedad, definiendo una asociación entre la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y el tipo de enfermedad.

En la **Figura 9** se muestra la agrupación jerárquica en muestras de pacientes con **Enfermedades Autoinmunes**, dicha asociación permitió establecer cuatro patrones de reactividad diferentes. Donde el primer patrón de muestras séricas (recuadro naranja) presentó autoanticuerpos con una alta reactividad a IL-10 en cinco muestras, de las cuales dos presentaban enfermedad celiaca y dos enfermedad inflamatoria intestinal. El segundo patrón (recuadro verde) corresponde a autoanticuerpos contra IL-6 en pacientes con esclerosis múltiple. Así mismo, el tercer patrón (recuadro rosa) se presentó en cinco pacientes con Timoma en donde se observaron autoanticuerpos contra IL-12, IFN ω , IFN α e IL-23. Finalmente, en el cuarto patrón (recuadro azul) se detectaron autoanticuerpos anti-BAFF en pacientes con síndrome autoinflamatorio.

De igual forma, la agrupación jerárquica de pacientes con **Enfermedades Infecciosas** se presenta en la **Figura 10**, en donde se identificaron cinco patrones. En pacientes con COVID-19, se detectaron dos patrones de reactividad, el primero a IFN α (recuadro amarillo) y el segundo a autoanticuerpos contra IFN α e IFN ω (recuadro rosa). En cuanto al cuarto patrón (recuadro verde) se presentó una alta reactividad a anti-IFN γ en pacientes principalmente con infecciones micobacterianas y virales. De

igual modo, en pacientes con diferentes tipos de infecciones se observó un quinto patrón a autoanticuerpos contra IL-6 (recuadro naranja).

Por otra parte, en la agrupación jerárquica de pacientes con **Enfermedades Autoinmunes/Infecciosas (Figura 11)** no se observaron patrones de reactividad definidos.

Finalmente, la **Figura 12** muestra los resultados de la agrupación jerárquica de las muestras de pacientes con **Otras Enfermedades**, dicha agrupación permitió identificar un patrón de reactividad (recuadro verde) a autoanticuerpos anti-GM-CSF en pacientes con proteinosis alveolar pulmonar.

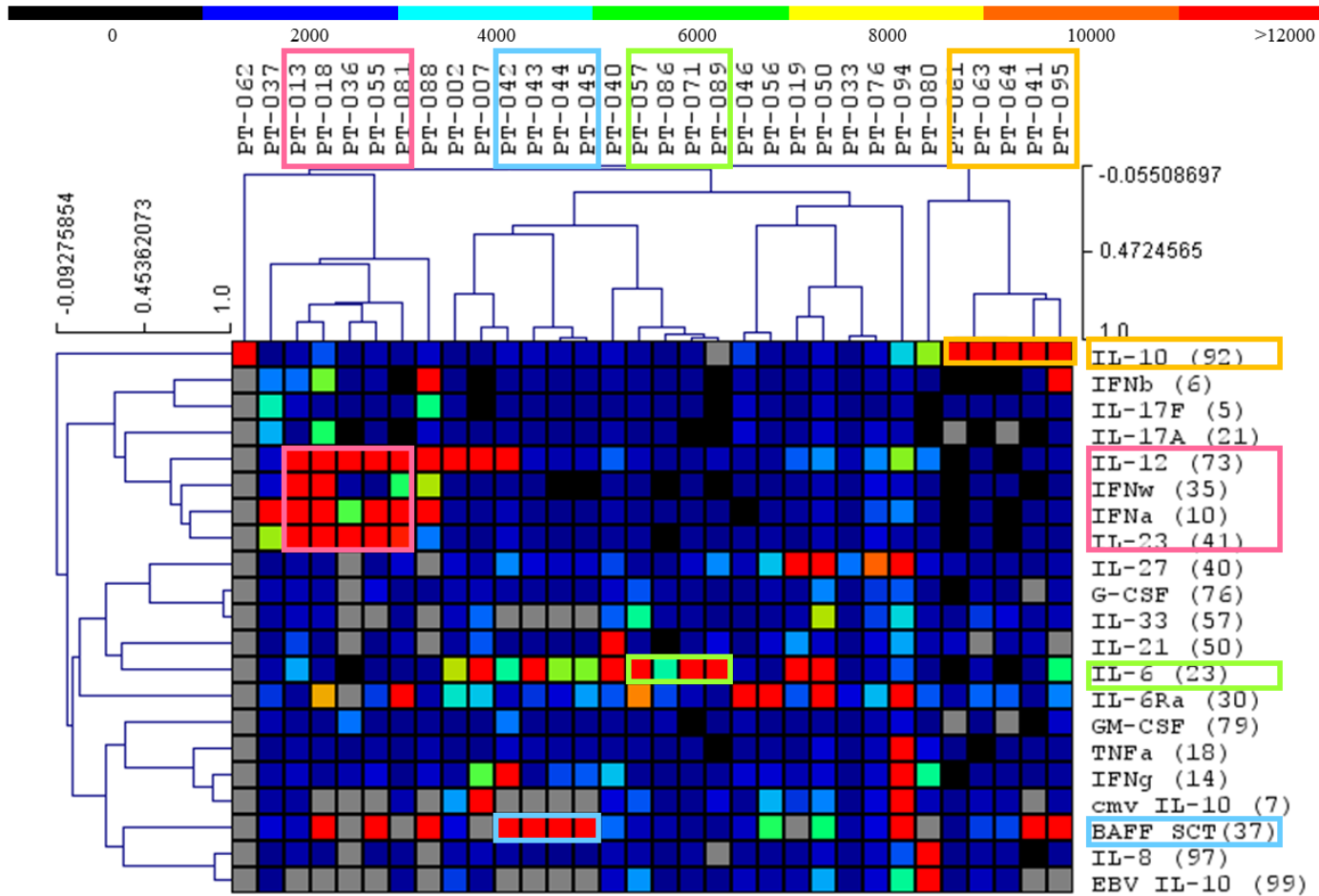


Figura 9. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6400, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6400 pero <12800 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12800, mientras que el gris representa valores no evaluados. Las asociaciones de autoanticuerpos con alta reactividad hacia citocinas en particular se muestran en recuadros de color: anti-IL-10 (recuadro naranja), anti-IL-6 (recuadro verde), anti-IFN ω , anti-IFN α , anti-IL-12, anti-IL-23 (recuadro rosa) y anti-BAFF (recuadro azul)

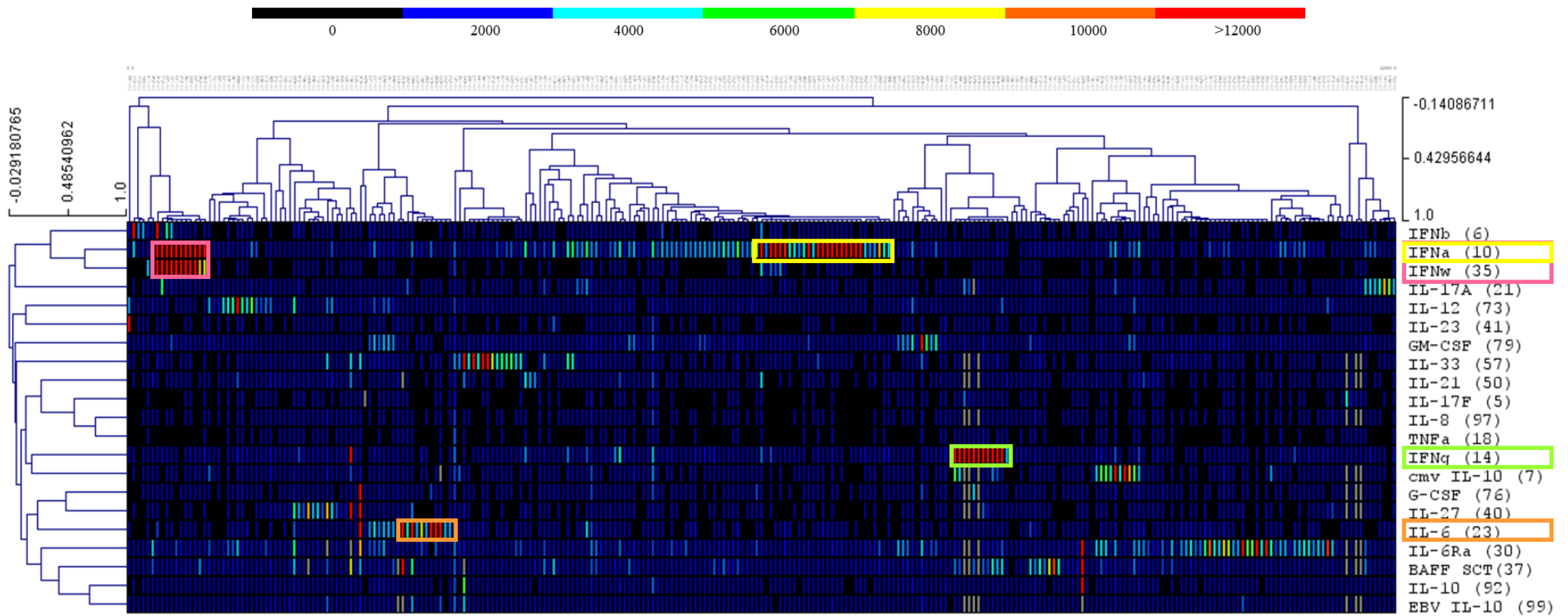


Figura 10. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6400, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6400 pero <12800 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12800, mientras que el gris representa valores no evaluados. Las asociaciones de autoanticuerpos con alta reactividad hacia citocinas en particular se muestran en recuadros de color: anti-IFN α (recuadro amarillo), anti-IFN α y anti-IFN ω (recuadro rosa), anti-IFN γ (recuadro verde), y anti-IL-6 (recuadro naranja).

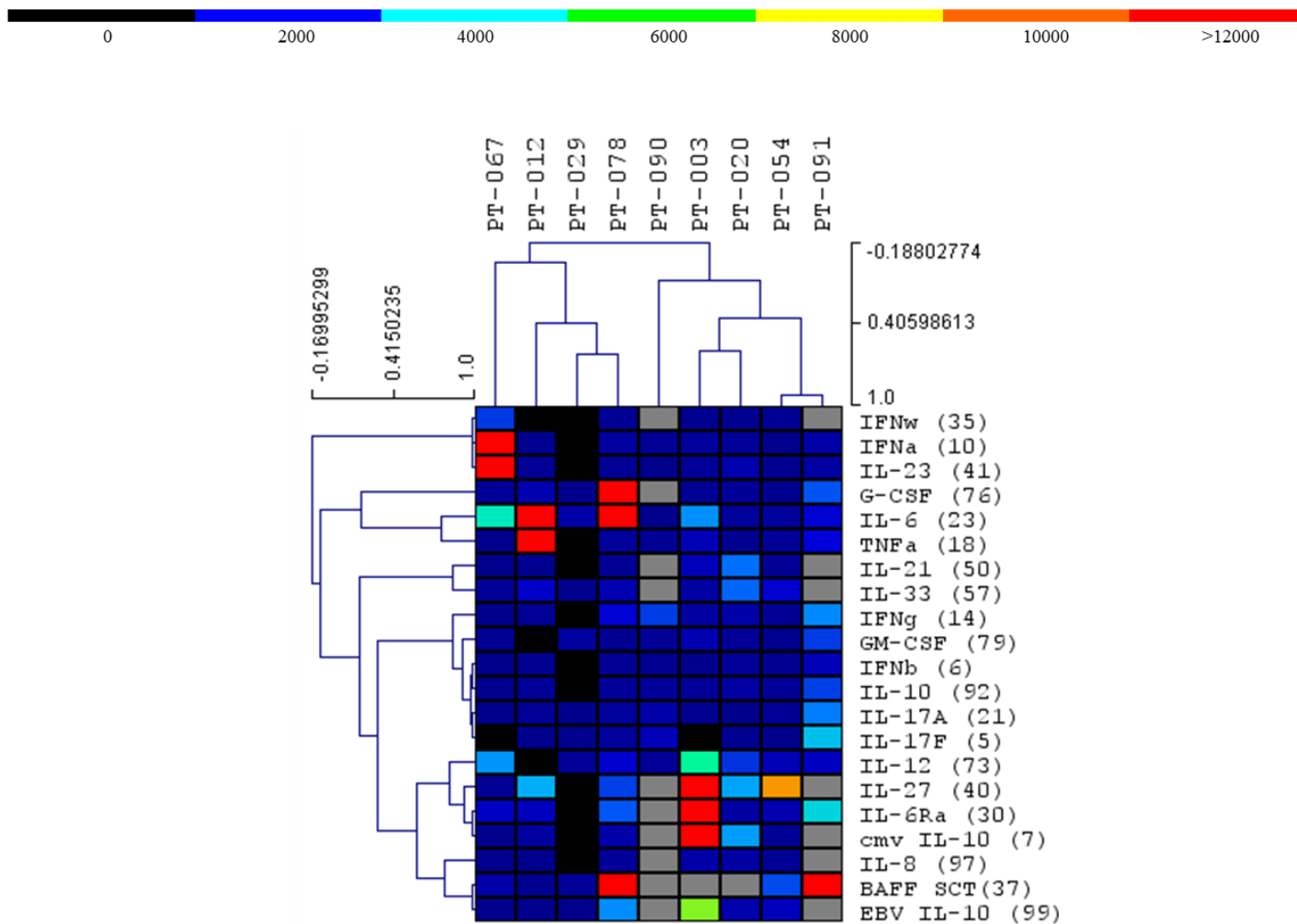


Figura 11. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6400, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6400 pero <12800 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12800, mientras que el gris representa valores no evaluados.

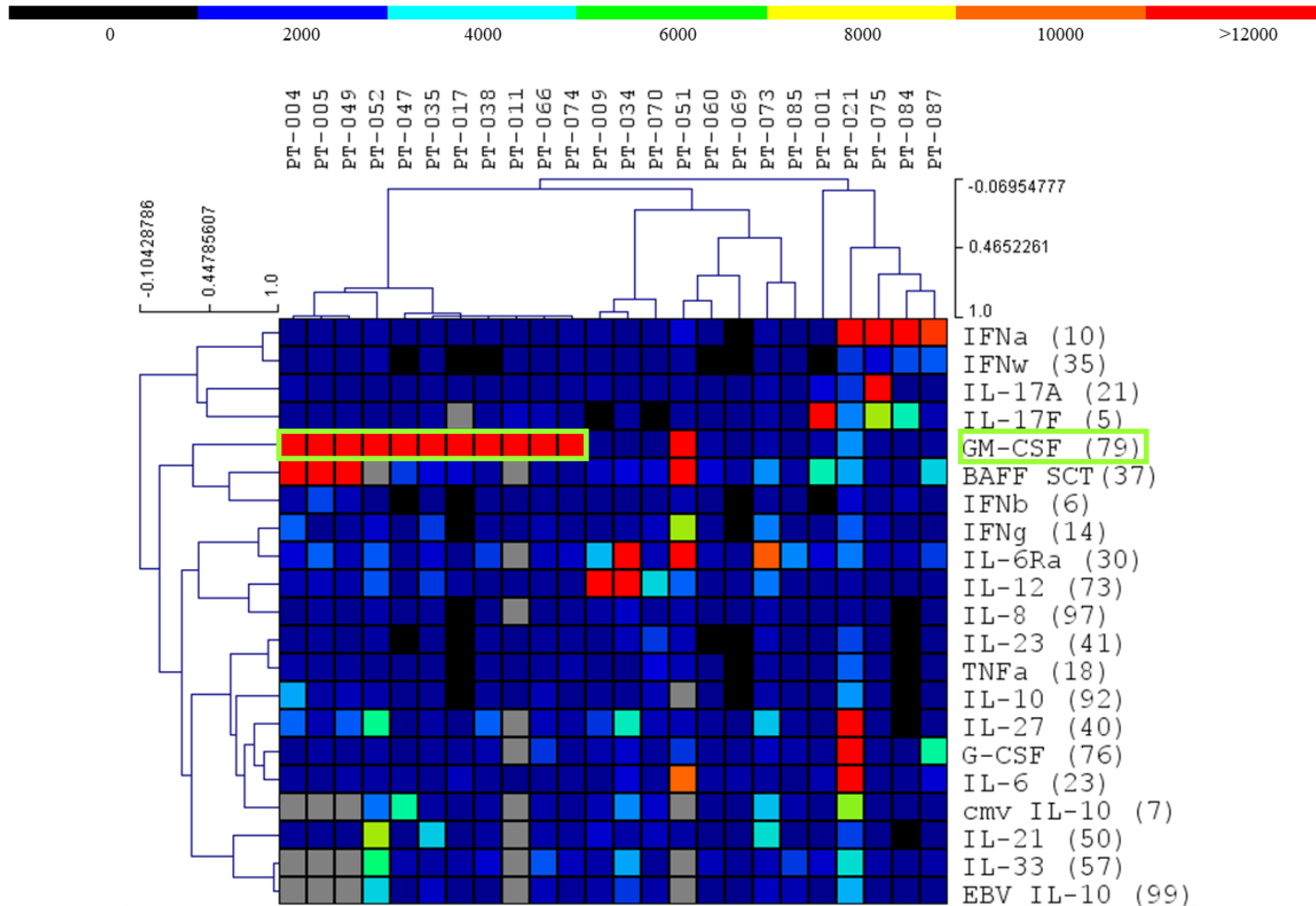


Figura 12. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6400, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6400 pero <12800 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12800, mientras que el gris representa valores no evaluados. La asociación de autoanticuerpos con alta reactividad hacia GM-CSF se muestran en el recuadro de color verde.

6.6. Análisis de la relación de la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ con el desarrollo del cuadro clínico de COVID-19.

También se realizó el análisis de la relación de la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ con el desarrollo del cuadro clínico de COVID-19, por lo que se compararon los niveles de estos autoanticuerpos en 130 muestras séricas humanas incluyendo cuatro muestras de pacientes con infecciones por micobacterias no tuberculosas (NTM) previamente detectados como positivos a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ , 56 individuos clínicamente sanos (HC), 31 pacientes asintomáticos (COV-Asx) y 39 de pacientes con cuadros clínicos correspondientes a COVID-19 (COV-Pat).

Para determinar si los autoanticuerpos anti-IFN γ estaban asociados al desarrollo del cuadro clínico de COVID-19, se evaluaron las muestras de los diferentes grupos para la detección de estos autoanticuerpos (**Figura 13**) observando un incremento mayor en los niveles de autoanticuerpos contra IFN γ en los pacientes COV-Asx y COV-Pat al compararse con los individuos HC, existiendo una diferencia estadísticamente significativa; así mismo, los valores de autoanticuerpos anti-IFN γ fueron menores a los presentados en el grupo de pacientes con NTM. Sin embargo, no hubo una diferencia significativa entre los grupos de pacientes COV-Asx y COV-Pat analizados.

6.7. Purificación de autoanticuerpos contra citocinas en humanos mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna

Se obtuvo la purificación de cuatro muestras séricas positivas a la presencia de autoanticuerpos contra IFN γ mediante cromatografía de afinidad. 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-IFN γ empleando el ensayo de Luminex e incluyendo el sistema de BSA-microesfera como control negativo.

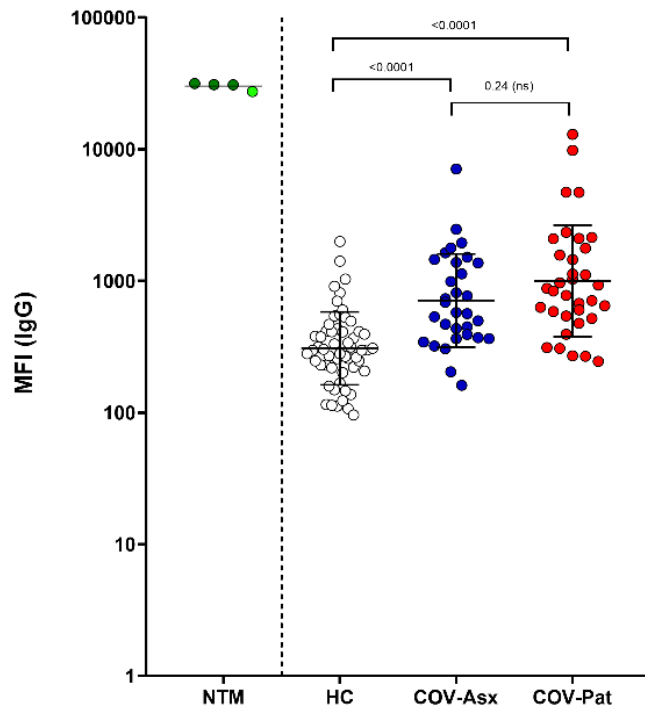


Figura 13. Niveles de autoanticuerpos anti-IFN γ . Niveles determinados en pacientes con infecciones por micobacterias no tuberculosas (NTM), Individuos clínicamente sanos (HC), Pacientes asintomáticos (COV-Asx) y pacientes con cuadros clínicos de COVID-19 (COV-Pat). Los valores de P se calcularon asumiendo una distribución no gaussiana mediante la prueba U de Mann-Whitney

En la **Figura 14** se observan los resultados de la purificación de autoanticuerpos contra IFN γ a partir de las muestras séricas con código R.S.-S54.46-47 (**Panel A**), S.M.-S52.49 (**Panel B**), H.V.P.-S49.21 (**Panel C**) y W.V.-S48.24 (**Panel D**) las cuales fueron positivas a la presencia de éstos con niveles altos; el lado izquierdo de los paneles de esta **Figura 14** corresponde a la Columna-IFN γ ; la primera barra muestra cada uno de los sueros originales ([S]) positivos con altos valores de MFI, y en la segunda barra indica las muestras séricas diluidas 1/2, denominadas suero pre-columna (S 1/2), observando niveles altos de autoanticuerpos. En la fracción E (suero post-columna) de esta misma Columna-IFN γ se observa una disminución de los valores de MFI, lo que indica un bajo nivel de autoanticuerpos contra IFN γ y de esta forma se demuestra que la mayoría de los autoanticuerpos específicos para IFN γ se unieron a esta citocina acoplada a la Columna-IFN γ . Por otra parte, en la Columna-BSA la fracción E (suero post-columna) resultó ser lo contrario, donde se obtuvo un valor alto de MFI, indicando que los autoanticuerpos anti-IFN γ no se están uniendo de forma inespecífica a una proteína ajena a 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-IFN γ dio un valor alto de MFI (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 MFI, los cuales se observan en todas las muestras. En cambio, los valores de MFI para todos los eluidos de la columna de BSA fueron negativos debido a que nunca ocurrió la unión antígeno-anticuerpos anti-IFN γ .

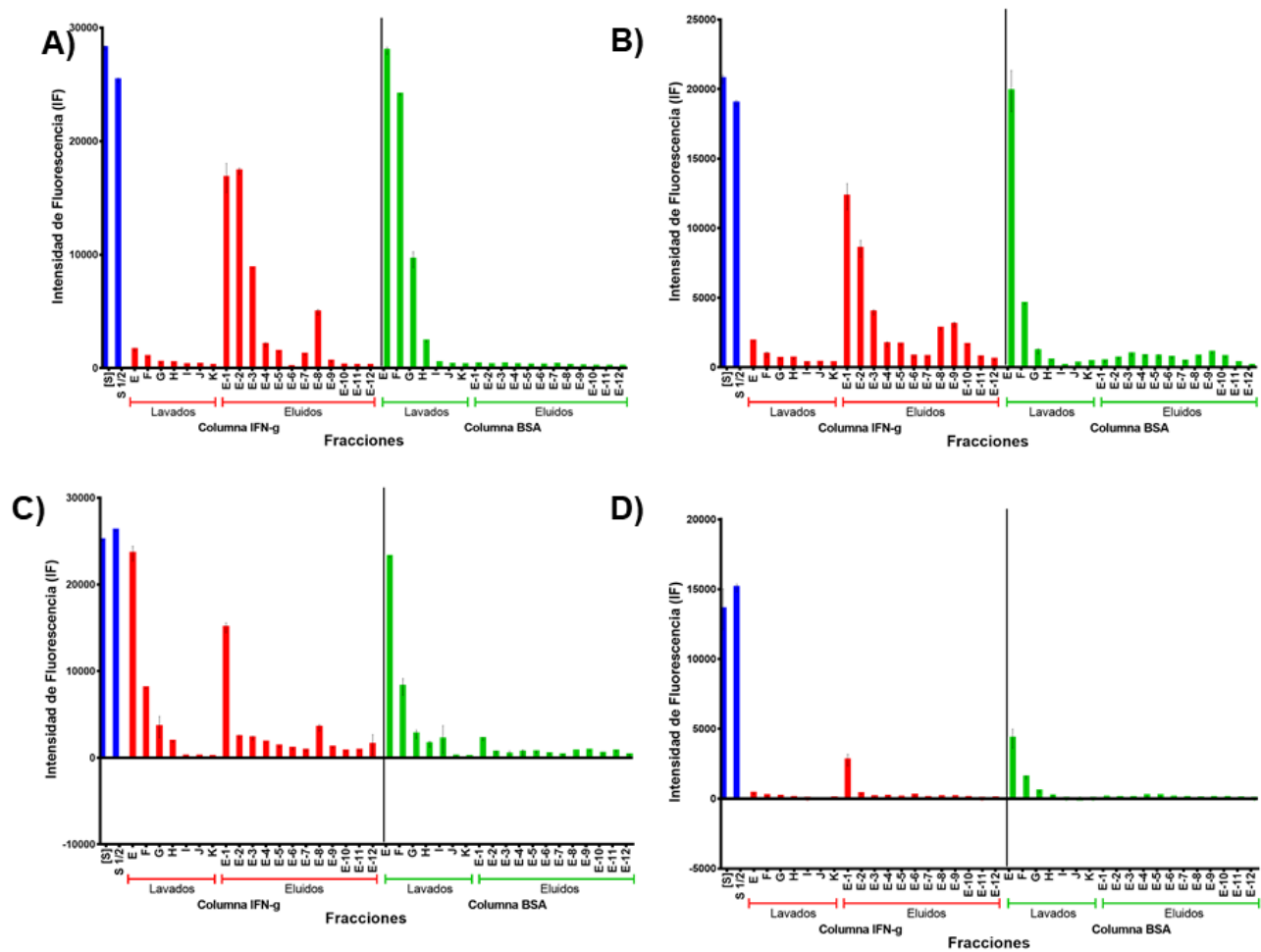


Figura 14. Purificación de autoanticuerpos anti-IFN γ de cuatro muestras séricas. Valores de MFI para las diferentes muestras séricas, fracciones de lavado y de elución, obtenidos por el ensayo Luminex. Panel A: Fracciones correspondientes al Suero R.S.-S54.46-47. Panel B: Fracciones correspondientes al Suero S.M.-S52.49. Panel C: Fracciones correspondientes al Suero H.V.P.-S49.21. Panel D: Fracciones correspondientes al Suero W.V.-S48.24. Todas las fracciones se trabajaron empleando una dilución de 1/100.

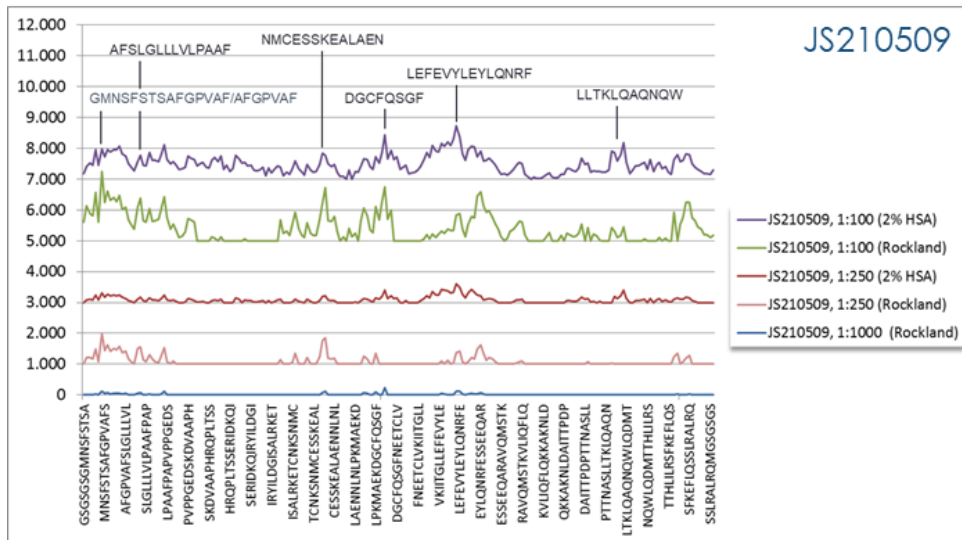
6.8. Identificación de epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6

El mapeo del epítopo reconocido por los autoanticuerpos anti-IL-6 se llevó a cabo en dos muestras séricas (JS210509 y RW120963) positivas a la presencia de estos autoanticuerpos, empleando microarreglos de péptidos sobrelapados que cubrían la secuencia completa de IL-6 humana.

Los resultados del escaneo de la muestra JS210509 (**Figura 15, Panel A**), mostraron varias interacciones débiles entre los autoanticuerpos presentes en la muestra y la secuencia lineal de la IL-6, identificándose tres señales de intensidad de fluorescencia considerables ¹⁴⁷LTKLQAQNQW¹⁵⁷, ⁹¹LEFEVYLEYQNR¹⁰⁵, ⁴⁷NMCESSKEALAEN⁶⁰; reflejándose en zonas poco definidas hacia diferentes arreglos de péptidos. Mientras que con la muestra RW120963 (**Figura 15, Panel B**), no se observaron interacciones claras y bien definidas, detectándose señales débiles de interacción hacia péptidos de la secuencia analizada.

Por otra parte, en estudios previos en el laboratorio, se realizó el escaneo de una muestra positiva a autoanticuerpos anti-IL-6 y se observó una reacción hacia dos péptidos distintivos, el primero ⁵⁵EALAENLN⁶³ con una elevada señal de intensidad, mientras que con el segundo ¹⁶RQPLTS²⁰ la señal fue menor. La integración de estos resultados con los obtenidos en el presente proyecto permitió definir tres secuencias de aminoácidos como posibles epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6: ¹⁶RQPLTS²⁰ (Epitope1), ⁵⁴EALAENLN⁶³ (Epitope2) y ¹⁷⁶LTKLQAQNQWLQDMT¹⁹¹ (Epitope3). El análisis *in silico* utilizó la base de datos GenBank y el Programa Mega 6.0®, para analizar, reconocer y comparar las secuencias identificadas en con el microarreglo peptídico (**Figura 16**), confirmando que los epítopes de interés están situados dentro de la secuencia de la IL-6 humana.

Panel A



Panel B

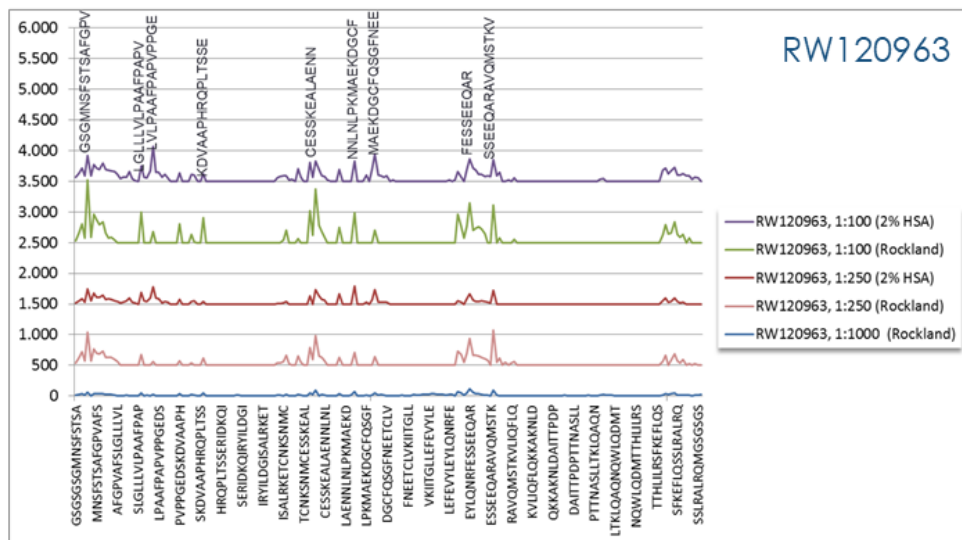


Figura 15. Mapeo de epítomos a partir de microarreglos peptídicos. Se presentan las intensidades de fluorescencia detectadas en los diferentes microarreglos de péptidos empleando dos muestras séricas humanas. **Panel A:** Muestra JS210509. **Panel B:** Muestra RW120963.

10	20	30	40	50
MNSFSTSAFG	PVAFSLGLLL	VLPAAFPAPV	PPGEDSKDVA	APH RQPLTSS
60	70	80	90	100
ERIDKQIRYI	LDGISALRKE	TCNKSNMCES	SK EALAENNL	NLPKMAEKDG
110	120	130	140	150
CFQSGFNEET	CLVKIITGLL	EFEVYLEYLQ	NRFESSEEQA	RAVQMSTKVL
160	170	180	190	200
IQFLQKKAKN	LDAITTPDPT	TNASL	LTKLQ AONQWLQDMT	THLILRSFKE
210				
FLQSSLRALR	QM			

Figura 16. Localización de los epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6. Se muestran las secuencias de aminoácidos correspondientes al Epitope1 (recuadro azul), Epitope2 (recuadro rojo) y Epitope3 (recuadro amarillo), reconocidas por autoanticuerpos anti-IL-6.

Así mismo, empleando el programa Mega 6.0®, se determinó si las secuencias de aminoácidos (aa) de la IL-6 están conservadas entre diferentes especies (humana, felina y canina). El análisis del Epitope1, mostró una homología del 67 al 100% (**Figura 17, Panel A**). Con relación al Epitope2, la homología presentada entre las secuencias fue de 100%, siendo la secuencia mayormente conservada (**Figura 17, Panel B**). Por último, la secuencia menos conservada se observó en el análisis de Epitope3, en donde la homología observada estaba en el rango del 27 a 100% (**Figura 17, Panel C**).

Adicionalmente, se construyó el modelaje molecular entre la estructura de la IL-6, el IL-6Ra y la subunidad gp130, para determinar la posible interacción de los epitopes reconocidos por los autoanticuerpos anti-IL-6, y poder especular el efecto en la vía de señalización de la citocina, empleando la herramienta SWISS-MODEL para la elaboración de la proyección 3D y el programa PyMOL para identificar las interacciones.

En la **Figura 18**, se muestra la imagen de la estructura 3D de la interacción entre IL-6 (estructura azul), IL-6Ra (estructura gris) y gp130 (estructura amarilla). Así mismo, en color rojo se muestra la secuencia de Epitope2, la cual presenta interacción con la subunidad beta del receptor de IL-6, siendo este complejo el primer evento en la activación de la vía de señalización de IL-6.

Así mismo, se puede observar que la secuencia del Epitope1 (secuencia morada), está ubicada en el extremo N-terminal, mientras que el Epitope3 (secuencia verde) se localiza cerca del extremo C-terminal, sin embargo, no se observó interacción con las secuencias de las subunidades del receptor.

Por otra parte, empleando el programa MEGA 6.0® se determinó si las secuencias de los epítomos reconocidos por los autoanticuepos contra IL-6 eran compartidas con proteínas de diversos microorganismos. En la **Figura 19**, se muestran los resultados de la alineación múltiple para Epitope2 en dónde se observó una homología mayor del 70% con secuencias de bacterias del género *Staphylococcus*. Mientras que, en el análisis del Epitope1 y Epitope3, no se identificaron residuos conservados en secuencias de microorganismos.

Panel A

Especie	Porcentaje de Homología
<i>Homo sapiens</i>	100%
<i>Felis catus</i>	83%
<i>Canis lupus</i>	67%

Species/Abbrv	Δ					*			
1. Epitope1 IL-6		-	R	Q	P	L	T	S	-
2. ref NP_001358025.1 : Homo sapiens		H	R	Q	P	L	T	S	S
3. ref NP_001009211.2 Felis catus		N	R	L	P	L	T	S	A
4. ref NP_001003301.1 Canis lupus familiaris		N	S	L	P	L	T	S	A

Panel B

Especie	Porcentaje de Homología
<i>Homo sapiens</i>	100%
<i>Felis catus</i>	100%
<i>Canis lupus</i>	100%

Species/Abbrv	Δ				*	*	*	*	*				
1. Epitope2 IL-6		-	E	A	L	A	E	N	N	L	N	-	-
2. ref NP_001358025.1 : Homo sapiens		K	E	A	L	A	E	N	N	L	N	L	P
3. ref NP_001009211.2 Felis catus		K	E	A	L	A	E	N	N	L	N	L	P
4. ref NP_001003301.1 Canis lupus familiaris		K	E	A	L	A	E	N	N	L	H	L	P

Panel C

Especie	Porcentaje de Homología
<i>Homo sapiens</i>	100%
<i>Felis catus</i>	47%
<i>Canis lupus</i>	27%

Species/Abbrv	Δ																
1. Epitope3 IL-6		-	L	T	K	L	Q	A	Q	N	Q	W	L	Q	D	M	T
2. ref NP_001358025.1 : Homo sapiens		L	L	T	K	L	Q	A	Q	N	Q	W	L	Q	D	M	T
3. ref NP_001009211.2 Felis catus		L	Q	A	K	L	Q	S	Q	E	E	W	L	R	H	T	
4. ref NP_001003301.1 Canis lupus familiaris		L	Q	A	I	L	Q	S	Q	D	E	C	V	K	H	T	

Figura 17. Homología entre las secuencias de IL-6 de diferentes especies con los epítomos identificados. Se muestran las alineaciones de las secuencias de IL-6 de cinco diferentes especies y los epítomos reconocidos por los autoanticuerpos contra IL-6. **Panel A:** Epitope1. **Panel B:** Epitope2 y **Panel C:** Epitope3. Los residuos conservados entre las secuencias están representados en cajas de colores.

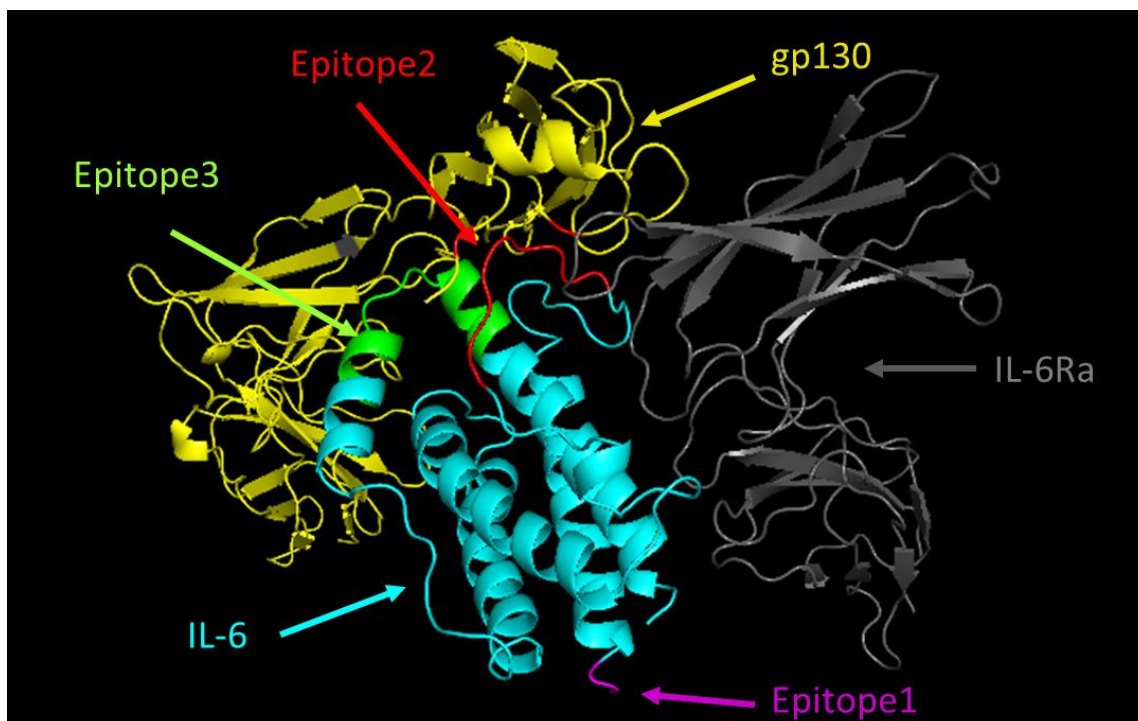


Figura 18. Modelaje molecular entre la estructura de la IL-6, el IL-6Ra y de gp130. Se muestra la interacción entre la IL-6 (estructura azul), IL-6Ra (estructura gris) y gp130 (estructura amarilla) generada con el programa PyMOL. Los epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6 se representan en diferente color: Epitope1 (secuencia morada), Epitope2 (secuencia roja) y Epitope3 (secuencia verde).

Microorganismo	Porcentaje de Homología
<i>Staphylococcus sp.</i>	89%
<i>Staphylococcus aureus</i>	78%

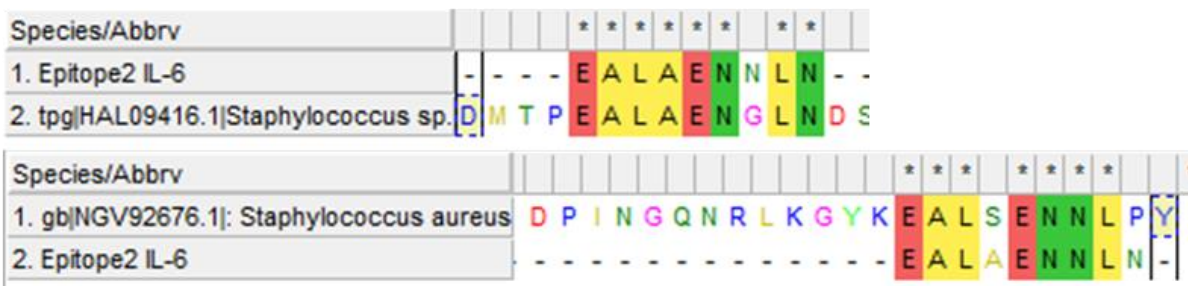


Figura 19. Homología entre la secuencia de Epitope2 reconocido por autoanticuerpos anti-IL-6 y las secuencias de aa correspondientes a *Staphylococcus sp.* Se muestran las alineaciones de la secuencia de Epitope2 y las secuencias HAL09416 y NGV92676 de *Staphylococcus sp.* Los residuos conservados entre las secuencias están representados en cajas de colores.

6.9. Evaluación de epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6

Posterior a la identificación de los epítopes reconocidos, se realizó la síntesis de los péptidos biotinilados correspondientes y se evaluó su reconocimiento en 31 muestras séricas positivas a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6. Los resultados de este análisis se reportan en la **Figura 20**, observando valores considerables de MFI con dos de los tres péptidos evaluados.

Para un análisis más detallado de los resultados, las muestras séricas se clasificaron en dos grupos; pacientes con **Enfermedades Autoinmunes** (n=17) y pacientes con **Enfermedades Infecciosas** (n=19).

En la **Figura 21** se reportan los resultados del reconocimiento de los péptidos del grupo de **Enfermedades Autoinmunes**, dónde se puede observar que se detectaron valores considerables de MFI para autoanticuerpos contra los péptidos que constituyen al Epitope1 y al Epitope2.

Por otra parte, en el grupo de **Enfermedades Infecciosas**, se observó poco reconocimiento hacia los péptidos evaluados, con excepción de dos muestras en las cuales se detectó la presencia de autoanticuerpos contra Epitope1 (**Figura 22**).

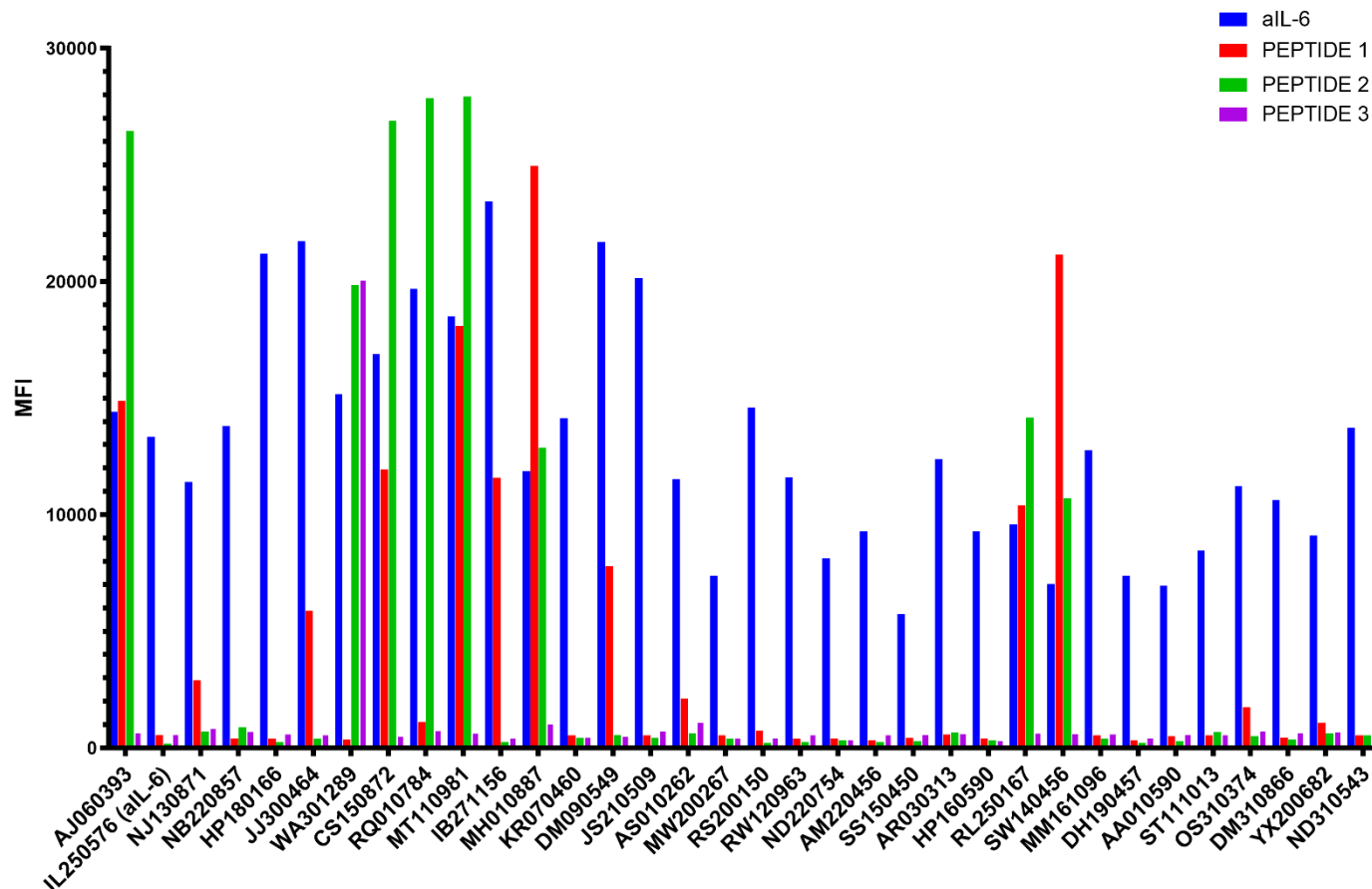


Figura 20. Evaluación del reconocimiento de los epítomos determinados. Se grafican los valores de MFI para los tres epítomos evaluados en 36 muestras séricas positivas a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6. Los epítomos se representan en barras de color: Epitope1 (barra roja), Epitope2 (barra verde), Epitope3 (barra morada). Se incluye el valor de MFI presentado para anti-IL-6 (barra azul).

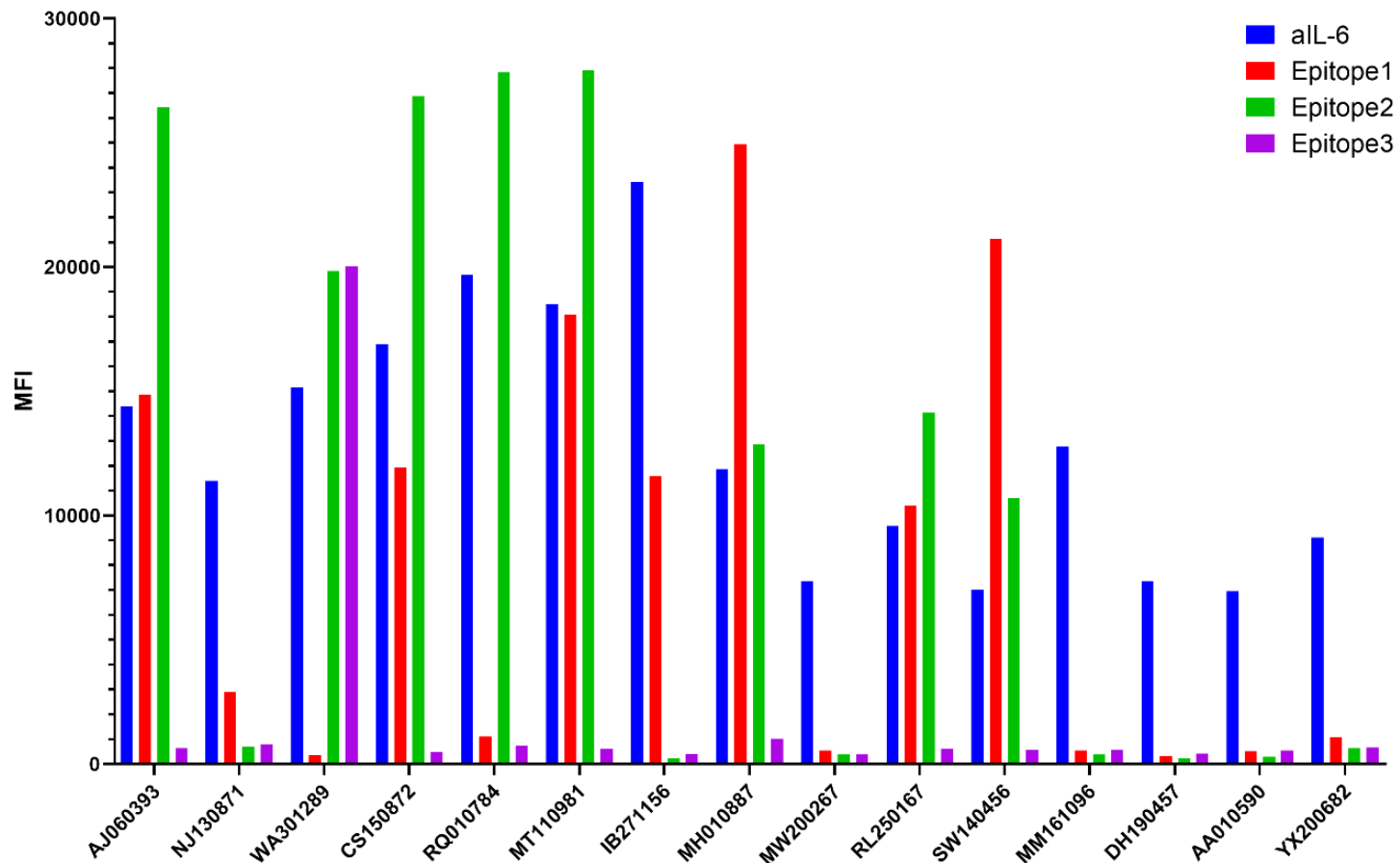


Figura 21. Evaluación del reconocimiento de los epítomos en pacientes con Enfermedades Autoinmunes. Se grafican los valores de MFI para los tres epítomos evaluados en muestras séricas del grupo de **Enfermedades Autoinmunes** (n=17). Los epítomos se representan en barras de color: Epitope1 (barra roja), Epitope2 (barra verde), Epitope3 (barra morada). Se incluye el valor de MFI presentado para anti-IL-6 (barra azul).

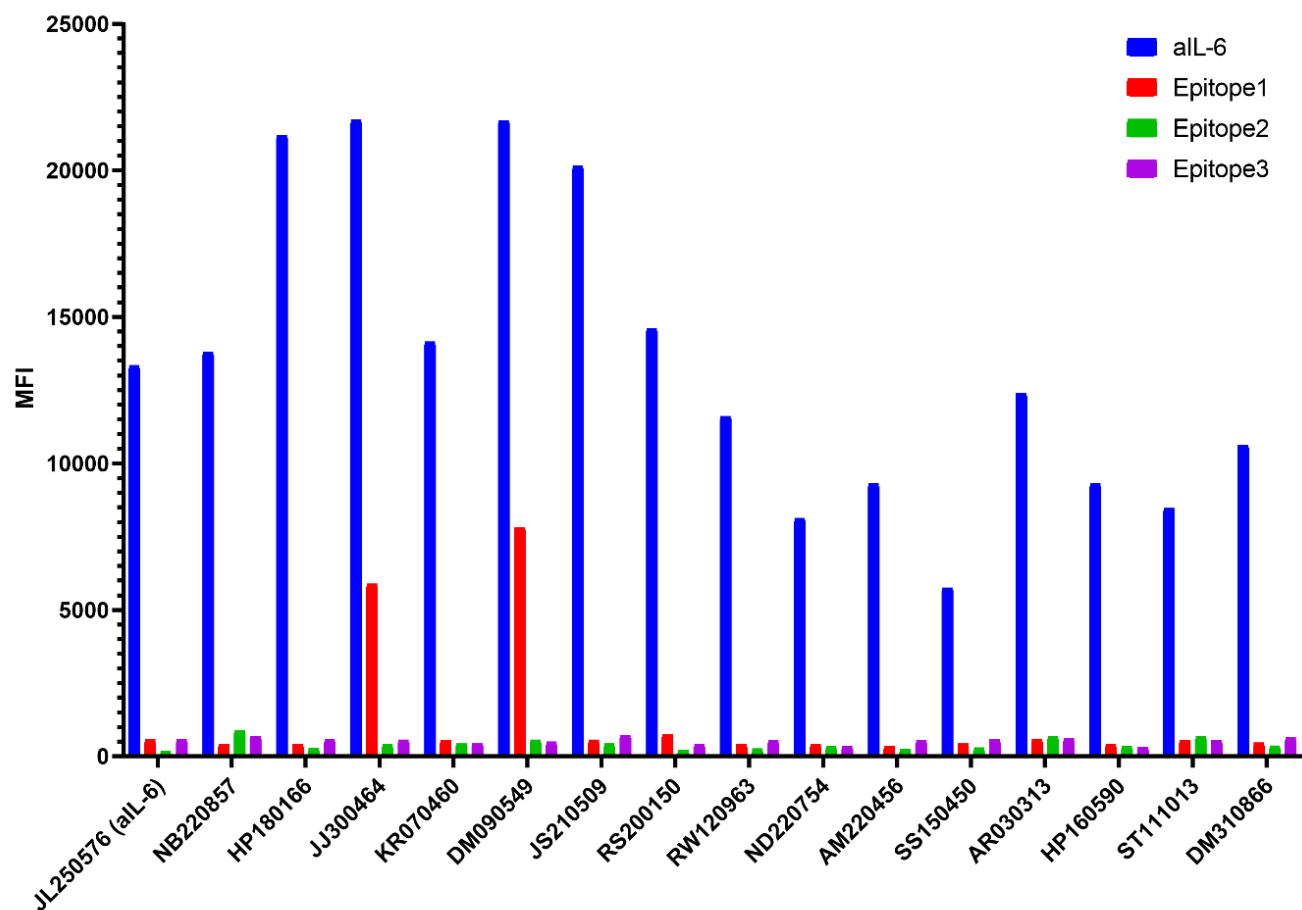


Figura 22. Evaluación del reconocimiento de los epítomos en pacientes con Enfermedades Infecciosas. Se grafican los valores de MFI para los tres epítomos evaluados en muestras séricas del grupo de **Enfermedades Infecciosas** (n=19). Los epítomos se representan en barras de color: Epitope1 (barra roja), Epitope2 (barra verde), Epitope3 (barra morada). Se incluye el valor de MFI presentado para anti-IL-6 (barra azul).

6.10. Identificación de epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ

En estudios previos realizados por el equipo de trabajo, se llevó a cabo el escaneo de una muestra positiva a autoanticuerpos anti-IFN γ y se observó una reacción hacia dos secuencias peptídicas distintivas, la primera $^{112}\text{HELIQVMAELSPA}^{124}$ con una señal de reconocimiento elevada por los autoanticuerpos, mientras que con la segunda $^{104}\text{LNVQRKAIHELIQ}^{116}$ la señal fue de menor intensidad. Así mismo, se observó una serie de señales débiles de interacción hacia diferentes arreglos de péptidos, los cuales coincidían con varios aa en su secuencia, conservando diez residuos comunes ($^{14}\text{IVLGS LGCYC}^{23}$). El análisis y la integración de estos resultados permitió definir tres secuencias de aminoácidos como posibles epítopes principales reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ ; $^{112}\text{HELIQVMAELSPA}^{124}$ (Epitope1), $^{104}\text{LNVQRKAIHELIQ}^{116}$ (Epitope2) y $^{14}\text{IVLGS LGCYC}^{23}$ (Epitope3).

A partir de las secuencias de los epítopes definidos previamente, se realizó un análisis *in silico*, empleando la base de datos GenBank y el Programa Mega 6.0®, para analizar, reconocer y comparar las secuencias identificadas en el microarreglo peptídico (**Figura 23**), confirmando que los epítopes de interés están situados dentro de la secuencia del IFN γ humano.

Así mismo, empleando el programa Mega 6.0®, se determinó si las secuencias de aa de los epítopes definidos para IFN γ están conservadas entre la secuencia de IFN γ de diferentes especies (humana, felina y canina). El análisis del Epitope1 mostró una homología de 54 al 100% (**Figura 24, Panel A**). En relación con al Epitope2, la secuencia determinada presenta varios residuos conservados, observándose una homología de 69 a 100% con la secuencia del IFN γ de otras especies (**Figura 24, Panel A**). Por último, la secuencia menos conservada entre las tres especies se observó en el análisis del Epitope3, en donde la homología observada estaba en el rango de 50 a 100% (**Figura 24, Panel C**).

10	20	30	40	50
MKYTSYILAF	QLCIVLGS	LG CYCQDPYVKE	AENLKKEYFNA	GHSADVADNGT
60	70	80	90	100
LFLGILKNWK	EESDRKIMQS	QIVSFYFKLF	KNFKDDQSIQ	KSVETIKEDM
110	120	130	140	150
NVKFFNSNKK	KRDDFEKLTN	YSVTDLNVOR	KAIHELIQVM	AELSPA
160				AKTG
KRKRSQMLFR	GRRASQ			

Figura 23. Localización de los epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ . Se muestran las secuencias Epitope1 (recuadro rojo), Epitope2 (recuadro azul) y Epitope3 (recuadro amarillo) reconocidas por autoanticuerpos detectados o presentes en muestras séricas humanas.

Panel A

Especie	Porcentaje de Homología	Species/Abbrv	Δ		*	*		*		*	*		*	*		
		1. Epitope1 IFNg	-	H	E	L	I	Q	V	M	A	E	L	S	P	A
<i>Homo sapiens</i>	100%	2. ref NP_000610.2 Homo sapiens	I	H	E	L	I	Q	V	M	A	E	L	S	P	A
<i>Canis lupus</i>	62%	3. ref NP_001003174.1 Canis lupus familiaris	I	N	E	L	I	K	V	M	N	D	L	S	P	R
<i>Felis catus</i>	54%	4. ref NP_001009873.1 Felis catus	I	N	E	L	F	K	V	M	N	D	L	S	P	R

Panel B

Especie	Porcentaje de Homología	Species/Abbrv	Δ		*	*		*		*	*		*	*		*	*					
		1. Epitope2 IFNg	-	L	N	V	Q	R	K	A	I	H	E	L	I	Q	V	M	A	E	L	-
<i>Homo sapiens</i>	100%	2. ref NP_000610.2 Homo sapiens	D	L	N	V	Q	R	K	A	I	H	E	L	I	Q	V	M	A	E	L	S
<i>Canis lupus</i>	77%	3. ref NP_001003174.1 Canis lupus familiaris	D	L	Q	V	Q	R	K	A	I	N	E	L	I	K	V	M	N	D	L	S
<i>Felis catus</i>	69%	4. ref NP_001009873.1 Felis catus	D	L	Q	V	Q	R	K	A	I	N	E	L	F	K	V	M	N	D	L	S

Panel C

Especie	Porcentaje de Homología	Species/Abbrv	Δ		*	*		*		*	*		*	*		*	*	
		1. Epitope3 IFNg	-	I	V	L	G	S	L	G	C	Y	C	-	-	-		
<i>Homo sapiens</i>	100%	2. ref NP_000610.2 Homo sapiens	C	I	V	L	G	S	L	G	C	Y	C	Q	D	P		
<i>Canis lupus</i>	50%	3. ref NP_001003174.1 Canis lupus familiaris	C	V	I	L	C	S	S	G	C	N	C	Q	A	M		
<i>Felis catus</i>	60%	4. ref NP_001009873.1 Felis catus	C	I	I	L	C	S	S	G	Y	Y	C	Q	A	M		

Figura 24. Homología entre las secuencias de IFN γ de diferentes especies con los epítomos identificados. Se muestran las alineaciones de las secuencias de IFN γ de cinco diferentes especies y los epítomos determinados. **Panel A:** Epitope1. **Panel B:** Epitope2 y **Panel C:** Epitope3. Los residuos conservados entre las secuencias están representados en cajas de colores.

Adicionalmente, se construyó el modelaje molecular entre la estructura del IFN γ , el IFN γ R1 y el IFN γ R2, para determinar la posible interacción de los epitopes reconocidos por los autoanticuerpos anti-IFN γ con la vía de señalización de la citocina, empleando la herramienta SWISS-MODEL para la elaboración de la proyección 3D y el programa PyMOL para identificar las interacciones.

En la **Figura 25**, se muestra la imagen de la estructura 3D de la interacción entre IFN γ (estructura azul), IFN γ R1 (estructura amarilla) e IFN γ R2 (estructura rosa). Así mismo, en color rojo se muestra la secuencia del Epitope1, la cual presenta interacción principalmente con IFN γ R1 formando una estructura intermedia de unión con IFN γ R2, donde dichas interacciones producen el complejo de señalización. En cambio, la secuencia del Epitope3, no se observó en el modelaje molecular, por lo que no se determinó si los aa que constituyen al Epitope3 presentan una interacción con las secuencias del receptor.

Por otra parte, empleando el programa MEGA 6.0® se determinó si las secuencias de los epítomos determinados eran compartidas con proteínas de diversos microorganismos. En la **Figura 26 Panel A**, se muestran los resultados de la alineación múltiple para Epitope1 en donde se observó una homología del 77% con la secuencia WP 210084221.1 de *Mycobacterium tuberculosis*. Así mismo, el Epitope2 mostró una homología del 69% con la secuencia RAQ4562.1 de *Aspergillus flavus* (**Figura 26, Panel B**).

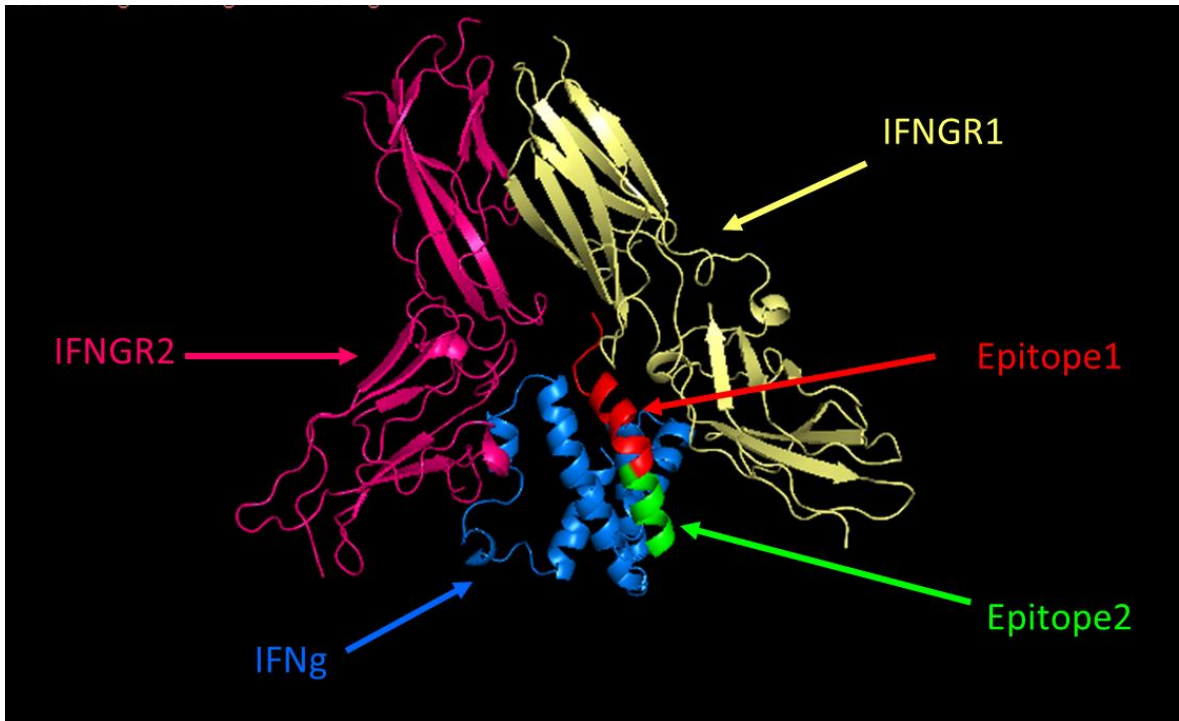


Figura 25. Modelaje molecular entre la estructura de IFN γ , el IFNGR1 y el IFNGR2. Se muestra la interacción entre IFN γ (estructura azul), IFNGR1 (estructura amarilla) e IFNGR2 (estructura rosa) generada con el programa PyMOL. La secuencia de Epitope1 se representa en color rojo y Epitope2 en color verde.

Panel A

Microorganismo	Porcentaje de Homología
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	77%

Species/Abbrv	Δ			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1. ref WP 210084221.1 <i>Mycobacterium</i> sp. OAE908		W	R	F	R	H	E	L	I	R	E	V	A	A	E	L	S	P	P	
2. Epitope interferon gama human		-	-	-	-	H	E	L	I	-	Q	V	M	A	E	L	S	P	A	

Panel B

Microorganismo	Porcentaje de Homología
<i>Aspergillus flavus</i>	69%

Species/Abbrv	Δ										*	*	*	*	*	*	*	*	*	*						
1. Epitope2 IFNg		-	-	-	-	-	-	-	-	-	L	N	V	Q	R	K	A	I	H	E	L	I	Q	-		
2. gb RAQ45621.1 <i>Aspergillus</i> <i>flavus</i>		I	Q	R	G	L	Y	D	R	L	Y	T	A	N	V	Q	T	K	A	T	R	E	L	I	Q	E

Figura 26. Homología entre la secuencia de los epítopes reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ y las secuencias de aa correspondientes a microorganismos. Panel A. Alineación de la secuencia del Epitope1 y la secuencia WP 210084221.1 de *Mycobacterium tuberculosis*. **Panel B.** Alineación de la secuencia del Epitope2 y la secuencia RAQ4562.1 de *Aspergillus flavus*. Los residuos conservados entre las secuencias están representados en cajas de colores.

6.11. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina sobre 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 Hep3B y la citocina rhIL-6; para el análisis de la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6 se utilizó la citocina humana recombinante, la cual se pre-incubó en presencia o ausencia de sueros positivos a autoanticuerpos contra IL-6, así como un control negativo (suero de individuo clínicamente sano) o el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 comercial como control positivo.

Los resultados de los ensayos de inhibición mostraron dos patrones interesantes de respuesta. El primero fue la disminución de la fosforilación de STAT-3 en siete de las 16 muestras analizadas (**Figura 27**), sugiriendo una inhibición de la actividad biológica de la IL-6 por los autoanticuerpos contra dicha citocina, principalmente en muestras de pacientes del grupo de **Enfermedades Infecciosas**; mientras que en el resto de las muestras (nueve de 16) se observó un efecto de exacerbación de dicha actividad biológica de esta citocina (**Figura 28**) al presentar valores altos de fosforilación de STAT-3, dichas muestras pertenecían al grupo de **Enfermedades Autoinmunes**. Los valores de MFI indican los niveles de fosforilación de STAT-3, mostrando que en las células estimuladas con la citocina en ausencia del autoanticuerpo efectivamente se induce la fosforilación de STAT-3, al detectar valores considerables de MFI al emplear un suero negativo a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6 (barra color naranja) o el medio de cultivo DMEM completo (barra rosa); en caso contrario, los valores MFI reportados para el anticuerpo comercial (barra amarilla) demuestran un efecto de inhibición de la fosforilación de STAT-3. En la **Figura 27**, se puede observar dicha neutralización al preincubar con la muestra sérica (barra verde), apreciando la disminución de los niveles de fosforilación de STAT-3; mientras que en la **Figura 28**, al preincubar con la muestra sérica (barra azul) se observa un incremento en los valores de MFI para la fosforilación de STAT-3, indicando un efecto de exacerbación o de no inhibición sobre la actividad biológica de la IL-6.

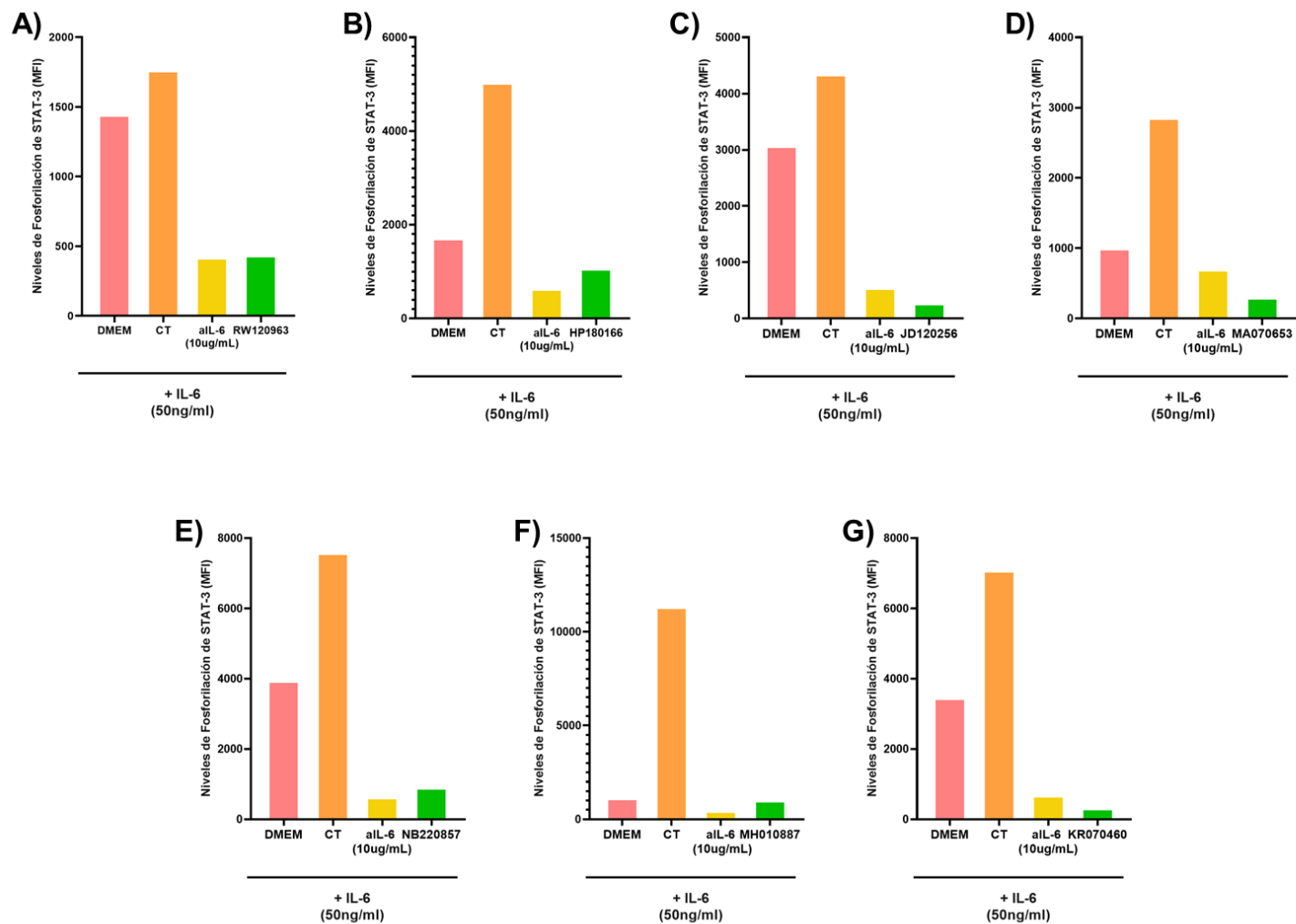


Figura 27. Inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6. Los niveles de fosforilación de STAT-3 fueron determinados en lisados celulares de células Hep3B estimuladas con IL-6 preincubadas con ■ medio (DMEM); ■ Suero negativo a anti-IL-6 (control negativo), ■ anti-IL-6 (control positivo), ■ Muestra sérica positiva a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6. Panel A: RW120963, Panel B: HP180166, Panel C: JD120256, Panel D: MA070653, Panel E: NB220857(2), Panel F: MH010887, Panel G: KR070460.

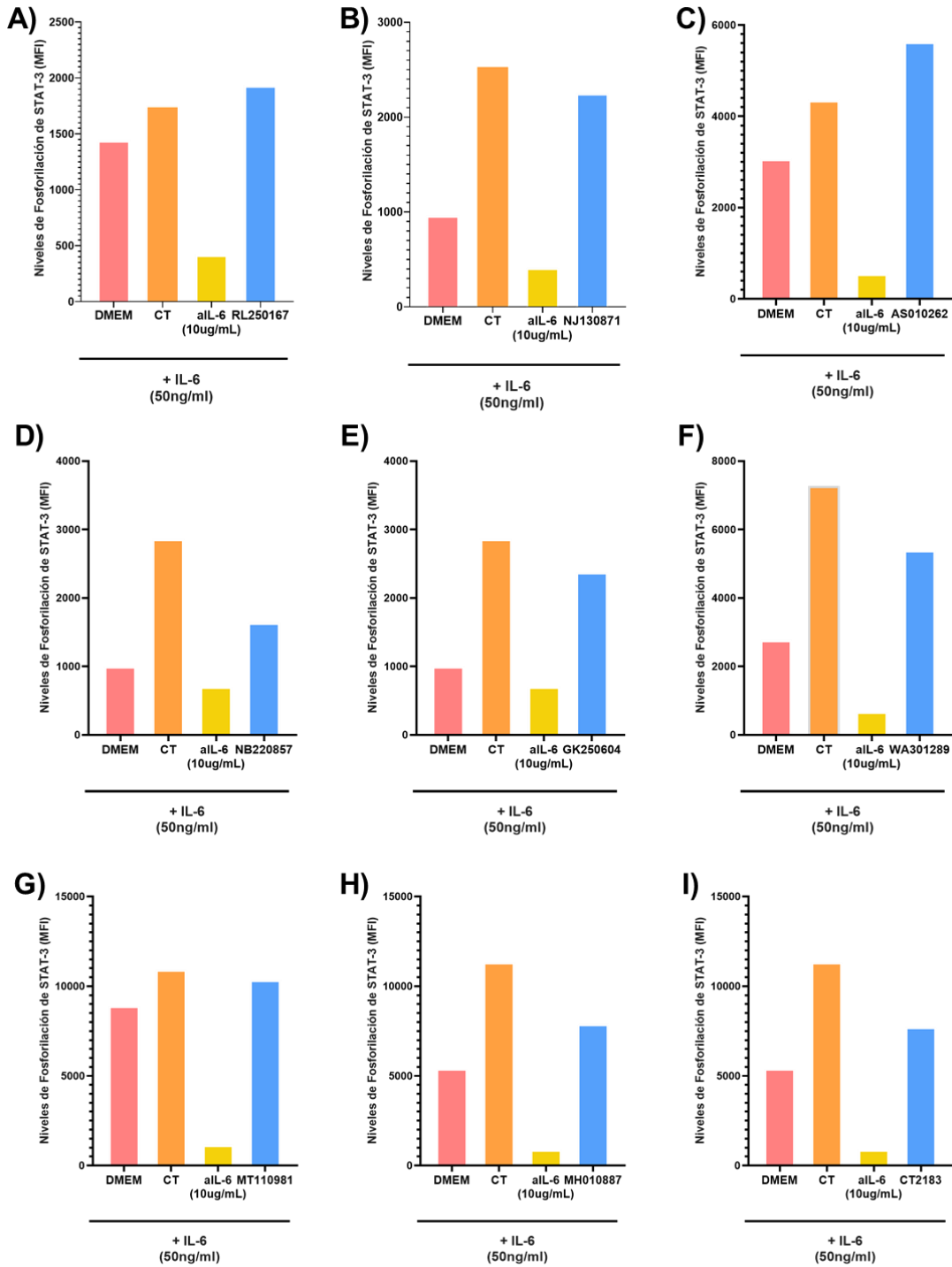


Figura 28. Exacerbación de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6. Los niveles de fosforilación de STAT-3 fueron determinados en lisados celulares de células Hep3B estimuladas con IL-6 preincubadas con ■ medio (DMEM); ■ Suero negativo a anti-IL-6 (control negativo), ■ anti-IL-6 (control positivo), ■ Muestra sérica positiva a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6. Panel A: RL250167, Panel B: NJ130871, Panel C: AS010262, Panel D: NB220857(1), Panel E: GK250604, Panel F: WA301289, Panel G: MT110981, Panel H: MH010887, Panel I: CT2183.

6.12. Análisis de la función neutralizante de autoanticuerpos en la actividad biológica de IFN γ

La capacidad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IFN γ se evaluó cuantificando los niveles de citocinas en sobrenadantes de sangre completa previamente estimulada, el ensayo de inhibición de la producción de IL-12 inducida por IFN γ empleando PBMCs y el ensayo de neutralización del IFN γ recombinante en presencia de muestras séricas positivas o negativas a autoanticuerpos anti-IFN γ .

6.12.1. Niveles de citocinas en sangre completa activada

La cuantificación de citocinas en sangre completa activada se realizó estimulando la sangre completa con PHA sola o en combinación con IL-12. Posterior a la incubación se realizó la medición de IFN γ en los sobrenadantes de las muestras analizadas en ambas condiciones. Los resultados de este análisis se presentan en la **Figura 29, Panel A**, en donde se puede observar que no se detectó IFN γ en los sobrenadantes de las muestras de sangre completa pertenecientes a pacientes positivos a autoanticuerpos anti-IFN γ , sugiriendo una posible función neutralizante de dichos autoanticuerpos sobre la actividad biológica de la citocina producida endógenamente. Así mismo, se puede observar que en las muestras de sangre completa pertenecientes a los individuos clínicamente sanos se detectaron niveles considerables de la producción de IFN γ en respuesta a ambos estímulos.

De forma similar, se evaluó la producción de IL-12 inducida por LPS o LPS/IFN γ en sangre completa. En la **Figura 29, Panel B**, se puede observar que después la estimulación se detectaron niveles bajos de IL-12 en los sobrenadantes de las muestras de sangre completa de pacientes positivos a autoanticuerpos anti-IFN γ , mientras que en los sobrenadantes de las muestras de individuos clínicamente sanos (sin la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ) la producción de IL-12 se presentó en cantidades considerables (**Figura 29, Panel B**).

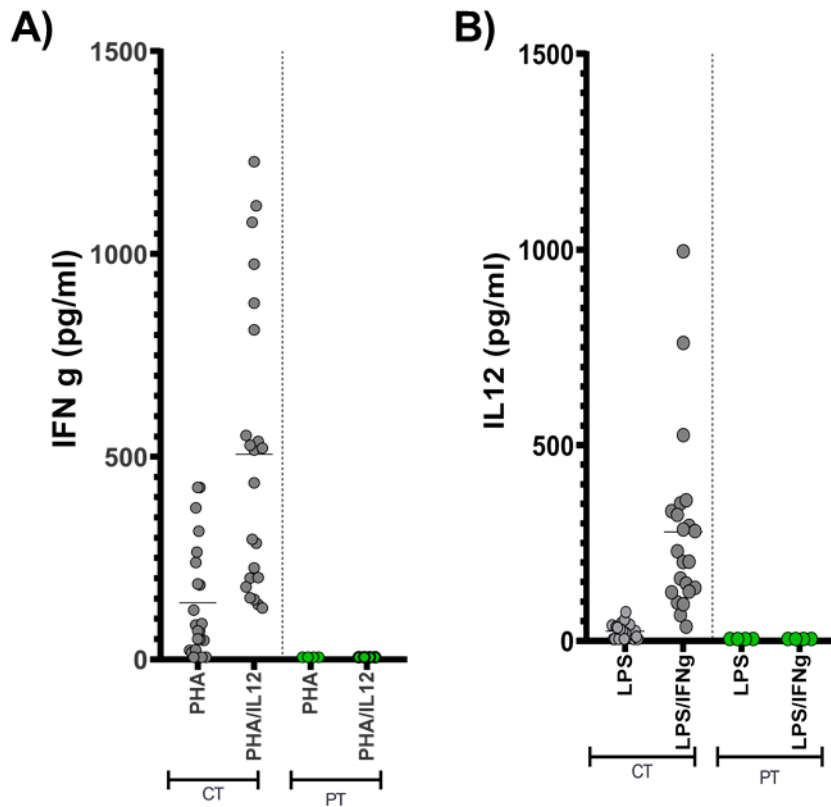


Figura 29. Niveles de citocinas en sangre completa activada. Los niveles de citocinas fueron determinados en los sobrenadantes después de la activación de sangre completa de pacientes positivos a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ o de individuos clínicamente sanos (negativos a autoanticuerpos contra IFN γ). Las muestras de pacientes (PT) se muestran en círculos verdes, mientras que los individuos clínicamente sanos (CT) se presentan en círculos grises. **Panel A:** Producción de IFN γ por estimulación con PHA o PHA/IL12. **Panel B:** Producción de IL-12 inducida por LPS o LPS/IFN γ .

6.12.2. Ensayo de inhibición de la producción de IL-12 inducida por IFN γ en PBMCs

Para demostrar la función neutralizante de autoanticuerpos anti-IFN γ se activaron PBMC's de un individuo clínicamente sano con LPS o LPS/IFN γ en presencia de 20% de muestra sérica de un individuo clínicamente sano (control negativo a la presencia de autoanticuerpos contra IFN γ) o de un paciente positivo a la presencia de estos autoanticuerpos. Posterior a una incubación de 24 hrs, se midieron los niveles de IL-12 en los sobrenadantes.

Los resultados de este análisis se muestran en la **Figura 30**, donde se puede observar que en la estimulación con LPS o LPS/IFN γ se detectó la producción de IL-12 en PMBC's incubadas con la muestra sérica del control negativo; mientras que en los sobrenadantes de las células estimuladas e incubadas con la muestra sérica del paciente no se detectó IL-12, demostrando la capacidad de los autoanticuerpos anti-IFN γ , presentes en la muestra sérica del paciente, de neutralizar la actividad del IFN γ exógeno (utilizado como estímulo), así como, el IFN γ producido endógenamente.

6.12.3. Ensayo de neutralización IFN γ recombinante

La capacidad de los autoanticuerpos anti-IFN γ presentes en la muestra sérica del paciente se confirmó incubando durante una hora IFN γ recombinante en medio RPMI con 20% de muestra sérica de un control negativo (individuo clínicamente sano) o de un paciente positivo a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ . En la **Figura 31** se puede observar que en presencia de la muestra sérica del control sano se detectaron niveles considerables de IFN γ recombinante; mientras que, en presencia de la muestra sérica del paciente los niveles de IFN γ , fueron bajos, sugiriendo una completa unión de los autoanticuerpos anti-IFN γ al IFN γ recombinante y, por lo tanto, confirmando la actividad de neutralización de dichos autoanticuerpos en la función biológica de esta citocina observada en los ensayos de inhibición mencionados anteriormente.

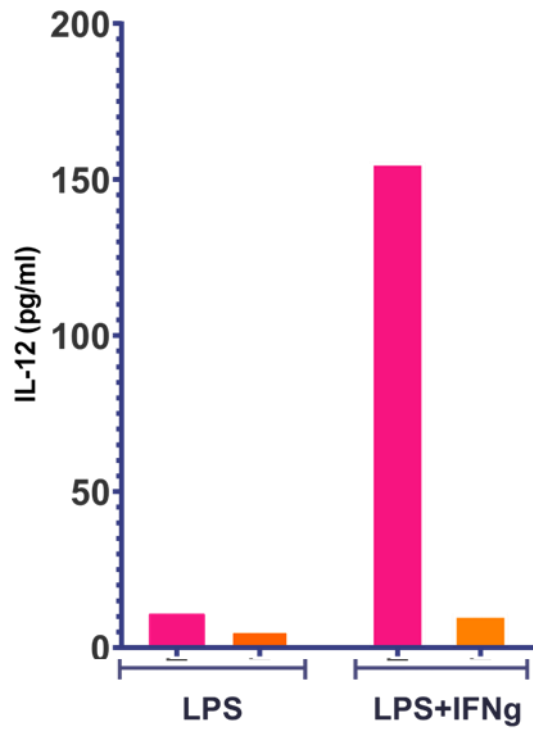


Figura 30. Inhibición de la producción de IL-12 inducida por LPS o por la coestimulación de LPS+IFN γ . Los niveles de IL-12 fueron determinados en sobrenadantes de PMBCs estimuladas con LPS o LPS+IFN γ incubadas con ■ muestra sérica de individuos clínicamente sanos (CT) y ■ Muestra sérica positiva a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ (PT).

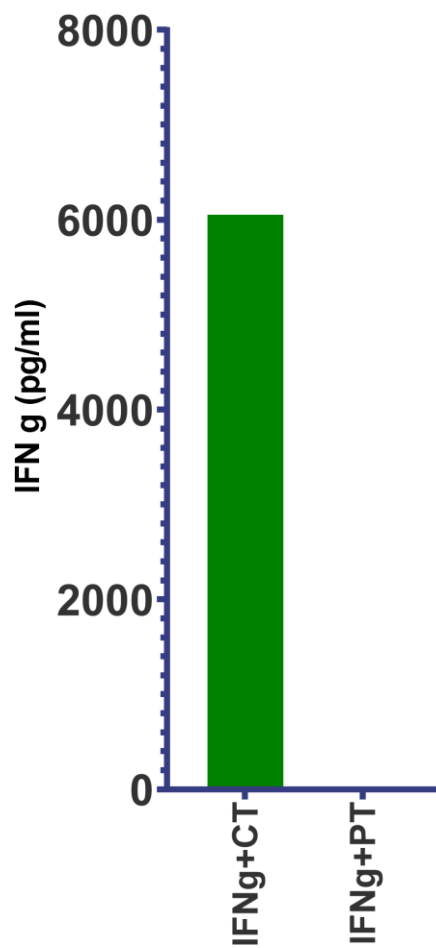


Figura 31. Neutralización IFN γ recombinante humano. Niveles de IFN γ determinados posterior a una incubación de la citocina con una muestra sérica de individuos clínicamente sanos (CT) y una positiva a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ (PT).

6.13. Análisis serológico de las muestras felinas

En forma general, los niveles de autoanticuerpos contra citocinas se reportan en valores MFI, los cuales se emplearon para todos los análisis realizados, considerando la evaluación de cada una de las diferentes muestras por duplicado. Los valores MFI de individuos clínicamente sanos se utilizaron para definir el valor de corte para todos los niveles de autoanticuerpos anti-citocinas, por lo tanto, el cálculo del valor de corte se hizo en función del promedio general de $MFI \pm 4SD$, estableciéndose un valor de corte generalizado de $MFI < 6000$, permitiendo definir como muestras negativas a todas aquellas que presentaron éstos valores de MFI; mientras que todas aquellas muestras séricas que obtuvieron valores $MFI \geq 6000$ fueron consideradas como positivas. Las microesferas de BSA (control negativo) se incluyeron en el análisis de los sueros de pacientes e individuos clínicamente sanos, encontrándose valores negativos (MFI de 263 a 1474) para todos ellos.

Los resultados del análisis para la identificación de las muestras séricas positivas a la presencia de autoanticuerpos contra citocinas mostraron que 90 de 137 (66%) sueros del grupo de pacientes resultaron positivos a autoanticuerpos contra al menos una citocina y dos receptores, considerando que presentaron valores $MFI \geq 6000$, mientras que en ninguna de las muestras séricas del grupo de individuos clínicamente sanos (controles negativos) se detectaron estos autoanticuerpos (**Figura 32**).

Así mismo, se observó que en 53 de las 137 (39%) muestras de pacientes se detectaron valores de MFI considerables (≥ 12000) para la presencia de autoanticuerpos contra al menos una de seis citocinas reconocidas por éstos (IFN γ , IL-28B, IL-6, IL-12, IL-10 e IL-18) y dos receptores (IL-6Ra e IL-28Ra), lo cual indica altos niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en estas muestras séricas.

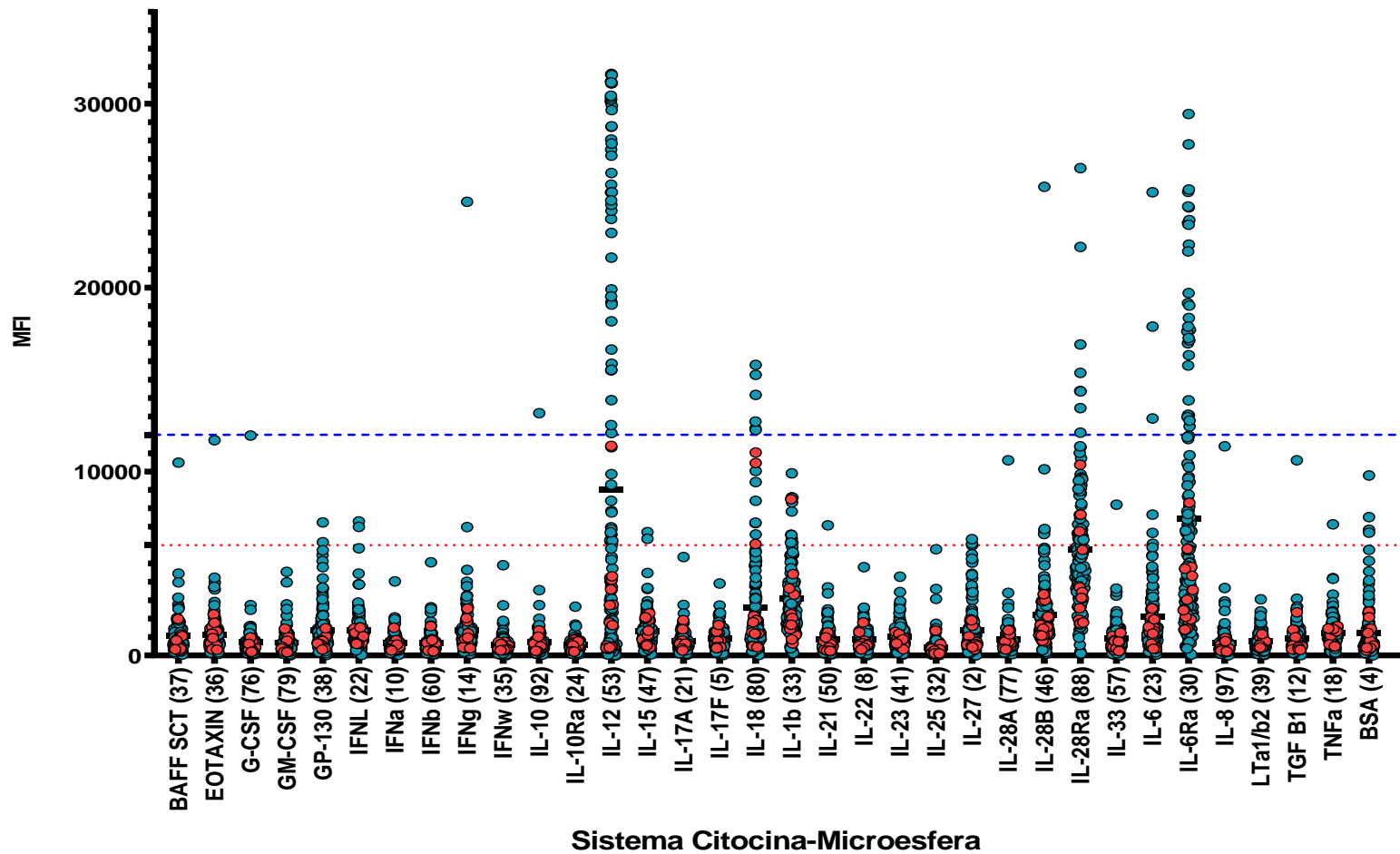


Figura 32. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas felinas mediante el sistema 34-plex citocina-microesfera. Se grafican los valores promedio de la MFI para los 34 sistemas. Se incluye el sistema de la BSA como control negativo. Donde (●) representa las muestras séricas de pacientes, y los (●) representan individuos clínicamente sanos.

De forma esquemática, en la **Figura 33** se muestran los mapas de calor (**Panel A**: Pacientes y **Panel B**: Individuos clínicamente sanos) de los resultados obtenidos a partir de la población felina de estudio, incluyendo las seis citocinas y los dos receptores contra los cuales se detectaron muestras séricas que presentaron valores de MFI ≥ 12000 . El programa *Multiple Experiment Viewer* (MEV 4_9_0®) reporta los valores MFI empleando una escala de colores, el gradiente de negro a azul representa los valores bajos (< 6000), de verde a naranja los valores intermedios (≥ 6000 y < 12000) y de rojo los valores altos (≥ 12000). En la **Figura 33, Panel A** se observa que el grupo de pacientes presentó una diversidad en la detección de autoanticuerpos con alta reactividad hacia diferentes citocinas, siendo autoanticuerpos contra IL-12 y el receptor IL-6Ra los que presentan los valores MFI altos (≥ 12000) en un mayor número de muestras, mientras que en la **Figura 33, Panel B** se presenta al grupo de individuos clínicamente sanos donde no se observa la presencia de autoanticuerpos con alta reactividad hacia ninguna de las citocinas evaluadas, presentando valores bajos de MFI (promedio MFI = 1170).

Para un análisis más detallado de los resultados, las muestras séricas correspondientes a los pacientes felinos se clasificaron en cuatro grupos, **FELV (PCR positivo)** (n=88), **FIV (PCR positivo)** (n=5), **FELV/FIV (PCR negativo)** (n=31) y **No diagnosticados** (n=13), como se mostró en la **Tabla 2**, los grupos se subdividieron en si los felinos presentaban o no alguna sintomatología.

Tomando en cuenta la actividad biológica de las citocinas que fueron reconocidas por autoanticuerpos, se decidió considerar la clasificación de éstas en dos grupos, IFNs y otras citocinas.

En la **Figura 34** se reportan los resultados de la presencia de autoanticuerpos contra tres interferones de las 128 muestras séricas de pacientes humanos analizadas y de las 13 muestras correspondientes a los individuos clínicamente sanos, donde se puede observar que se detectaron valores altos de MFI (≥ 12000) para autoanticuerpos contra IL-28Ra principalmente en pacientes del grupo de **FELV (PCR positivo)**.

Por otra parte, en el análisis de la presencia de autoanticuerpos contra cinco citocinas diferentes, se observó que los autoanticuerpos contra la IL-12 e IL-6Ra fueron los que tuvieron mayores valores de MFI, en un mayor número de muestras (**Figura 35**).

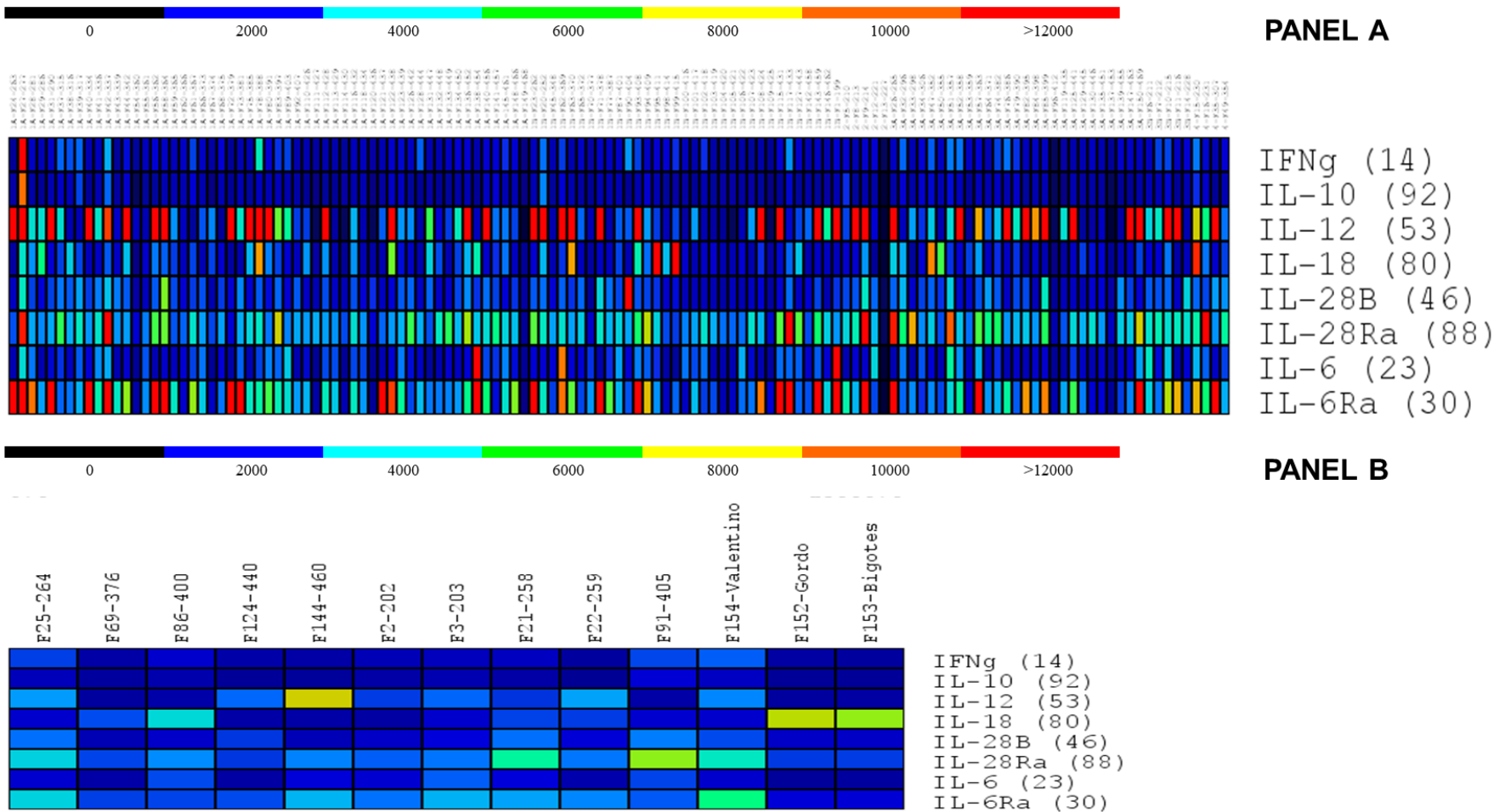


Figura 33. Mapa de calor de los valores de MFI de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6000, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6000 pero <12000 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12000. **Panel A:** Muestras de pacientes, **Panel B:** Individuos clínicamente sanos.

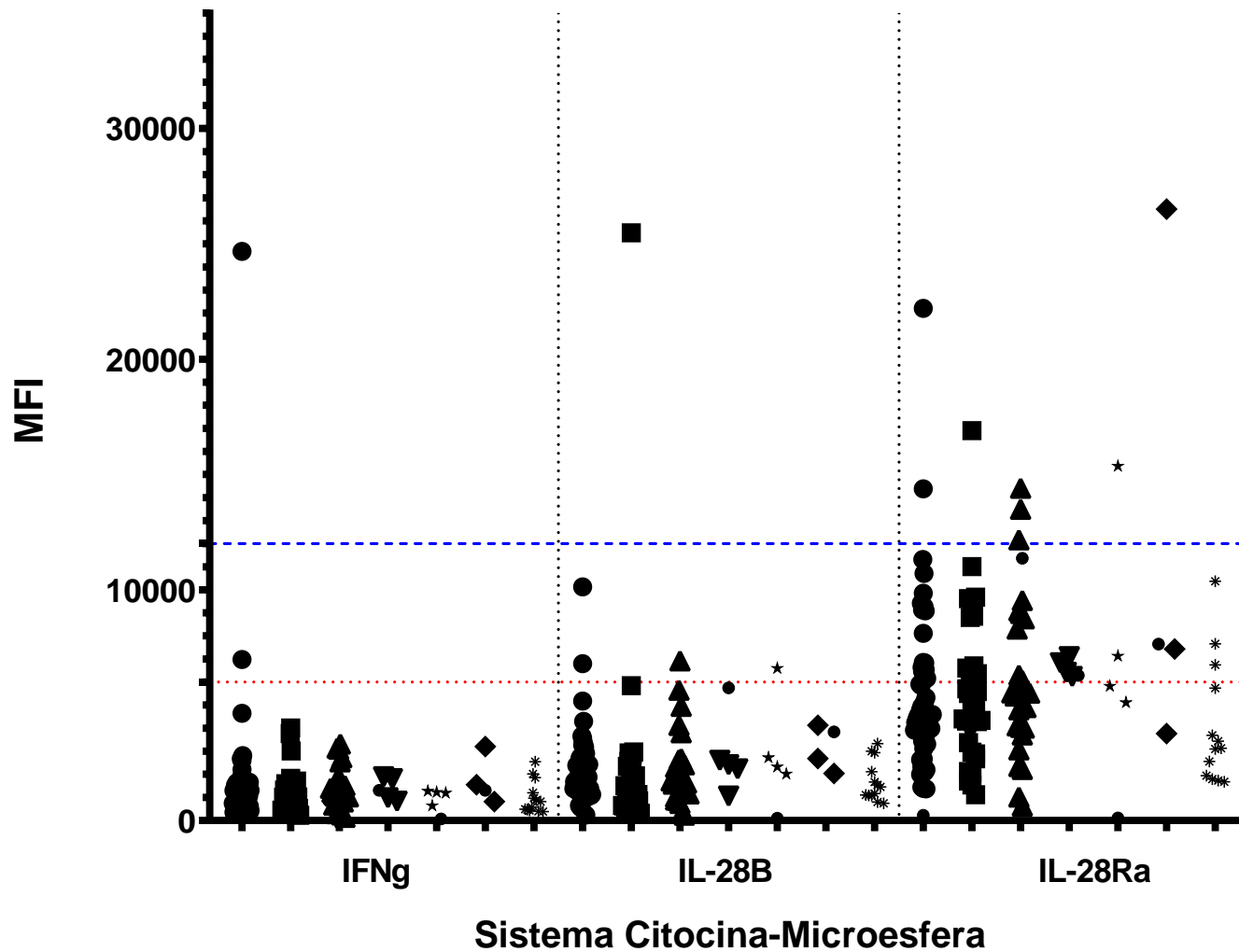


Figura 34. Patrón de autoanticuerpos contra interferones en pacientes e individuos clínicamente sanos. Valores de MFI de muestras séricas de felinos analizadas. Las enfermedades fueron agrupadas en: ● FELV con síntomas (n=55), ■ FELV sin síntomas (n= 33), ▲ Neg FELV con síntomas (n=26), ★ FIV (n=5), ▼ Neg FIV con síntomas (n=5), ◆ No diagnosticados (n=4); se incluyen también * los Individuos Sanos (n=13).

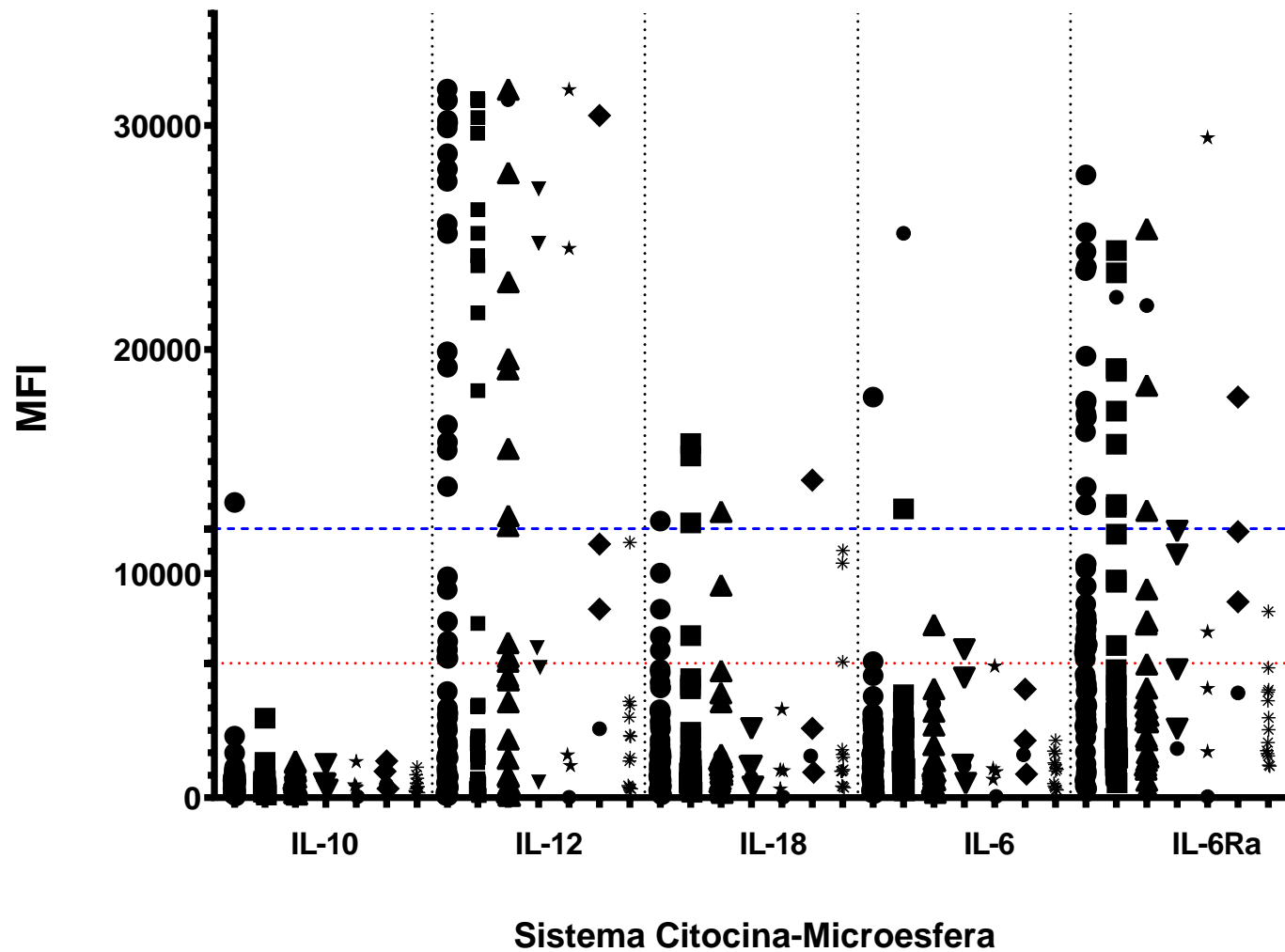


Figura 35. Valores de MFI de muestras séricas de felinos analizadas. Las enfermedades fueron agrupadas en: ● FELV con síntomas (n=55), ■ FELV sin síntomas (n= 33), ▲ Neg FELV con síntomas (n=26), ★ FIV (n=5), ▼ Neg FIV con síntomas (n=5), ◆ No diagnosticados (n=4); se incluyen también * los Individuos Sanos (n=13).

6.14. Análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y su relación con enfermedades en felinos

El análisis de la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y su relación con los grupos de enfermedad en felinos se realizó considerando únicamente los valores de MFI mayores 12000. Como se mencionó anteriormente, de acuerdo al tipo de enfermedad que presentaban los pacientes las muestras séricas se clasificaron en cuatro grupos **FELV (PCR positivo)**, **FIV (PCR positivo)**, **FELV/FIV (PCR negativo)** y **No diagnosticados**, así mismo cada grupo se dividió a su vez en distintos subgrupos en base al diagnóstico específico de cada paciente.

El análisis de estos datos se llevó a cabo mediante agrupaciones jerárquicas entre los autoanticuerpos anti-citocinas evaluados y las muestras analizadas, empleando el programa MEV, dichas agrupaciones se realizaron de acuerdo con el grupo de enfermedad para definir una asociación entre la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas y el tipo de enfermedad.

En la **Figura 36** se muestra la agrupación jerárquica en muestras de pacientes **FELV (PCR positivo)**, esta asociación permitió establecer un patrón de reactividad a IL-12 e IL-6Ra (recuadro rosa) en pacientes que presentaban signos clínicos de enfermedad.

Así mismo, en la **Figura 37** se detectó un patrón de reactividad hacia IL-12 (recuadro amarillo) en pacientes **FIV/FELV (PCR negativo)** que presentaban diversas sintomatologías

Por otra parte, en la agrupación jerárquica de pacientes **FIV (PCR positivo)** (**Figura 38**) y **No diagnosticados** (**Figura 39**) no se observaron patrones de reactividad definidos.

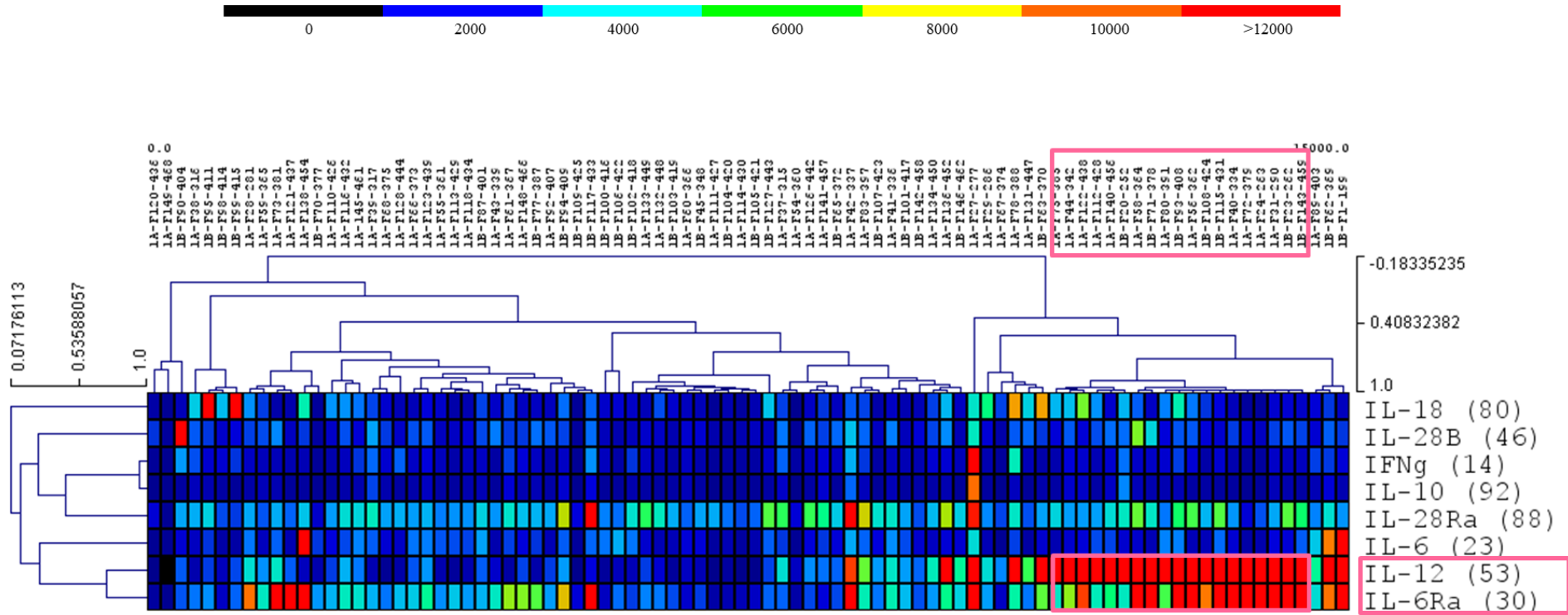


Figura 36. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas positivas a FELV (PCR positivo). El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6000, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6000 pero <12000 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12000, mientras que el gris representa valores no evaluados. La asociación de autoanticuerpos con alta reactividad hacia IL-12 e IL-6Ra se muestra con el recuadro de color rosa.

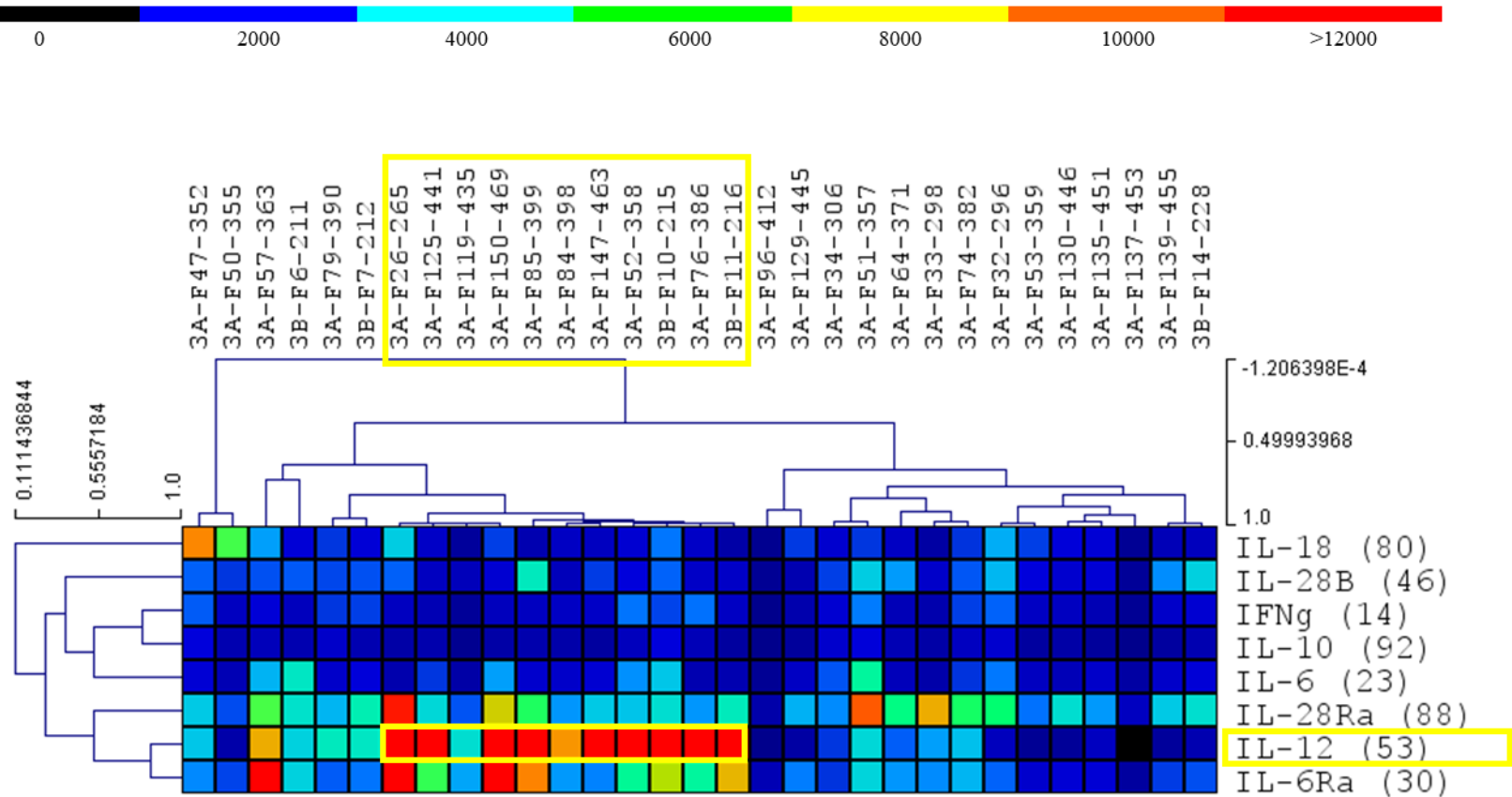


Figura 37. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas de pacientes FIVV/FELV (PCR negativo). El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6000, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6000 pero <12000 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12000, mientras que el gris representa valores no evaluados. La asociación de autoanticuerpos con alta reactividad hacia IL-12 se muestra con el recuadro de color amarillo.

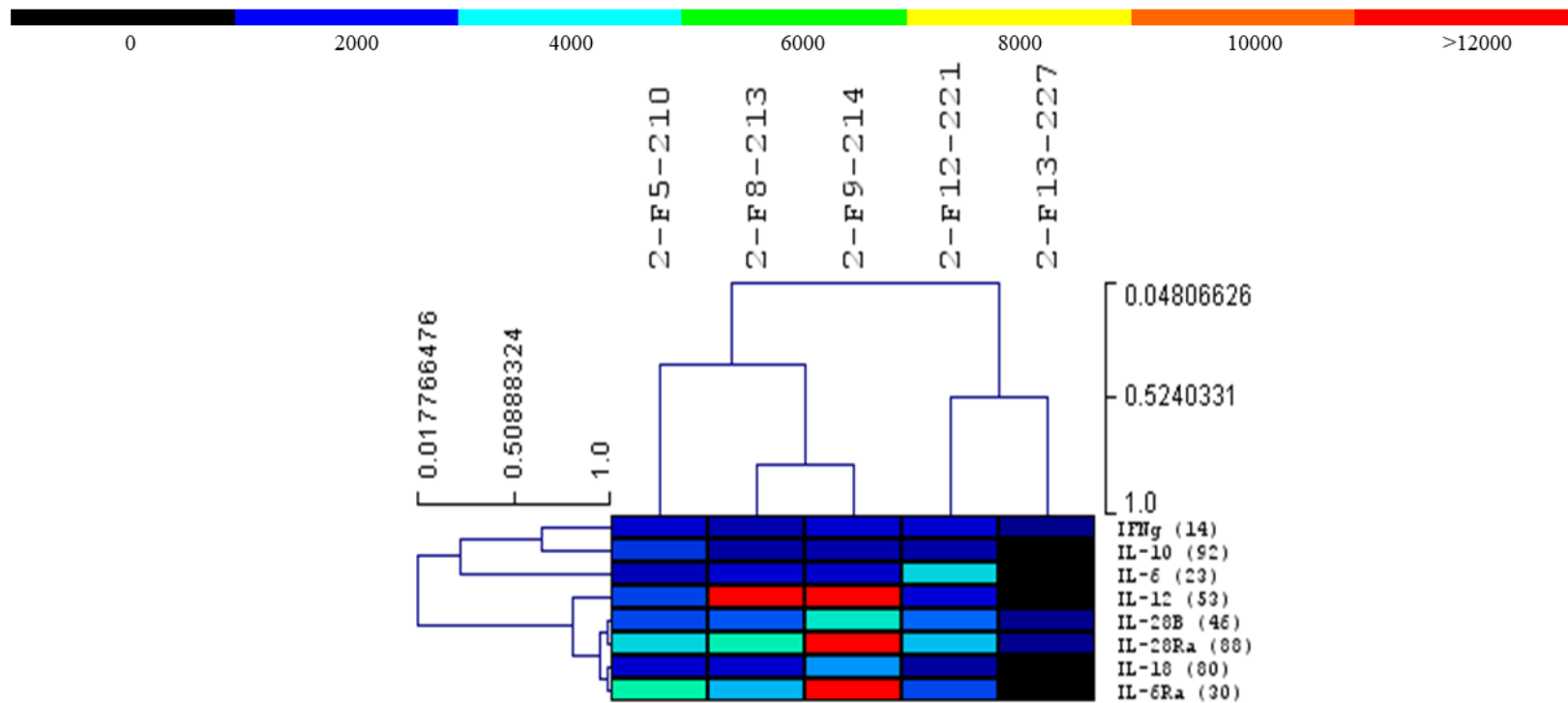


Figura 38. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas de pacientes FIVV (PCR positivo). El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6000, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6000 pero <12000 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12000, mientras que el gris representa valores no evaluados.

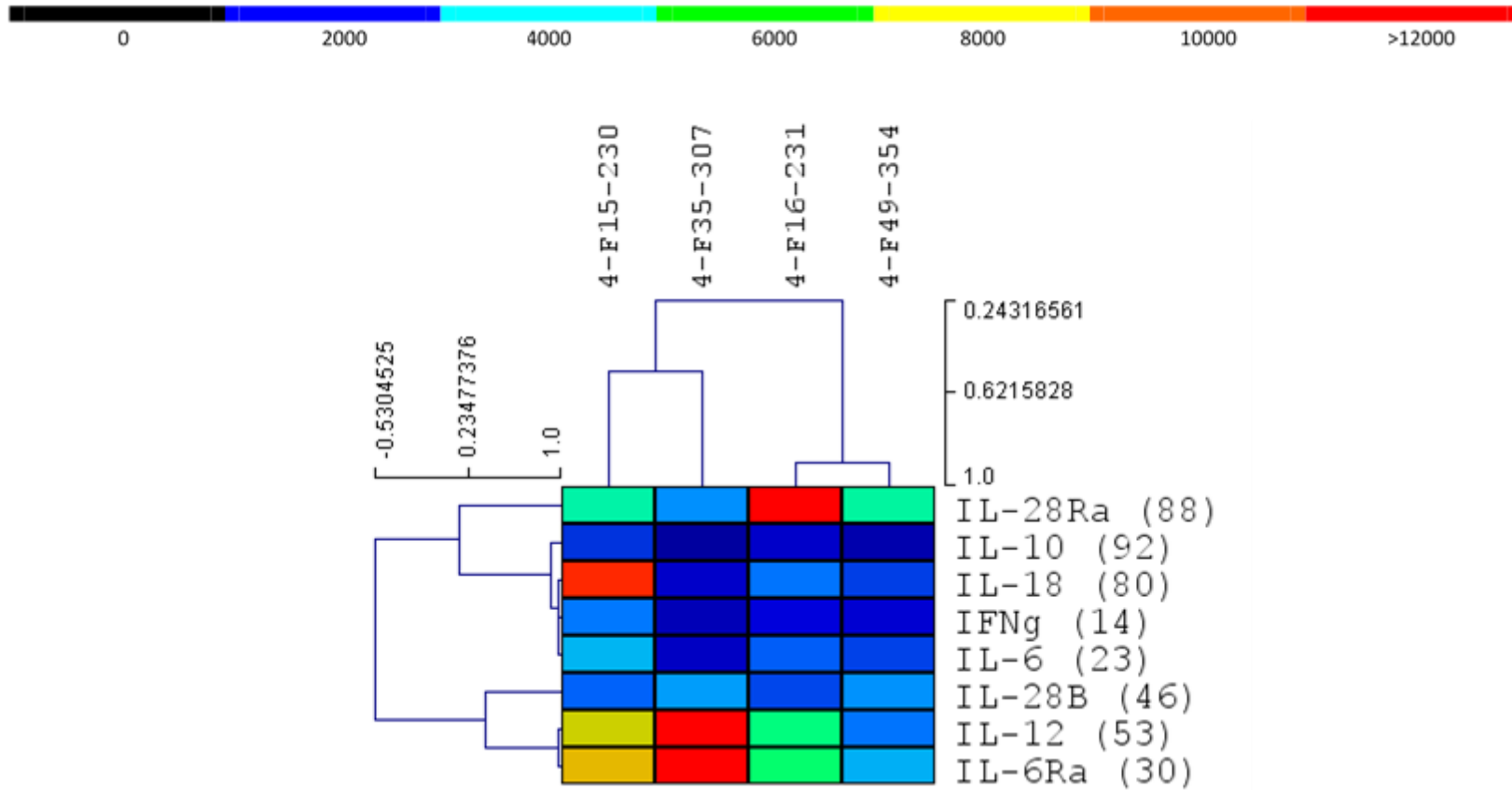


Figura 39. Mapa de calor de los valores de MFI de anticuerpos detectados contra citocinas en muestras felinas de pacientes No diagnosticados. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los anticuerpos anti-citocinas detectados. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores de MFI <6000, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 6000 pero <12000 y los rojos representan las muestras con valores de MFI > 12000, mientras que el gris representa valores no evaluados.

6.15. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina sobre la activación de la señalización por STAT-4 mediada por IL-12 o por STAT-3 mediada por IL-6

La evaluación de la función biológica de los autoanticuerpos contra IL-12 o IL-6Ra se determinó midiendo la activación de la cascada de señalización de STAT-4 mediante el uso de las células HEK-Blue IL-12 estimuladas con la citocina rhIL-12 y la activación de la cascada de señalización de STAT-3 para la estimulación con la citocina rhIL-6 de las células HEK-Blue IL-6.

Las células líneas celulares HEK-Blue están diseñadas para detectar la citocina ya que cuentan con los genes de su receptor, sus factores de señalización, así como el gen de SEAP el cuál es utilizado como gen reportero. Por lo tanto, se obtuvo la lectura de absorbancias dadas por el SEAP inducido por la señalización de IL-12 o IL-6 a través de los factores de transcripción STAT-4 o STAT-3, respectivamente; los valores de D.O. se emplearon para determinar las concentraciones de las citocinas para estimular las líneas celulares, así como para el cálculo del porcentaje de inhibición en presencia o ausencia de los autoanticuerpos anti-citocinas.

6.15.1 Determinación de la concentración de rhIL-12 para estimular de la línea celular HEK-Blue IL-12

Para determinar la concentración de trabajo de rhIL-12 que se utilizó como estímulo de las células HEK-Blue IL-12 se realizó una curva estándar de respuesta a rhIL-12, empleando 12 diferentes concentraciones (640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 y 0.31 ng/ml), incluyendo también las condiciones sin estímulo (Medio de Prueba) y el control negativo de estímulo (rhTNF α a 20 ng/ml). Los valores promedio de D.O obtenidos para cada una de las concentraciones evaluadas se muestran en la Figura 40, donde se puede apreciar que en las concentraciones 640, 320, 160, 80 ng/ml el valor de D.O. alto se mantiene similar entre ellas; sin embargo, a partir de la concentración 40 ng/ml se presenta un decrecimiento en los valores de D.O, observando que a partir de la concentración de 5 ng/ml la D.O obtenida es cercana a cero. Por otra parte, en la concentración de 20 ng/ml se presenta un porcentaje de respuesta alrededor del 50 %,

por lo que se eligió trabajar con la concentración de 20 ng/ml en el ensayo de inhibición. Las condiciones sin estímulo (Medio de Prueba) y el control negativo de estímulo (rhTNF α a 20 ng/ml) se incluyeron en el análisis, encontrándose valores de D.O cercanos a cero, demostrando que no se activaba la vía de señalización por STAT4 en ausencia de IL-12.

6.15.2 Determinación de la concentración de rhIL-6 para estimular la línea celular HEK-Blue IL-6

Para determinar la concentración de trabajo de rhIL-6 que se utilizó como estímulo de las células HEK-Blue IL-6 se realizó una curva estándar de respuesta a rhIL-6, empleando 12 diferentes concentraciones (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.097 y 0.048 ng/ml), incluyendo también las condiciones sin estímulo (Medio de Prueba) y el control negativo de estímulo (rhIL-4 a 3 ng/ml).

Los valores de D.O obtenidos para cada una de las concentraciones evaluadas se muestran en la **Figura 41**, donde se pueden apreciar que en las concentraciones más altas (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12) el valor de D.O. es considerablemente alto y se mantiene un valor similar entre ellas; sin embargo, a partir de la concentración 1.56 ng/ml se presenta un decrecimiento los valores de D.O. Por otra parte, en la concentración de 0.75 ng/ml se presenta un porcentaje de respuesta alrededor del 50 %, por lo que se eligió trabajar con la concentración de 0.75 ng/ml en el ensayo de inhibición. Las condiciones sin estímulo (Medio de Prueba) y el control negativo de estímulo (rhIL-4 a 3 ng/ml) se incluyeron en el análisis, encontrándose valores de D.O cercanos a cero, demostrando que no se activa la vía de señalización por STAT3 en ausencia de IL-6.

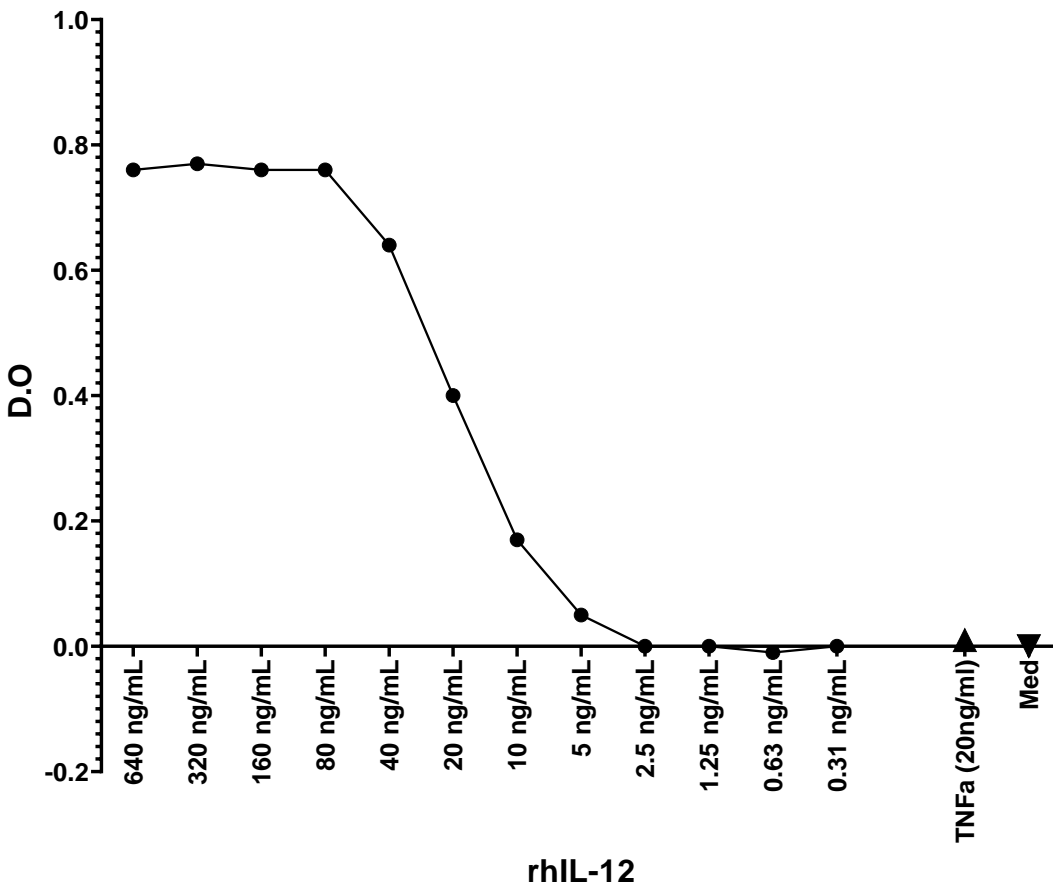


Figura 40. Determinación de la concentración de rhIL-12 para estimular de la línea celular HEK-Blue IL-12. Se presentan los niveles de D.O obtenidos empleando las 12 diferentes concentraciones de rhIL-12 (640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63 y 0.31 ng/ml) y las condiciones sin estímulo (rhTNF α a 20 ng/ml).

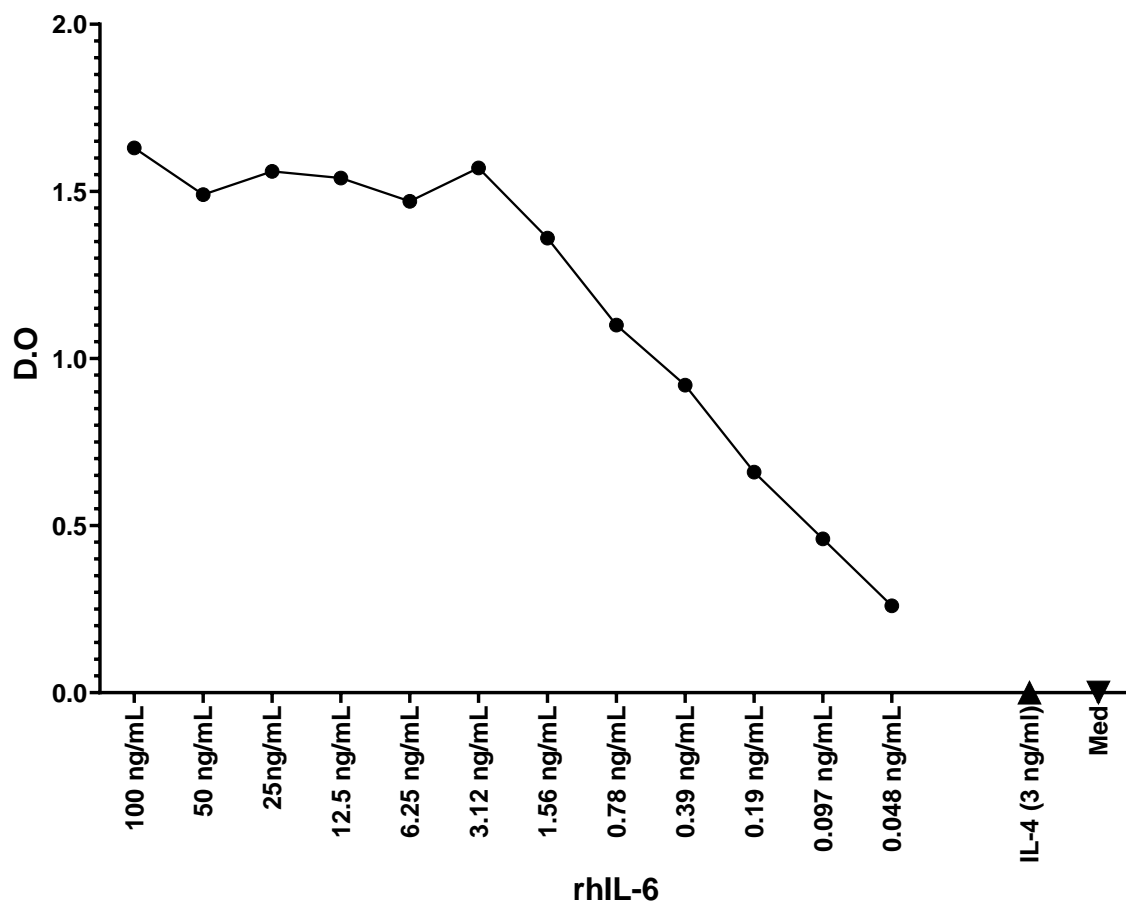


Figura 41. Determinación de la concentración de rhIL-6 para estimular de la línea celular HEK-Blue IL-6. Se presentan los niveles de D.O obtenidos empleando las 12 diferentes concentraciones de rhIL-6 (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.097 y 0.048 ng/ml) y las condiciones sin estímulo (rhIL-4-a 3 ng/ml).

6.15.3 Ensayo de la función neutralizante de autoanticuerpos en la vía de señalización de IL-12 o IL-6

Considerando la variación de los niveles de autoanticuerpos anti-IL-12 detectados en las muestras de felinos de los diferentes grupos de enfermedad y tomando en cuenta que en estudios previos realizados por el equipo de trabajo, donde se ha observado que autoanticuerpos contra citocinas en niveles de MFI de 1500 pueden presentar inhibición de su citocina blanco; se evaluó la inhibición de la señalización de STAT-4 por autoanticuerpos anti-IL-12 con todas las muestras de felinos de los diferentes grupos de enfermedad.

El ensayo de la inhibición de la señalización por STAT-4 se llevó a cabo empleando la línea celular HEK-Blue IL-12 y la citocina rhIL-12, para el análisis de la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-12 se utilizó la citocina a una concentración de 20 ng/ml, la cual se pre-incubó con las muestras séricas (Pacientes e individuos clínicamente sanos), Medio de Prueba (control positivo de respuesta) o el anticuerpo monoclonal anti-IL-12 comercial (control positivo de inhibición). Considerando el valor promedio de D.O. del control positivo de respuesta como el 100 % de ésta, se realizó el cálculo de los valores de porcentaje de inhibición para cada muestra.

Los resultados de este análisis se presentan en la **Figura 42**, en donde podemos observar valores mayores de porcentaje de inhibición en los grupos de pacientes al compararse con los individuos clínicamente sanos, existiendo una diferencia estadísticamente significativa; así mismo, los valores de porcentaje de inhibición fueron mayores en el grupo de pacientes **FIVV (PCR negativos)**. Para determinar si existía una diferencia significativa entre los diferentes grupos de enfermedad se calcularon valores de P asumiendo una distribución no gaussiana mediante la prueba U de Mann-Whitney, los cuales fueron $p > 0.05$ por lo que no hubo una diferencia significativa entre los grupos de pacientes.

Por otra parte, para determinar si existía una relación entre los niveles de autoanticuerpos contra IL-12 y el porcentaje de inhibición de la señalización por STAT4, se elaboró la **Figura 43** en dónde se presentan los valores de MFI de los autoanticuerpos anti-IL-12 en el eje de las X y en el eje de las Y los valores de porcentajes de inhibición

del efecto de la IL-12 evaluando la señalización por STAT4 en las HEK-Blue IL-12, posteriormente se llevó a cabo un análisis de correlación en el que se obtuvo un valor de $p= 0.7$ y una $r= 0.04$, indicando una correlación nula entre estas variables.

Por otra parte, el ensayo de la inhibición de la señalización por STAT-3 se llevó a cabo empleando la línea celular HEK-Blue IL-6 y la citocina rhIL-6, para el análisis de la actividad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6Ra se utilizó la citocina a una concentración de 0.75 ng/ml, la cual se pre-incubó con las muestras séricas (pacientes e individuos clínicamente sanos), Medio de Prueba (control positivo de respuesta) o el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 comercial (control positivo de inhibición). Considerando el valor promedio de D.O. del control positivo de respuesta como el 100 % de ésta, se realizó el cálculo de los valores de porcentaje de inhibición para cada muestra. Los resultados de este análisis mostraron que los autoanticuerpos anti-IL-6Ra detectados en las muestras séricas no presentaron efecto de neutralización de la función de esta citocina recombinante (resultados no mostrados).

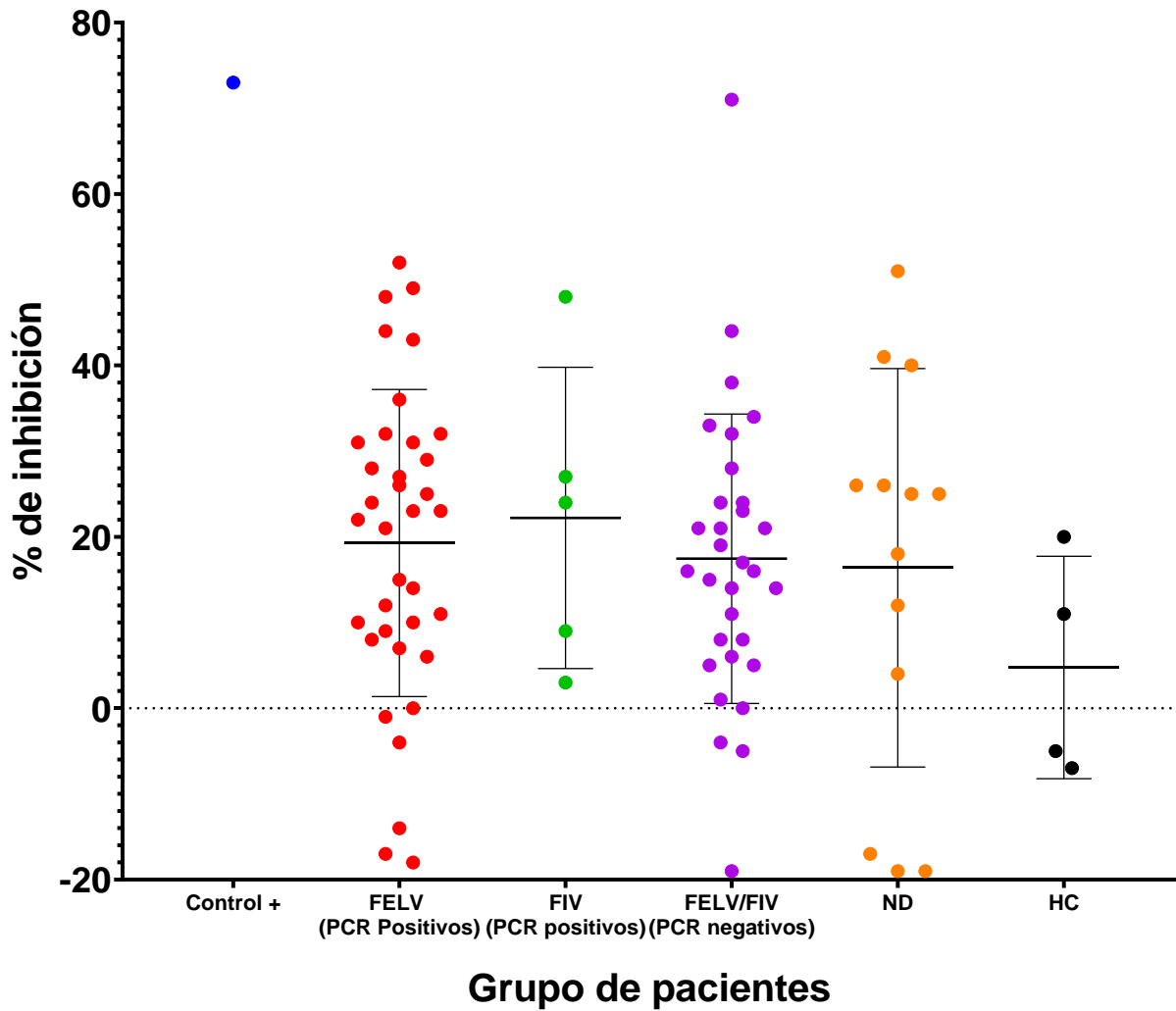


Figura 42. Porcentaje de inhibición de la señalización por STAT-4 de IL-12. Niveles de porcentaje determinados en muestras de pacientes e Individuos clínicamente sanos. Las enfermedades fueron agrupadas en: FELV (PCR Positivos), FIV (PCR Positivos), FELV/FIV (PCR Negativos), No diagnosticados (ND), así mismo se incluye el anticuerpo monoclonal anti-IL-12 biotinilado como control positivo de inhibición y muestras de individuos clínicamente sanos (HC) como controles negativos.

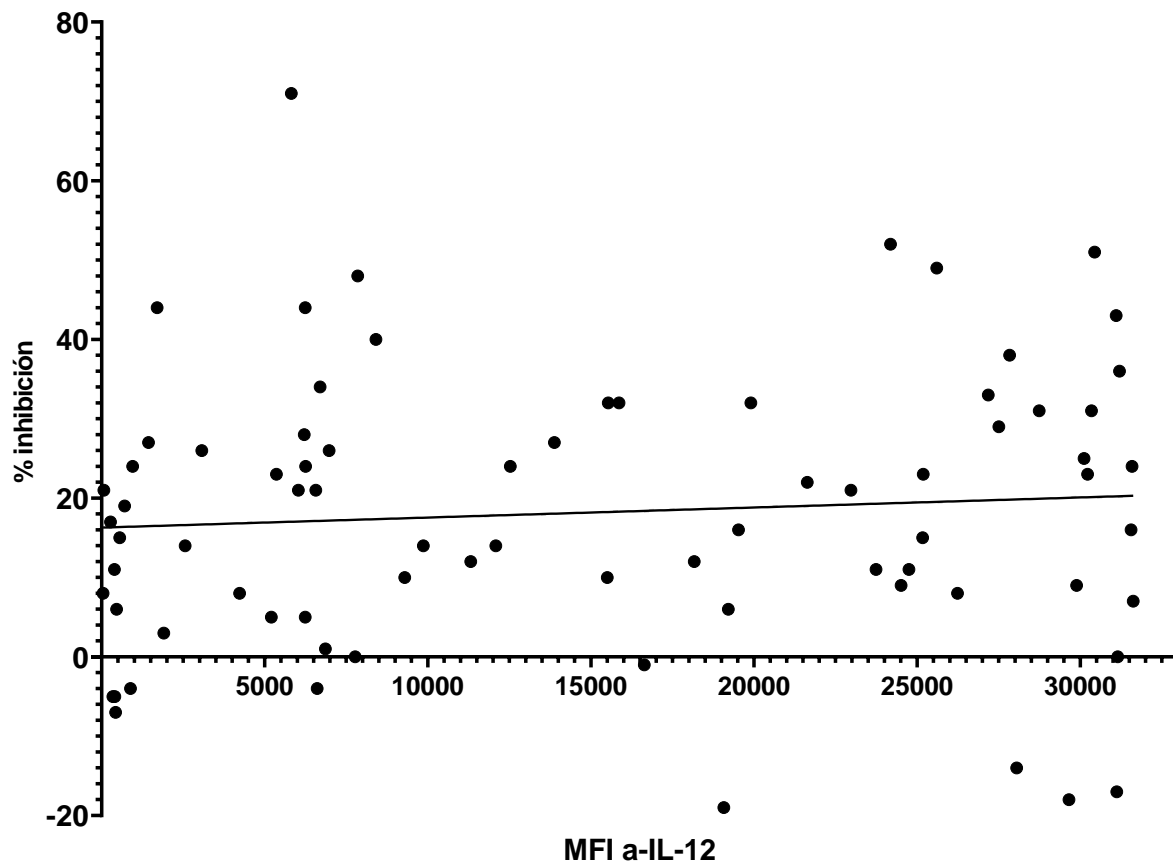


Figura 43. Gráfica de dispersión de los valores de MFI de autoanticuerpos anti-IL-12 y los valores de porcentaje de inhibición del efecto de la IL-12 sobre la señalización por STAT4 en las HEK-Blue IL-12.

7. DISCUSION

Recientemente, los autoanticuerpos anti-citocinas se han descrito como una importante y emergente causa de padecimientos. Existen diversas enfermedades, como la proteinosis alveolar pulmonar causada por la presencia de autoanticuerpos contra el GM-CSF, infecciones con micobacterias no tuberculosas, debido a la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ ; así como, la prevalencia de autoanticuerpos contra IL-12 e IFN γ en individuos con miastenia gravis y timoma (Barcenas-Morales, Jandus, & Döffinger, 2016; Browne, 2014; Browne & Holland, 2010a; Meager *et al.*, 2003).

Los pacientes con severa susceptibilidad a infecciones producidas por bacterias intracelulares pueden presentar altos niveles de autoanticuerpos hacia IFN γ , una citocina que es de crucial importancia para la eliminación de este tipo de patógenos tales como *Mycobacterium* y *Salmonella*. También se han reportado autoanticuerpos contra IL-6 en pacientes con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente. Estudios más recientes relacionan una susceptibilidad a infecciones por hongos a la presencia de 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-IL-12 también se manifiestan en artritis reumatoide, timoma y ciertos tipos de cánceres (Meager *et al.*, 2003).

7.1 Evaluación de los sistemas citocina-microesfera

El disponer de sistemas citocina-microesfera que permitan el análisis de muestras séricas para detectar la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas, representa una enorme ventaja en el diagnóstico de infecciones atípicas recurrentes en pacientes que no tienen antecedentes de padecimientos genéticos 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).

A pesar de que, comercialmente, es posible obtener sistemas de anticuerpos acoplados a microesferas de poliestireno para detectar niveles de citocinas en diferentes

tipos de muestras; no existe la disponibilidad comercial de sistemas de citocinas acopladas a microesferas para la detección de anticuerpos anti-citocinas, por lo que la elaboración de estos sistemas de acoplamiento fue de gran importancia práctica para llevar a cabo el presente estudio, donde se consideró la realización de la evaluación de los sistemas citocinas-microesfera para demostrar que existió un exitoso acoplamiento covalente entre los grupos aminos primarios de las citocinas y los grupos carboxilos funcionales que se encuentran en la superficie de las microesferas, confirmando también 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 su uso 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. Resultados similares fueron reportados en estudios anteriores en donde no se observó una interferencia entre los diferentes sistemas analizados (Autran, 2019; Cortes, 2019).

7.2 Autoanticuerpos anti-citocinas en humanos

El análisis de los resultados de pacientes humanos se enfocó en las 123 muestras que presentaron valores altos de MFI (≥ 12800), indicando altos niveles de autoanticuerpos contra 23 citocinas (IFN α , IFN β , IFN ω , IFN γ , IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-23, IL-6, IL-12, IL-33, TNF α , BAFF, IL-10, vIL-10 (CMV), vIL-10 (EBV), IL-8, IL-27, G-CSF, GM-CSF) y un receptor (IL-6Ra).

De ésta forma, en pacientes con **Enfermedades Autoinmunes**, principalmente con enfermedad inflamatoria intestinal se detectó la presencia de autoanticuerpos contra IL-10, ésta citocina es secretada por linfocitos CD4⁺Th2, células CD4⁺Treg1, mastocitos y linfocitos B; su principal función es antiinflamatoria, ya que inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF α e IL-12 (Wang *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2001); reportes recientes mencionan que la disfunción de ésta citocina y de su receptor en humanos pueden causar enterocolitis severa como en el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal (Meng, 2019; Zhu, 2017; Engelhardt, 2014). Así mismo, en estudios

recientes se observó una disminución en la producción de IL-10 en pacientes con enfermedad celiaca (Hofmann, 2018), por lo que la detección de la presencia de autoanticuerpos contra IL-10 en el presente estudio podría ser un factor importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como se presentó en los pacientes con padecimientos intestinales (enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedad celiaca).

De igual forma, en pacientes con esclerosis múltiple se detectaron autoanticuerpos anti-IL-6. La IL-6 es una citocina producida por monocitos activados, células T y células endoteliales, en el sistema nervioso central es expresada por células neuronales y de la glía; esta citocina presenta un efecto pleiotrópico en la inflamación, la respuesta inmune y la hematopoyesis (Tanaka, 2014; Ertu, 2012; Stelmasiak, 2000). Estudios previos reportan que la expresión de IL-6 en pacientes con esclerosis múltiple complica las manifestaciones clínicas promoviendo la generación de células Th17 patogénicas en órganos linfoides periféricos (Samoilova *et al.*, 1998; Petkovik & Castellano, 2016). Por otra parte, se han reportado altas concentraciones de IL-6 en sueros de pacientes que presentaron periodos más largos de la esclerosis múltiple; así mismo se ha documentado un incremento en la expresión de IL-6 en monocitos de pacientes con esclerosis múltiple (Stampanoni *et al.*, 2020; Stelmasiak *et al.*, 2000). Por lo tanto, en el presente trabajo, se podría especular que los autoanticuerpos contra la IL-6 detectados en los pacientes con enfermedades autoinmunes podrían estar exacerbando la función inflamatoria en el individuo hasta el punto de producir el cuadro autoinmune.

Por otra parte, BAFF es un componente esencial de la respuesta inmune innata, es producido por células dendríticas y neutrófilos, funcionalmente inducen la expresión de receptores tipo Toll (TLR) en células B y coopera con señales duales BCR/TLR que impulsan la diferenciación de células B independientes de linfocitos T (Jackson & Davidson, 2019). En general, la señalización combinada de BCR/TLR9 induce la proliferación de células B seguida de muerte celular por apoptosis; sin embargo, Sindhava *et al.* en 2017, reportaron que un exceso de BAFF permite que células B post proliferativas se diferencien en células plasmáticas de vida corta, capaces de causar un efecto patógeno (Sindhava *et al.*, 2017). En el presente estudio, también se detectaron altos niveles de autoanticuerpos contra BAFF en pacientes con **Enfermedades Autoinmunes**, estos resultados concuerdan con lo reportado por Price *et al.* en 2013,

quienes identificaron autoanticuerpos contra BAFF en el suero de pacientes con problemas autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (LES) y demostró que estos autoanticuerpos neutralizan la actividad de BAFF en cultivos celulares; 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 (Price *et al.*, 2013).

En pacientes con **Enfermedades Infecciosas**, principalmente con infección por SARS-CoV-2 se detectó la presencia de dos patrones importantes de autoanticuerpos, uno hacia IFN α e IFN ω y otro únicamente a IFN α . El SARS-CoV-2 es un virus perteneciente a la familia de los coronavirus y es causante de la enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19); el genoma del virus SARS-CoV-2 está comprendido por una cadena de RNA en sentido positivo y codifica cuatro proteínas estructurales, siendo la proteína espiga (S, *spike*), la proteína de envoltura (E, *envelope*), la proteína de membrana (M, *membrane*) y la proteína nucleocápside (N, *nucleocapsid*); se considera que las proteínas S y N son los inmunógenos principales del virus (Yang, 2020; Hu, 2020; Zhu, 2019; Meyer, 2014).

El IFN α y el IFN ω forman parte de los interferones tipo I, los cuales son un gran subgrupo de proteínas interferón que ayudan a regular la actividad del sistema inmunológico y su secreción se induce como respuesta a la presencia de ARN viral de simple o doble cadena. Interesantemente, la detección de autoanticuerpos contra estos dos interferones en pacientes positivos a SARS-CoV-2 encontrada en el presente estudio coincide con lo reportado por Bastard *et al.* en el 2020, en dónde reporta la presencia de autoanticuerpos contra interferones tipo I en el 13.7 % de los pacientes estudiados con COVID-19 en un estado crítico, remarcando la importancia de este tipo de interferones en la inmunidad protectora contra SARS Cov-2 y estableciendo una relación entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes contra interferones tipo I y la complicación de COVID-19 (Bastard, 2020).

Por otra parte, seis pacientes del grupo de **Enfermedades Infecciosas** que padecían infecciones micobacterianas y virales presentaron niveles considerables de autoanticuerpos contra IFN γ , coincidiendo con una serie de estudios anteriores que reportan que pacientes con severa susceptibilidad a infecciones producidas por bacterias

intracelulares pueden presentar altos niveles de autoanticuerpos hacia IFN γ , el cual es de crucial importancia para la eliminación de este tipo de patógenos tales como *Mycobacterium* y *Salmonella* (Barcenás-Morales, 2016; Browne, 2014; Browne & Holland, 2010a; Doffinger *et al.*, 2004; Höfllich *et al.*, 2004; Meager *et al.*, 2003).

Así mismo, se identificaron autoanticuerpos contra IL-6 principalmente en pacientes del grupo de **Enfermedades Infecciosas** producidas por diversos agentes patógenos (bacterias, virus y hongos). La IL-6 tiene gran importancia en la inmunocompetencia a través de su papel en la defensa contra infecciones virales, parasitarias, fúngicas y bacterianas (Velázquez-Salinas *et al.*, 2018; Rose-John *et al.*, 2017; Neveu *et al.*, 2009). En estudios previos, se ha confirmado la presencia de autoanticuerpos neutralizantes anti-IL-6 en pacientes humanos con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente (Nanki *et al.*, 2013; Puel, 2013; Puel *et al.*, 2008a). Por otra parte, se ha reportado que la sobreexpresión de IL-6 durante la respuesta inmune viral podría inducir la persistencia viral, al afectar la polarización, así como la funcionalidad de las células Th1, viéndose disminuida la capacidad lítica de las células T CD8 a través de diferentes mecanismos, causando infecciones crónicas (Velázquez-Salinas *et al.*, 2019); por lo tanto, los autoanticuerpos contra las IL-6 detectados en el presente trabajo podrían estar inhibiendo la función de la citocina ocasionando un incremento en la susceptibilidad a infecciones.

Con respecto a los pacientes que sufren de una proteinosis alveolar pulmonar (PAP) del grupo de **Otras enfermedades**, presentaron autoanticuerpos contra el GM-CSF. El GM-CSF es importante para la diferenciación y función de los macrófagos alveolares y es necesario para la eliminación del colesterol en estos macrófagos, siendo la reducción de esta función del GM-CSF la principal causa de la acumulación del colesterol impulsando el desarrollo de la Proteinosis Alveolar Pulmonar (PAP); por lo tanto los autoanticuerpos contra GM-CSF, detectados en pacientes con este padecimiento, podrían estar afectando la función de la citocina hasta el punto de producir el cuadro clínico de PAP, lo cual coincide con estudios previos en los que se confirma una relación entre la función afectada de GM-CSF por la presencia de autoanticuerpos y PAP, resultando grados variables de insuficiencia respiratoria y disfunción de células mieloides, lo que aumenta el riesgo de infecciones (Knight, 2016; Carey, 2010; Kitamura *et al.*, 1999).

7.3 Relación de la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ con el desarrollo del cuadro clínico de COVID-19.

Por otra parte, se analizó si existe una posible relación entre la presencia de autoanticuerpos anti-IFN γ y el desarrollo de la enfermedad COVID-19 en los grupos de pacientes asintomáticos y enfermos, detectando anti-IFN γ en ambos de ellos, no observando una relación directa entre los niveles presentes de estos autoanticuerpos y la el desarrollo del cuadro clínico de COVID-19; dichos resultados no concordaron con lo reportado para los autoanticuerpos contra los IFNs tipo I, en donde se observó una relación clara entre la presencia de altos niveles de autoanticuerpos anti-IFN α y anti-IFN ω , y el desarrollo de cuadros clínicos más severos de COVID-19 (Bastard et al., 2020). Sin embargo, estos resultados sugieren que la aparición de autoanticuerpos anti-IFN γ se desarrolla durante el curso de la infección por SARS-Cov2, lo que permite especular que su capacidad neutralizante contra IFN γ es limitada al no observar una diferencia significativa de los niveles de autoanticuerpos contra IFN γ entre los grupos de pacientes asintomáticos (COV-Asx) y de pacientes con cuadros clínicos correspondientes a COVID-19 (COV-Pat).

7.4. Purificación de autoanticuerpos anti-IFN γ

Por otra parte, en este estudio se realizó la purificación de autoanticuerpos contra citocinas a partir de cuatro muestras séricas positivas a autoanticuerpos contra IFN γ , empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Con respecto a esta técnica, se puede mencionar que resultó exitosa, lo cual se demostró empleando el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex), obteniendo valores de MFI menores en la muestra sérica después de pasarla por la Columna-IFN γ que en la muestra pre-columna o después de su paso por la columna-BSA; mientras que después de los lavados (fracciones que presentaron valores bajos de MFI), cuando se inició con la elución de los autoanticuerpos unidos en la columna-IFN γ , se obtuvieron valores considerables de MFI en algunas de las fracciones eluidas, confirmándose la obtención de los autoanticuerpos anti-IFN γ purificados.

La técnica de cromatografía de afinidad por columna aprovecha la característica de que para la formación del complejo antígeno-anticuerpo intervienen enlaces no covalentes 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 IFN γ , mostró un incremento de los valores de MFI con el cambio a un pH más ácido (pH2.0), esto concuerda con el reporte de Schoenardie *et al.*, donde menciona que 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 disocien más fácilmente del antígeno, mientras que aquellos con mayor afinidad requieran un medio más ácido (pH. 2.0), para ser eluidos de la columna (Schoenardie, 2014). Por lo tanto, los autoanticuerpos eluidos E8-E9 obtenidos empleando un pH. 2.0 presentan mayor afinidad a IFN γ en comparación con los eluidos E1 al E4 obtenidos a pH. 2.8, coincidiendo con estudios previos en los que se evaluó la avidéz de autoanticuerpos purificados, en los que se presentó un mayor índice de avidéz en los eluidos que se obtienen con el buffer a un pH. 2.0 (Zavala, 2016).

7.5. Epítos reconocidos por autoanticuerpos anti-citocinas y su efecto en la actividad biológica de estos mediadores

Los autoanticuerpos anti-IL-6 detectados en las muestras séricas reconocieron principalmente al Epitope2, cuya secuencia (⁵⁵EALAENLN⁶³) interacciona con una región de la subunidad gp130 del receptor de IL-6, siendo este complejo el primer evento en la activación de la vía de señalización de IL-6, por lo que el reconocimiento de este epítipo por los autoanticuerpos anti-IL-6 pudieran estar afectando la unión de esta citocina con su receptor (IL-6Ra), específicamente con la subunidad gp130; afectando la actividad biológica de IL-6 y su vía de señalización (Zhang *et al.* 2015, Balliu, 2019).

Considerando que los autoanticuerpos que reconocieron al Epitope2 presentaron un incremento en la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6, es importante mencionar que la señalización de IL-6 se presenta por dos vías; la clásica y la trans. La señalización clásica se da cuando la citocina reconoce al receptor unido a la membrana celular,

mientras que la señalización trans requiere que la citocina se une a la forma soluble del receptor (sIL-6Ra) (Rose-John, 2012). Así mismo, Scheller *et al.* en el 2006 reportaron que la forma soluble de gp130 (sgp130) inhibe la respuesta de IL-6 mediada por sIL-6Ra sin interferir en la señalización clásica, mencionando que, en modelos de inflamación, esta inhibición de la vía trans fue suficiente para disminuir el progreso de la inflamación (Scheller, 2006). Por lo que el incremento los autoanticuerpos anti-IL-6 detectados en algunas de las muestras podrían estar inhibiendo la interacción entre sIL-6Ra y sgp130 favoreciendo la señalización y produciendo el cuadro inflamatorio que presentaban los pacientes.

Así mismo, se observó que los autoanticuerpos anti-IL-6 que no reconocieron ninguno de los tres epítopes analizados presentaron una inhibición de la fosforilación de STAT-3, por lo que el reconocimiento de estos autoanticuerpos y su consecuente función neutralizante podría ser ocasionada por una interacción del autoanticuerpo con un epítipo conformacional de la citocina.

De forma interesante, la secuencia del epítipo principal presentó una homología alta con dos secuencias de *Staphylococcus sp.* lo cual sugiere que el mimicroismo molecular podría ser un mecanismo subyacente al desarrollo de estos autoanticuerpos, sin embargo, no se cuenta con evidencia directa de exposición previa a *Staphylococcus sp.* de los pacientes analizados.

Por otra parte, el Epítipo1 reconocido por autoanticuerpos anti-IFN γ , éste presenta una secuencia de aa (¹¹²HELIQVMAELSPA¹²⁴), que se localiza en una zona de importancia para la activación de la vía del IFN γ , ya que es la secuencia de aa que está involucrada en la unión del IFN γ con IFN γ R1, donde la interacción de los autoanticuerpos con el epítipo sugiere una posible inhibición de la unión de la citocina con su receptor, neutralizando la función biológica del IFN γ humano (Yassamut, 2019). Dicha sugerencia puede ser soportada considerando los resultados de la evaluación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-IFN γ , en donde se observó una inhibición de la actividad biológica de la citocina, coincidiendo con reportes previos, donde se demostró que estos autoanticuerpos presentan una función neutralizante sobre la actividad biológica del IFN γ en ensayos *in vitro* (Döffinger *et al.*, 2004; Höflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005).

7.6 Autoanticuerpos anti-citocinas en felinos

Por otro lado, el análisis de los resultados de pacientes felinos se enfocó en las 53 muestras que presentaron valores MFI $\geq 12,000$ indicando altos niveles de autoanticuerpos contra seis citocinas (IFN γ , IL-28B, IL-6, IL-12, IL-10 e IL-18) y dos receptores (IL-6Ra e IL-28Ra).

Se detectaron niveles considerables de autoanticuerpos contra IL-12 e IL-6Ra en pacientes positivos a FELV, y solo a IL-12 en pacientes con FIV. FELV y FIV son causas comunes de inmunodeficiencias secundarias en felinos, sin embargo, los mecanismos de desarrollo aún siguen siendo estudiados (Sykes, 2010). Ambos virus son responsables de una importante morbilidad y mortalidad en la población felina, estando asociados con numerosas enfermedades multisistémicas y trastornos generalmente crónicos de los gatos, por lo que los signos clínicos son variados (Hartmann, 2012; Willis, 2000). La IL-12 es una citocina involucrada en la inducción y regulación de respuestas antivirales ya que está participa en la activación de la citotoxicidad en las células CD8 + T y NK, especialmente potenciando la producción IFN γ (Leutenegger *et al.*, 2000; Gherardi, 2000). Además, existen estudios en humanos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que reportan una actividad anormal de la IL-12 en donde las células infectadas con VIH presentan una alteración en las dos subunidades que la forman y dicha alteración ha sido también descrita en felinos positivos a FIV (Leutenegger *et al.*, 2000).

Debido a la carencia de reportes de autoanticuerpos anti-citocinas relacionados con enfermedades infecciosas y/u otros padecimientos en felinos, no es posible contrastar la información obtenida en el presente estudio con otros trabajos, para establecer una relación más clara de la presencia de estos autoanticuerpos y ciertos tipos de afecciones. Sin embargo, existen estudios en caninos en donde se reporta una relación entre la presencia de diferentes autoanticuerpos anti-citocinas y el desarrollo de diversas patologías, observando niveles considerables de autoanticuerpos contra citocinas de la familia de la IL-12, como lo es la IL-23, en pacientes con enfermedades autoinmunes o infecciosas (Autran, 2019). Así mismo, en otro estudio se detectaron altos niveles de autoanticuerpos contra IL-12 en muestras séricas de pacientes caninos con enfermedades autoinmunes o infecciosas (Cortes, 2019). De igual forma Kampmann en

2005 y DeLeon en el 2014, asocian pacientes humanos presentando enfermedades autoinmunes e infecciosas (principalmente con micobacterias no tuberculosas) con la presencia de autoanticuerpos contra ciertos componentes del sistema inmunitario, como son las citocinas IFN γ e IL-12 (DeLeon, Chung, Opal, & Dworkin, 2014; Kampmann *et al.*, 2005).

8. CONCLUSIONES

8.1 Los sistemas de citocina-microesfera elaborados presentaron un alto grado de acoplamiento y una integridad antigénica viable, así mismo, no existió una interferencia entre los diferentes sistemas, permitiendo su uso en el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bioplex.

8.2 Se detectó la presencia de autoanticuerpos contra al menos una de 23 diferentes citocinas y un receptor en 41% de los pacientes humanos analizados; así mismo, se confirmó la utilidad de sistemas con citocinas humanas recombinantes para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas en la especie felina, detectándose autoanticuerpos contra al menos una de seis citocinas y un receptor en 39% de los pacientes.

8.3 Existió una relación de la presencia de autoanticuerpos contra IL-6, IFN γ , GM-CSF, IL-10, BAFF, IL-28B, IFN α o IFN ω , y los cuadros clínicos de pacientes que presentaban enfermedades infecciosas o autoinmunes; sin embargo, no se observó una relación directa entre los niveles autoanticuerpos anti-IFN γ y la severidad de COVID-19.

8.4 Los autoanticuerpos contra IL-6 o IFN γ detectados presentaron un efecto sobre la actividad biológica de estos mediadores químicos, el cual podría estar relacionado con el reconocimiento de los epítopes identificados de estas citocinas.

8.5 La alta homología entre las secuencias de los epítopes reconocidos por autoanticuerpos contra IL-6 o IFN γ y las secuencias proteicas de microorganismos, sugiere un mecanismo de mimetismo molecular como una posible causa del desarrollo de estos autoanticuerpos.

8.6 La correlación nula entre los niveles de autoanticuerpos anti-IL-12 y la función biológica neutralizante, así como la ausencia de una diferencia significativa entre los diferentes grupos de pacientes felinos analizados, sugiere que estos autoanticuerpos podrían no estar implicados en el desarrollo de infecciones virales.

8.7 La relación determinada entre la presencia de autoanticuerpos contra citocinas y ciertos padecimientos en humanos soporta la posible utilización del ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple para la detección de autoanticuerpos anti-citocinas, como una herramienta para el diagnóstico de ciertas enfermedades infecciosas o autoinmunes.

9. REFERENCIAS

- Altare, F., Durandi, A., Lammas, D., *et al.* (1998). Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 280(5368):1432-5.
- Autran-Martínez, M., Cortes-Acevedo, P., Cerón-Gutiérrez, L., Davies, S., Mendoza-Elvira, E. S., Martínez-Rodríguez, H. A., ... Barcenas-Morales, G. (2019). High incidence of anti-cytokine autoantibodies in dogs with immune diseases suggests important immuno-regulatory functions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 214, 109902. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2019.109902>
- Baerlecken, N., Jacobs, R., Stoll, M., Schmidt, R. E., & Witte, T. (2009). Recurrent, Multifocal *Mycobacterium avium-intercellulare* Infection in a Patient with Interferon- γ Autoantibody. *Clinical Infectious Diseases*, 49(7), e76–e78. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1086/605581>
- Bakiri, A. H., & Mingomataj, E. Ç. (2019). Novel Insights on Interleukin-10 Functions: A Manipulative Tool for the Deviation of Immune Response and Disease Outcome. *EMJ EUROPEAN MEDICAL JOURNAL*.
- Barcenas-Morales, G., Cortes-Acevedo, P., & Doffinger, R. (2019). Anticytokine autoantibodies leading to infection: early recognition, diagnosis and treatment options. *Current opinion in infectious diseases*, 32(4), 330–336. doi:10.1097/QCO.0000000000000561
- 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>
- Bastard, P., Rosen, L. B., Zhang, Q., Casanova, J. L., *et al.* (2020). Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6515), eabd4585. <https://doi.org/10.1126/science.abd4585>
- Bellanti, J. (2016). *Inmunología IV, Aplicaciones Clínicas en Salud y Enfermedad*. I Care Press.
- Bizikova, P., & Burrows, A. (2019). Feline pemphigus foliaceus: original case series and a comprehensive literature review. *BMC veterinary research*, 15(1), 22. doi:10.1186/s12917-018-1739-y
- Bliss, S. K., Marshal, A. J., & Zhang, Y. (1999). Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF- α , and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 α and -1 β in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *Journal of Immunology*, 162.
- 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., *et al.* (2003). Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor beta 1 deficiency. *Clin Infect Dis* 37(2):302-6
- Carey, B., & Trapnell, B. C. (2010). The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 135(2), 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.02.017>
- Chruewkamlow, N., Mahasongkram, K., Pata, S., Chaiwarith, R., Salee, P., Supparatpinyo, K., & Kasinrerker, W. (2016). Immune Alterations in Patients with Anti-Interferon- γ Autoantibodies. *PloS one*, 11(1), e0145983. doi:10.1371/journal.pone.0145983
- 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>
- Cortes, P. (2016). Elaboración de sistemas de acoplamiento de quimiocinas a microesferas para el análisis de la presencia de autoanticuerpos en muestras séricas. UNAM FES Iztacala.
- Cortes, P. (2019). Estudio de autoanticuerpos contra citocinas y quimiocinas en muestras séricas de caninos y humanos. UNAM FES Cuautitlán.
- Crouse, J., Kalinke, U., & Oxenius, A. (2015). Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nature Reviews Immunology* 2015 15:4, 15(4), 231–242. <https://doi.org/10.1038/nri3806>
- 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.
- Dinareello, 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 - γ 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., *et al.* (2014). IL-28B is a key regulator of B- and T-cell vaccine responses against influenza. *PLoS pathogens*, 10(12), e1004556. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004556>
- Engelhardt, K. R., & Grimbacher, B. (2014). IL-10 in humans: lessons from the gut, IL-10/IL-10 receptor deficiencies, and IL-10 polymorphisms. *Current topics in microbiology and immunology*, 380, 1–18. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_1
- 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>

- Erta, M., Quintana, A., & Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International journal of biological sciences*, 8(9), 1254–1266. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4679>
- Gershwin, L.J., (2017). Current and Newly Emerging Autoimmune Diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 48, 323-338.
- Gherardi, M. M., Ramírez, J. C., & Esteban, M. (2000). Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. *Journal of virology*, 74(14), 6278–6286. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.14.6278-6286.2000>
- Gocher, A. M., Workman, C. J., & Vignali, D. A. A. (2021). Interferon- γ : teammate or opponent in the tumour microenvironment? *Nature Reviews Immunology* 2021 22:3, 22(3), 158–172. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00566-3>
- Gupta, S. y Fernandes, G. (2001). Immunodeficiency: Scondary. *Encyclopedia Of Life Sciences*, John Wiley & sons.
- Gyles C. (2016). One Medicine, One Health, One World. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 57(4), 345–346.
- Hartmann K. (2012). Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*, 4(11), 2684–2710. <https://doi.org/10.3390/v4112684>
- Hewagama, A., & Richardson, B. (2009). The genetics and epigenetics of autoimmune disease. *Journal of Autoimmunity*, 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., ... Suttorp, N. (2004). Naturally occurring anti-IFN- γ 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>
- Hofmann, S. R., Laass, M. W., Fehrs, A., *et al.* (2018). IL10 promoter haplotypes may contribute to altered cytokine expression and systemic inflammation in celiac disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 190, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.02.010>
- Holdsworth, S. R., & Gan, P.-Y. (2015). Cytokines: Names and Numbers You Should Care About. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(12), 2243 LP – 2254. <https://doi.org/10.2215/CJN.07590714>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- 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>
- Ivashkiv, L. B. (2018). IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2018 18:9, 18(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>

- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2013). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology* 2014 14:1, 14(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Iyer, S. S., & Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(1), 23. <https://doi.org/10.1615/CRITREVIMMUNOL.V32.I1.30>
- 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>
- Jackson, SW, Davidson, A. BAFF inhibition in SLE—Is tolerance restored? *Immunol Rev.* 2019; 292: 102– 119. <https://doi.org/10.1111/imr.12810>
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 64–79. https://doi.org/10.1515/BMC-2018-0007/ASSET/GRAPHIC/J_BMC-2018-0007_FIG_002.JPG
- 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- γ . *Journal of Clinical Investigation*, 115(9), 2480–2488. <https://doi.org/10.1172/JCI19316>
- Kärner, J., Meager, A., Laan, M., Maslovskaia, 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>
- 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.
- 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>
- Knight, V., Merkel, P., O Sullivan, M., 2016. Anti-cytokine Autoantibodies: Association with Infection and Immune Dysregulation. *Antibodies*

- Koopmann, W., Ediriwickrema, C., & Krangel, M. S. (1999). Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage-inflammatory protein-1 β . *The Journal of Immunology*, 163(4), 2120.
- Lahera, T. (2010). Conexión entre inmunodeficiencia primaria y autoinmunidad. *Rev. Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 26 (1) 198-205
- Leutenegger, C. M., Boretti, F. S., Mislin, C. N., *et al.* (2000). Immunization of cats against feline immunodeficiency virus (FIV) infection by using minimalistic immunogenic defined gene expression vector vaccines expressing FIV gp140 alone or with feline interleukin-12 (IL-12), IL-16, or a CpG motif. *Journal of virology*, 74(22), 10447–10457. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.22.10447-10457.2000>
- Lee, K. M. C., Achuthan, A. A., & Hamilton, J. A. (2020). GM-CSF: A Promising Target in Inflammation and Autoimmunity. *ImmunoTargets and Therapy*, 9, 225–240. <https://doi.org/10.2147/ITT.S262566>
- 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>
- Linenberger, M. L., & Deng, T. (1999). The effects of feline retroviruses on cytokine expression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(3-4), 343–368. doi:10.1016/s0165-2427(99)00147-6
- Liu, J., Cao, S., Kim, S., Chung, E. Y., Homma, Y., Guan, X., Jimenez, V., & Ma, X. (2005). Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Current Immunology Reviews*, 1(2), 119–137. <https://doi.org/10.2174/1573395054065115>
- Madariaga, L., Amurrio, C., Martín, G., García-Cebrian, F., Bicandi, J., Lardelli, P., Suarez, M., Dolores, Cisterna, R. (1998). Detection of anti-interferon-gamma autoantibodies in subjects infected by *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2: 62-68
- 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>
- Magdeldin, Sameh & Moser, Annette. (2012). *Affinity Chromatography: Principles and Applications*. 10.5772/39087.
- Meager, A.; Wadhwa, M; Dilger, P.(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>

- Meng, Danli & Liang, Liexin & Guo, Xianwen. (2019). Serum interleukin-10 level in patients with inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *European Journal of Inflammation*. 17. 205873921984340. 10.1177/2058739219843405.
- Meyer, B., Drosten, C., & Müller, M. A. (2014). Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls. *Virus research*, 194, 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.018>
- MicroPlex® Non-Magnetic Microspheres | Coupled to Protein or Nucleic Acid. (n.d.). Retrieved March 21, 2023, from <https://www.luminexcorp.com/microplex-microspheres/#overview>
- Monastero, R. N., & Pentylala, S. (2017). Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *International journal of inflammation*, 2017, 4309485. doi:10.1155/2017/4309485
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19, 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- Nanki, T., Onoue, I., Nagasaka, K., *et al.* (2013). Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Annals of the rheumatic diseases*, 72(6), 1100–1102. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202768>
- Neveu, W. A., Allard, J. B., Dienz, O., *et al.* (2009). IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(3), 1732–1738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802923>
- Niemand, C., Nimmegern, A., Haan, S., *et al.* (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>
- Olivry, T. (2018). Auto-immune skin diseases in animals: Time to reclassify and review after 40 years. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1–2. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1477-1>
- Ouyang, W., & O'garra, A. (2019). Review IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50, 871–891. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>
- Patel, S. Y., Ding, L., Brown, M. R., Lantz, L., Gay, T., Cohen, S., ... Holland, S. M. (2005). Anti-IFN- γ Autoantibodies in Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Journal of Immunology*, 175(7), 4769–4776. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4769>
- Petković, F., & Castellano, B. (2016). The role of interleukin-6 in central nervous system demyelination. *Neural regeneration research*, 11(12), 1922–1923. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.195273>
- Picard, C., Fieschi, C., Altare, F., *et al.* (2002). Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet* 70(2):336-48.
- Price, J. V., Haddon, D. J., Kemmer, D., *et al.* (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., & Casanova, J. L. (2013). Autoantibodies against cytokines: back to human genetics. *Blood*, 121(8), 1246–1247. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-474213>
- 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.
- Rincón-Delgado, K. L., Tovar-Sánchez, C., Fernández-Ávila, D. G., & Rodríguez C., L. S. (2021). Role of cytokines in the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Revista Colombiana de Reumatología*, 28, 144–155. <https://doi.org/10.1016/J.RCREU.2021.05.018>
- Rose-John S. (2018). Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(2), a028415. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>
- Rose-John, S., Winthrop, K., & Calabrese, L. (2017). The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nature reviews. Rheumatology*, 13(7), 399–409. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.83>
- Rosen, L. B., Freeman, A. F., Yang, L. M., Jutivorakool, K., Olivier, K. N., Angkasekwina, N., ... Browne, S. K. (2014). Anti-granulocyte-macrophage colony stimulating factor autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis. *Journal of Immunology*, 190(8), 3959–3966. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202526>
- 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>
- Saijo, T., Chen, J., Chen, S. C., Rosen, L. B., Yi, J., Sorrell, T. C., ... Kwon-chung, K. J. (2014). Autoantibodies Are a Risk Factor for Central Nervous System Infection by *Cryptococcus gattii* in Otherwise Immunocompetent Patients. *MBio*, 5(2), 1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00912-14>. Editor
- Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161(12):6480-6. PMID: 9862671.
- 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., *et al.* (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>
- Sindhava, V. J., Oropallo, M. A., Moody, K., *et al.* (2017). A TLR9-dependent checkpoint governs B cell responses to DNA-containing antigens. *The Journal of clinical investigation*, 127(5), 1651–1663. <https://doi.org/10.1172/JCI89931>
- Stampanoni Bassi, M., Iezzi, E., Drulovic, J., *et al.* (2020). IL-6 in the Cerebrospinal Fluid Signals Disease Activity in Multiple Sclerosis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 120. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00120>
- Stelmasiak, Z., Koziol-Montewka, M., Dobosz, B., *et al.* (2000). Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 6(6), 1104–1108.
- Stenken, J. A., & Poschenrieder, A. J. (2015). Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. *Analytica chimica acta*, 853, 95–115. doi:10.1016/j.aca.2014.10.009
- 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>
- Sykes JE. Immunodeficiencies caused by infectious diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010;40:409–23.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- ThermoScientific. (2011). Instructions NHS and Sulfo-NHS. In Technical Report 24500. Pierce Biotechnology
- Trapnell, B. C., Nakata, K., Bonella, F., Campo, I., Griese, M., Hamilton, J., Wang, T., Morgan, C., Cottin, V., & McCarthy, C. (2019). Pulmonary alveolar proteinosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0066-3>
- 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>
- Ullrich, K. A. M., Schulze, L. I., Paap, E. M., Müller, T. M., Neurath, M. F., & Zundler, S. (2020). Immunology of IL-12: An update on functional activities and implications for disease. *EXCLI Journal*, 19, 1563–1589. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2020-3104>
- Velazquez-Salinas L, Verdugo-Rodriguez A, Rodriguez LL and Borca MV (2019) The Role of Interleukin 6 During Viral Infections. *Front. Microbiol.* 10:1057. doi: 10.3389/fmicb.2019.01057

- Velazquez-Salinas, L., Pauszek, S. J., Stenfeldt, C., O'Hearn, E. S., Pacheco, J. M., Borca, M. V., *et al.* (2018). Increased virulence of an epidemic strain of vesicular stomatitis virus is associated with interference of the innate response in pigs. *Front. Microbiol.* 9:1891. doi: 10.3389/fmicb.2018.01891
- 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>
- Wang, H., Wang, L., Chi, Pd. *et al.* High level of interleukin-10 in serum predicts poor prognosis in multiple myeloma. *Br J Cancer* 114, 463–468 (2016). <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.11>
- Werner, L. L., & Gorman, N. T. (1984). Immune-Mediated Disorders of Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 14(5), 1039–1064. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(84\)50106-5](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(84)50106-5)
- Wicks, I. P., & Roberts, A. W. (2015). Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 2015 12:1, 12(1), 37–48. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.161>
- Willis, A. (2000). Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 30(5), 971–986. doi:10.1016/s0195-5616(00)05001-4
- Winthrop, K. L., Chang, E., Yamashita, S., Iademarco, M. F., & LoBue, P. A. (2009). Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor- α therapy. *Emerging Infectious Diseases*, 15(10), 1556–1561. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090310>
- Yang, P., Wang, X. COVID-19: a new challenge for human beings. *Cell Mol Immunol* 17, 555–557 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0407-x>
- Zhang, J., Sadowska, G.B., Chen, X., Park, S.Y., Kim, J.E., Bodge, C.A., Cummings, E., Lim, Y.P., Makeyev, O., Besio, W.G., Gaitanis, J., Banks, W.A., Stonestreet, B.S., 2012. Anti-IL-6 neutralizing antibody modulates blood-brain barrier function in the ovine fetus. In *FASEB J*, pp. 1739-1753.
- Zhu, L., Shi, T., Zhong, C., Wang, Y., Chang, M., & Liu, X. (2017). IL-10 and IL-10 Receptor Mutations in Very Early Onset Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology research*, 10(2), 65–69. <https://doi.org/10.14740/gr740w>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, *et al.* (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

10. APÉNDICE

Citocinas y sus funciones

IFN γ

El IFN γ es el único miembro de los IFNs tipo II y es secretado por las células T (Th1 y T CD8+), células B y células NK. Es una citocina pleiotrópica que participa en las diferentes respuestas inmunológicas, tales como la inmunidad mediada por células, la inflamación, la producción de anticuerpos y la infección viral, siendo considerada la citocina clave en la defensa contra agentes infecciosos intracelulares. El IFN- γ activa los macrófagos en el sitio de la inflamación aumentando su capacidad fagocítica mediante la inducción de la autofagia para la eliminación de patógenos intracelulares y el aumento de la secreción de citocinas proinflamatorias. Además, puede regular la producción de anticuerpos para modular las respuestas de las células B. La producción de IFN γ puede ser inducida por citocinas (principalmente IL-12 e IL-18) o por la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Señala a través del IFN γ receptor (IFN γ R; que comprende el IFN γ R1 y el IFN γ R2 subunidades) y activa múltiples vías de señalización, especialmente las vías de JAK y STAT (Gocher *et al.*, 2021; Ivashkiv, 2018; Kak *et al.*, 2018; Rincón-Delgado *et al.*, 2021).

IL-6

La IL-6 es una citocina producida por varios tipos celulares (fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, macrófagos, células neuronales y de la glía, entre otras) en respuesta al daño tisular o a infecciones. IL-6 presenta actividad pleiotrópica que participa en la inflamación, la hematopoyesis y en la respuesta contra infecciones virales, parasitarias, fúngicas y bacterianas. La IL-6 induce la síntesis de proteínas de fase aguda en los hepatocitos y también desempeña un papel importante en la respuesta inmunitaria adquirida mediante la estimulación de la producción de anticuerpos y del desarrollo de células T efectoras. Además, la IL-6 puede promover la diferenciación o proliferación de varias células no inmunitarias. Señala a través de un complejo de receptores clase I constituido por IL-6 Ra y la subunidad gp130 activando una cascada de señalización de transducción a través de los factores STAT y JAK (Tanaka, 2014; Erta, 2012; Stelmasiak, 2000 Velazquez-Salinas *et al.*, 2018; Rose-John *et al.*, 2017; Neveu *et al.*, 2009).

GM-CSF

El GM-CSF es un factor de crecimiento hematopoyético, puede ser producida por células mieloides, CD, linfocitos T, linfocitos B y células no hematopoyéticas (tales como células endoteliales, condrocitos y células epiteliales alveolares de tipo II). Entre sus principales funciones se encuentra la diferenciación de células del linaje mieloide, el desarrollo y mantenimiento de macrófagos alveolares pulmonares, la activación de neutrófilos (incluyendo fagocitosis, estallido oxidativo y producción de óxido nítrico) y la angiogénesis. El GM-CSF ejerce sus funciones uniéndose a un receptor heterodimérico (GM-CSFR) que está constituido por una cadena α específica de unión a ligando de baja afinidad (GM-CSFR α) y dos cadenas β transductoras de señales (GM-CSFR β). La unión de GM-CSF a las dos cadenas inicia la señalización JAK-STAT (Lee *et al.*, 2020; Trapnell *et al.*, 2019; Wicks & Roberts, 2015)

IL-12

La IL-12 es una citocina proinflamatoria heterodimérica conformada por dos subunidades IL-12p40 e IL-12p35, es producida por macrófagos y células dendríticas (CD). La IL-12 es una citocina que induce la diferenciación de células T vírgenes en células Th1, así mismo, estimula la producción de IFN γ y TNF α a partir de células T por lo que está involucrada en la protección contra patógenos intracelulares. También participa en la activación de la citotoxicidad en las células CD8 + T y NK, especialmente potenciando la producción IFN γ . La IL-12 señala a través de un receptor heterodimérico formado por IL-12Rb1 e IL-12Rb2 induciendo la vía JAK-STAT (Leutenegger *et al.*, 2000; Gherardi, 2000; Liu *et al.*, 2005; Ullrich *et al.*, 2020).

IFNs tipo I

Los IFNs tipo I son un gran subgrupo de proteínas interferón que comprende al menos trece IFN α , dos tipos de IFN β y el IFN ω . Los IFN tipo I ayudan a regular la actividad del sistema inmunológico y son secretados por varios tipos de células como respuesta a la presencia de ARN viral de simple o doble cadena. Los IFNs tipo I presentan una capacidad para inducir directamente una respuesta antiviral dentro de las células infectadas y circundantes inhibiendo la replicación del virus e indirectamente mediante la estimulación de las respuestas inmunológicas antivirales, innata y adaptativa. Los IFNs

ejercen su efecto mediante la unión al receptor IFNR el cual consta de dos componentes distintos IFNAR1 e IFNAR2 (Crouse *et al.*, 2015; Ivashkiv & Donlin, 2013).

IL-10

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina es una citocina proinflamatoria que juega participa en la limitación de la respuesta inmunitaria del huésped a los patógenos, lo que previene el daño al huésped y mantiene la homeostasis normal del tejido. Es secretada por linfocitos CD4⁺Th2, células CD4⁺Treg1, mastocitos y linfocitos B. La IL-10 inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF α e IL-12. Como todas las citocinas, las respuestas celulares de la IL-10 dependen de las interacciones con sus receptores de superficie, para el caso de la IL-10 es el IL-10R. El receptor de hIL-10 (hIL-10R) consiste en dos subunidades diferentes (hIL-10R1 e hIL-10R2), este complejo de señalización activo induce la ruta de transducción de señales JAK / STAT (Wang *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2001; Bakiri & Mingomataj, 2019; Iyer & Cheng, 2012; Ouyang & O'garra, 2019).

Inmunodeficiencias secundarias relacionadas con la presencia de autoanticuerpos anticitocinas

Paulina Cortes-Acevedo,¹ Susana E. Mendoza-Elvira,² Rainer Döffinger³ y Gabriela Barcenas-Morales^{1*}

¹Laboratorio 2 Inmunología, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México;

²Laboratorio 3 Virología, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México;

³Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, Reino Unido

Resumen

Los autoanticuerpos anticitocinas (ACAA) han sido reportados como causa importante de inmunodeficiencias secundarias. Altos títulos de autoanticuerpos neutralizantes pueden causar susceptibilidad a diferentes enfermedades infecciosas potencialmente mortales. Por ejemplo, se ha informado que autoanticuerpos neutralizantes contra IFN γ se correlacionan con susceptibilidad a infecciones micobacterianas y patógenos fúngicos intracelulares. Autoanticuerpos contra IL-6 se detectaron en pacientes con abscesos subcutáneos y celulitis estafilocócica recurrente; asimismo, pacientes con criptococosis, nocardiosis y proteinosis alveolar pulmonar fueron positivos a autoanticuerpos contra GM-CSF. También se ha establecido una relación entre los autoanticuerpos contra IL-17 e IL-22 y las infecciones crónicas por *Candida* en mucosas, que se han identificado en pacientes con poliendocrinopatía autoinmune tipo 1 o timoma. Recientemente se han reportado autoanticuerpos contra interferón tipo I durante el inicio de COVID-19 aguda. Estos ACAA se asemejan a defectos genéticos en citocinas o en sus rutas de señalización. Por ello, pueden considerarse fenocopias de inmunodeficiencias primarias. De esta forma, la detección de ACAA podría ser importante en el diagnóstico, particularmente en pacientes con enfermedades de aparición tardía, para decidir los tratamientos apropiados. Esta revisión presenta una descripción general de la comprensión actual de las inmunodeficiencias secundarias asociadas a ACAA.

PALABRAS CLAVE: Anticuerpos anticitocinas. Anti-GM-CSF. Anti-IFN γ . Anti-IL-6. Inmunodeficiencia secundaria.

Secondary immunodeficiencies related to the presence of anti-cytokine autoantibodies

Abstract

Anti-cytokine autoantibodies (ACAA) have been reported to be an important cause of secondary immunodeficiencies. High titers of neutralizing autoantibodies may cause susceptibility to different life-threatening infectious diseases. For example, neutralizing autoantibodies against IFN γ have been reported to be correlated with susceptibility to mycobacterial infections and intracellular fungal pathogens. Autoantibodies against IL-6 were detected in patients with subcutaneous abscesses and recurrent staphylococcal cellulitis; on the other hand, patients with cryptococcosis, nocardiosis, and pulmonary alveolar proteinosis were positive for autoantibodies to GM-CSF. A relationship has also been established between autoantibodies against IL-17 and IL-22 and chronic mucosal *Candida* infections, which have been identified in patients with APECED or thymoma. Autoantibodies against type-I IFN have been recently reported during the onset of acute COVID-19. These ACAAs resemble genetic defects in cytokines or their signaling pathways. Therefore, they may be considered to be primary immunodeficiencies

*Correspondencia:

Gabriela Barcenas-Morales

E-mail: gbarcenas2019@gmail.com

0016-3813/© 2022 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo *open access* bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 05-10-2022

Fecha de aceptación: 30-11-2022

DOI: 10.24875/GMM.22000338

Gac Med Mex. 2023;159:157-163

Disponible en PubMed

www.gacetamedicademexico.com

phenocopies. Consequently, the detection of ACAA could be important in the diagnosis of patients, particularly in the case of late-onset diseases, in order to decide appropriate treatments. This review presents an overview of current understanding of ACAA-associated secondary immunodeficiencies.

KEYWORDS: Anti-cytokine antibodies. Anti-GM-CSF. Anti-IFN γ . Anti-IL-6. Secondary immunodeficiency.

Antecedentes

Las inmunodeficiencias son un grupo de enfermedades causadas por la alteración o ausencia de uno o más componentes específicos o inespecíficos que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa. Pueden clasificarse en primarias o congénitas, las cuales tienen su origen en un defecto genético intrínseco, y en secundarias o adquiridas, que aparecen como consecuencia de una gran variedad de condiciones patológicas.¹

Las citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular (de 6 a 70 kDa), producidas por casi todas las células. Estos mediadores químicos forman la red de comunicación intercelular de todos los sistemas celulares del cuerpo, incluyendo el sistema inmune; son responsables de la regulación dinámica de la maduración, el crecimiento, la capacidad mediadora y moduladora de la respuesta de las células inmunitarias a agentes infecciosos y estímulos inflamatorios. Asimismo, las citocinas regulan la homeostasis de las células, donde los circuitos de señalización de citocinas incluyen múltiples puntos de control regulatorios, que a menudo implican la inhibición de la retroalimentación, proceso que permite que los tejidos vuelvan a un estado de inmunotolerancia no inflamatorio relativamente inactivo. En forma general, las citocinas se pueden agrupar en proinflamatorias y antiinflamatorias, si promueven o inhiben la inflamación, respectivamente. Investigaciones recientes indican que la liberación simultánea de ambos grupos de citocinas es obligatoria en cualquier respuesta inmunitaria.²⁻⁶

En años recientes, la presencia de autoanticuerpos contra citocinas (ACAA, *anticytokine autoantibodies*) ha sido cada vez más reconocida como una inmunodeficiencia secundaria, ya que al neutralizar la función de su citocina blanco dichos anticuerpos pueden predisponer a diversas infecciones y manifestaciones inmunológicas; los ACAA también pueden ser considerados como “fenocopias autoinmunes de inmunodeficiencias primarias”. No obstante, niveles bajos de estos anticuerpos están presentes en algunos individuos sanos y pueden contribuir a mantener la homeostasis de la respuesta inmune.⁷⁻⁹

La inmunodeficiencia adquirida debida a ciertos ACAA puede predisponer a diversas infecciones y manifestaciones inmunológicas, por lo que se consideran fenocopias autoinmunes de inmunodeficiencias primarias en las que se presentan variantes patogénicas en genes que codifican ciertas citocinas, sus receptores o moléculas que median la transducción de señales de citocinas,⁵⁵ como interferón gamma (IFN γ) —alteraciones genéticas en las cascadas de señalización de IFN γ /IL-12—, interleucina (IL)-6 (mutaciones en gp130, IL-6R y el factor de transcripción STAT3), IL-17 (afectación en IL-17F, IL-17RA, IL17RF, el adaptador intracelular ACT1, la vía de señalización de IL12/IL23 y en los factores de transcripción CARD9, STAT3, STAT1 y ROR γ T) y el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), con mutaciones en el receptor A de este.¹⁰⁻¹⁸

Hasta la fecha, autoanticuerpos contra IFN γ , GM-CSF, IL-6, IL-10, IL-12, un grupo de citocinas producidas por células Th-17 (IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23), así como contra IFN tipo I, han sido asociados a susceptibilidad a infecciones, por lo que esta revisión busca ofrecer un panorama sobre la comprensión actual de las inmunodeficiencias secundarias asociadas a la presencia de ACAA.

Autoanticuerpos anti-IFN γ

IFN γ es una citocina pleiotrópica relacionada con mecanismos antiproliferativos, proapoptóticos y antitumorales; también es clave en la defensa contra agentes infecciosos intracelulares y es producida principalmente por células Th1 y células *natural killer*. El IFN γ actúa principalmente sobre macrófagos (induce la destrucción intracelular de patógenos fagocitados) y tiene efecto sobre las funciones de diferentes tipos celulares (linfocitos Th1, Th2, Th17, células B, entre otros).¹⁹

Anticuerpos neutralizantes contra IFN γ relacionados con una predisposición a infecciones micobacterianas fueron reportados por primera vez en 2004. Las características clínicas de los pacientes con esos autoanticuerpos son análogas a las de pacientes con alteraciones genéticas en las cascadas de señalización de IFN γ /IL-12, lo que indica que autoanticuerpos anti-IFN γ inducen un

estado de inmunodeficiencia adquirida y predisponen al huésped a infecciones por microorganismos intracelulares como las micobacterias.^{9,20,21} Desde entonces, más de 600 casos han sido reportados, principalmente en pacientes originarios del sureste de Asia (Tailandia, Taiwán, Japón, Filipinas, Vietnam y el sureste de China), lo que sugiere que factores genéticos pudieran estar involucrados.²²

Autoanticuerpos anti-IL-12

La IL-12 es una citocina proinflamatoria heterodimérica conformada por dos subunidades, IL-12p40 e IL-12p35, es producida por macrófagos y células dendríticas e induce la producción de IFN γ , por lo que participa en la protección contra patógenos intracelulares. La IL-12 mejora la generación y la actividad citotóxica de los linfocitos T citotóxicos, células *natural killer* y *natural killer* activadas por linfocinas, donde todas estas células secretan IFN γ .^{23,24}

Debido a que IL-12 participa en la respuesta inmune contra patógenos intracelulares, la presencia de autoanticuerpos contra la subunidad IL-12p40 en pacientes se ha asociado a desarrollo de infecciones por organismos oportunistas como nocardiosis, coccidioidomycosis, toxoplasmosis y leishmaniasis; recientemente se reportó un paciente con infecciones por *Burkholderia gladioli*. Asimismo, altos títulos de autoanticuerpos contra IL-12 se han reportado en pacientes con miastenia gravis y timoma.²⁵⁻²⁷

Autoanticuerpos contra GM-CSF

El GM-CSF es un factor de crecimiento hematopoyético, puede ser producido por células mieloides, células dendríticas, linfocitos T, linfocitos B y células no hematopoyéticas (tales como células endoteliales, condrocitos y células epiteliales alveolares tipo II). En el pulmón, el GM-CSF es importante para la diferenciación y función de los macrófagos alveolares; recientemente se ha propuesto que GM-CSF es necesario para la eliminación del colesterol en estos macrófagos. La reducción de esta función del GM-CSF constituye la principal causa de la acumulación del colesterol, lo que favorece el desarrollo de la proteinosis alveolar pulmonar (PAP), caracterizada por la acumulación progresiva de surfactante en los alvéolos pulmonares, lo que resulta en insuficiencia respiratoria hipoxémica y un mayor riesgo de infecciones secundarias o fibrosis pulmonar.¹⁸⁻²⁸

Asimismo, los autoanticuerpos contra GM-CSF son el análogo autoinmune de la deficiencia primaria de GM-CSF que causa PAP, lo que altera la función del GM-CSF sobre los macrófagos alveolares y afecta el metabolismo de los lípidos y las proteínas del surfactante mediado por estas células, lo que deriva en acumulación del surfactante y, por lo tanto, en insuficiencia respiratoria.²⁹

Desde hace tiempo se reconoce que los pacientes con PAP corren el riesgo de infecciones por una gran variedad de organismos intracelulares, como *Nocardia* e *Histoplasma*, que pueden ser secundarias a la disfunción pulmonar subyacente. Asimismo, se han reportado pacientes con PAP autoinmune con infecciones pulmonares recurrentes (principalmente aspergilosis, micobacterias atípicas y *Mycobacterium tuberculosis*), así como con sobreinfección con influenza H1N1, que puede exacerbar la PAP.^{18,30}

Autoanticuerpos anti-IL-17

La familia de IL-17 comprende seis citocinas diferentes (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F), producidas principalmente por células Th17. Las IL-17 tienen un papel importante en la defensa de las mucosas, particularmente contra *Candida*, al inducir la producción de citocinas proinflamatorias, péptidos antimicrobianos y quimiocinas, con lo cual ocasionan el reclutamiento de células inmunitarias al sitio de infección y la eliminación del patógeno.^{31,32}

En pacientes con poliendocrinopatía autoinmune tipo 1 (APECED, *autoimmune poly-endocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*), causada por mutaciones en el regulador autoinmune, y también en pacientes con timoma, se reportó el desarrollo de candidiasis mucocutánea crónica relacionada con altos títulos de autoanticuerpos neutralizantes contra IL-17A, IL-17F e IL-22; esos autoanticuerpos podrían considerarse como fenocopias de las alteraciones genéticas en estas citocinas ya que inhiben su actividad biológica, favoreciendo una infección crónica con *Candida* en mucosas.^{33,34}

Autoanticuerpos anti-IL-6

IL-6 es una citocina pleiotrópica que participa en la inflamación, la hematopoyesis y en la respuesta contra infecciones virales, parasitarias, fúngicas y bacterianas. Es producida por varios tipos celulares (fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, macrófagos, entre otras) en respuesta al daño tisular o a infecciones. La

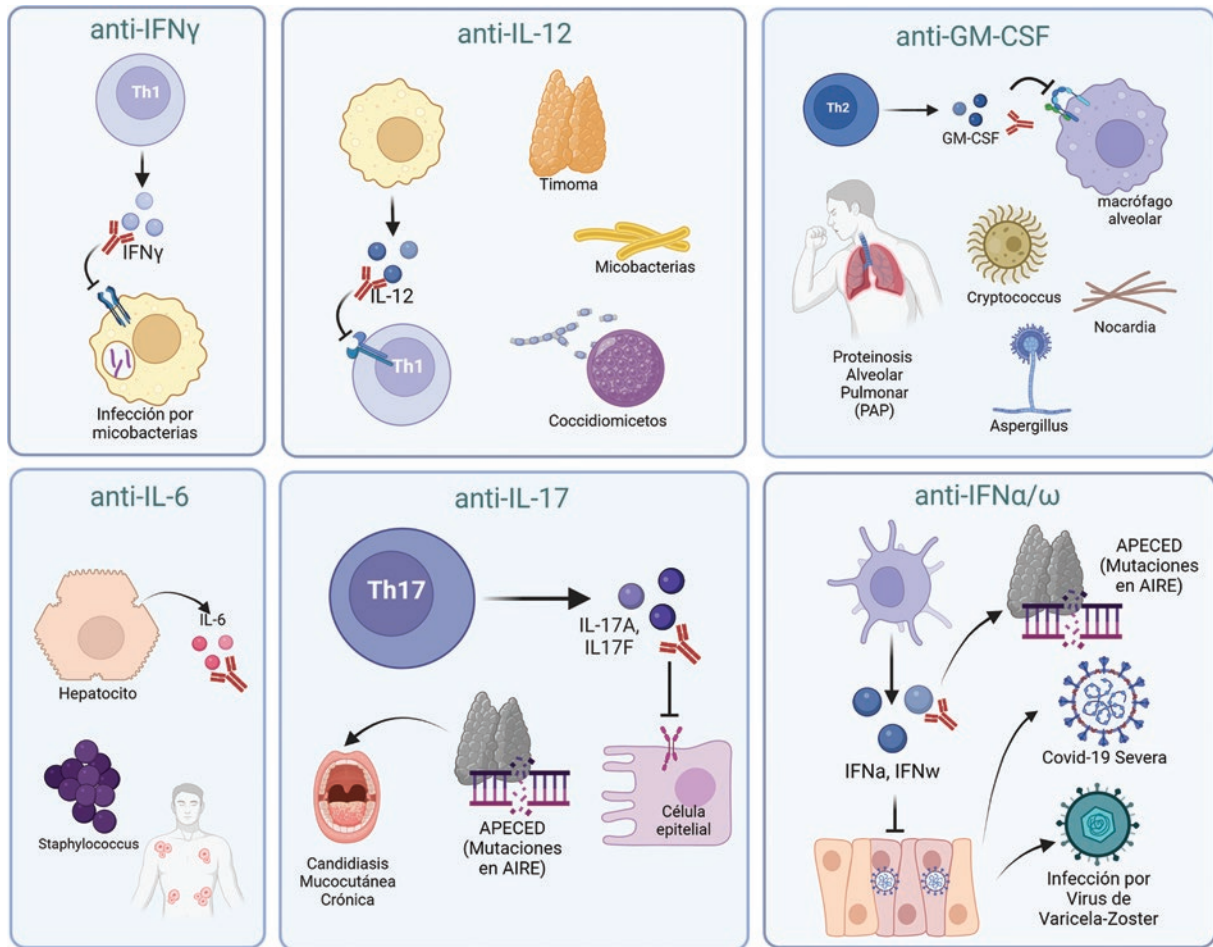


Figura 1. Autoanticuerpos anticitocinas y enfermedades asociadas. Resumen gráfico de las enfermedades relacionadas con la presencia de autoanticuerpos contra diversas citocinas (creado con BioRender.com).

desregulación de IL-6 se asocia a inflamación crónica (enfermedad inflamatoria intestinal), trastornos autoinmunes multifactoriales (esclerosis múltiple y artritis reumatoide), cáncer, anemia y enfermedad de Alzheimer.³⁵⁻³⁸

Por otra parte, se ha reportado inmunodeficiencia secundaria por la presencia de autoanticuerpos contra IL-6, como en un niño con abscesos subcutáneos y celulitis estafilocócica recurrente, en quien estos autoanticuerpos anti-IL-6 preceden a una infección estafilocócica. Asimismo, otros dos pacientes con altos títulos de autoanticuerpos neutralizantes contra la IL-6 presentaron infecciones por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y *Escherichia coli*. También se han detectado estos autoanticuerpos en pacientes con APECED y timoma.^{39,40}

Autoanticuerpos contra interferones tipo I

IFN α e IFN ω forman parte de los IFN tipo I, los cuales son un gran subgrupo de proteínas interferón que

ayudan a regular la actividad del sistema inmunológico, son secretados por varios tipos de células durante las infecciones virales. Los IFN tipo I presentan una capacidad para inducir directamente una respuesta antiviral entre las células infectadas y circundantes.^{41,42}

Se ha reportado la presencia de autoanticuerpos neutralizantes contra IFN tipo I en pacientes con timoma y APECED, si bien no parecen estar asociados a incremento de infecciones virales. Por otra parte, se ha reportado este tipo de autoanticuerpos en individuos con lupus eritematoso sistémico; sin embargo, considerando que se detectaron altos títulos de autoanticuerpos anti-IFN α en pacientes con enfermedad leve, se sugirió que la severidad de esta podría estar regulada por los autoanticuerpos contra IFN α .⁴³⁻⁴⁶

También se han reportado autoanticuerpos neutralizantes contra IFN α en pacientes con infecciones causadas por el virus de varicela-zóster. Recientemente, se reporta la presencia de autoanticuerpos contra IFN

tipo I en pacientes con COVID-19 grave. Estos autoanticuerpos neutralizaron a $IFN\alpha$ o $IFN\omega$, lo que resalta la importancia de este tipo de interferones en la inmunidad protectora contra el virus SARS-CoV-2 y establece una relación entre la presencia de autoanticuerpos neutralizantes contra interferones tipo I y la complicación de COVID-19.⁴⁷⁻⁴⁹

Tratamiento

El tratamiento de pacientes con ACAA es variado y depende del autoanticuerpo detectado y el tipo de enfermedad asociada. En general, entre los tratamientos que se han utilizado en pacientes con infecciones relacionadas con ACAA se encuentran los dirigidos a disminuir las manifestaciones clínicas (antimicrobianos apropiados como primer tratamiento, antiinflamatorios, entre otros), la administración de la citocina exógena y el uso de inhibidores de células B (rituximab y daratumumab).^{50,51}

Particularmente para el tratamiento de pacientes con títulos muy altos de autoanticuerpos neutralizantes a $IFN\gamma$ se ha reportado que el uso de la citocina exógena no disminuye los signos de la enfermedad; sin embargo, por otra parte, se ha observado disminución en los títulos de autoanticuerpos anti- $IFN\gamma$ cuando se emplea rituximab, un anticuerpo monoclonal terapéutico dirigido contra CD20 que agota las células B maduras. Recientemente se reportó el uso exitoso de daratumumab en un paciente con títulos altos de anti- $IFN\gamma$ y que presentaba infecciones progresivas por micobacterias a pesar del tratamiento previo con rituximab.⁵²

Mientras que el tratamiento utilizado en la PAP causada por anti-GM-CSF es el lavado pulmonar, la administración de GM-CSF humano recombinante y rituximab, el uso de la citocina exógena se lleva a cabo de forma inhalada y subcutánea, y en ambos casos se ha reportado una respuesta clínica favorable en pacientes con PAP. Es importante mencionar que existen informes de que el tratamiento con rituximab ha sido exitoso en la reducción de los niveles de ACAA; sin embargo, es menos efectivo en cuadros clínicos en los cuales están involucrados autoanticuerpos anti-GM-CSF, en comparación con los relacionados con la presencia de autoanticuerpos contra $IFN\gamma$.^{53,54}

En pacientes con candidiasis mucocutánea crónica que presentan autoanticuerpos anti-IL-17 se emplean agentes antifúngicos, tanto tópicos como sistémicos, para el control de la infección, por lo que tratamientos

más agresivos contra el sistema inmune de los pacientes, como los inmunomoduladores, por lo general no son requeridos o recomendados; sin embargo, como los antifúngicos no actúan directamente sobre el mecanismo autoinmune, los pacientes suelen requerir este tipo de fármacos de forma frecuente o prolongada.¹⁶

Etiología

Los ACAA pueden contribuir a mantener la homeostasis de la respuesta inmune en individuos sanos, mientras que en ciertos pacientes el desarrollo de estos tiene el potencial de alterar severamente los procesos inmunológicos con consecuencias graves.^{50,55} Algunos estudios mencionan que los ACAA se pueden observar en individuos con mutaciones de los genes activadores de la recombinación, en quienes ocasionan susceptibilidad a infecciones recurrentes y desregulación inmunitaria.⁵⁶

Por otra parte, el reporte de la homología de un epítipo principal reconocido por los autoanticuerpos anti- $IFN\gamma$ y la proteína fúngica Noc2 de *Aspergillus spp.* sugiere que el mimetismo molecular podría ser el mecanismo subyacente al desarrollo de estos ACAA.⁵⁷ También se puede inducir el desarrollo de ACAA en pacientes como una respuesta al tratamiento con citocinas;⁵⁸ sin embargo, las causas del desarrollo de ACAA siguen sin estar bien definidas.

Conclusiones

Los ACAA están involucrados en la desregulación inmunitaria, la autoinmunidad y la inmunodeficiencia, ya que tienen el potencial de alterar severamente los procesos inmunológicos con consecuencias graves en algunos casos. Las manifestaciones son muy variadas, como se ha descrito a lo largo de esta revisión; un resumen gráfico de ello se muestra en la Figura 1.

La presencia de ACAA pueden causar susceptibilidad adquirida a infecciones y contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, debido a que los ACAA no se buscan rutinariamente, aún se desconoce si en la mayoría de las condiciones se desarrollan gradualmente o en respuesta a un desencadenante específico. Asimismo, es necesario considerar la evaluación de los pacientes para detectar ACAA en los casos en que la alteración de los procesos inmunitarios normales estuviera contribuyendo a la enfermedad, así como en individuos inmunocompetentes que experimenten infecciones por microorganismos

oportunistas o infecciones recurrentes, crónicas o inusualmente graves con patógenos más comunes.

De esta forma, la detección de ACAA podría considerarse un marcador de gran utilidad para propósitos de diagnóstico, para decidir tratamientos y manejos más adecuados e, incluso, personalizados para cada paciente, considerando que estos autoanticuerpos pueden provocar la pérdida del efecto al tratamiento y, probablemente, alteraciones de la función del sistema inmunitario.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología del Addenbrooke's Hospital, por el apoyo para la realización de la presente revisión. Además, agradecen al CONACyT, a la DGAPA/PASPA/UNAM y a la Cátedra/FES-Cuautitlán/UNAM, por los apoyos recibidos, que se describen en la sección de Financiamiento.

Financiamiento

Paulina Cortes Acevedo recibió la beca CONACyT Nacional de Posgrado para Estudios de Doctorado 829997. Gabriela Barcenás Morales recibió la beca DGAPA/PASPA/UNAM.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no realizaron experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Bibliografía

1. Ballow M, Sánchez-Ramón S, Walter JE. Secondary immune deficiency and primary immune deficiency crossovers: hematological malignancies and autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2022;13:928062.
2. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20:6008.

3. Monastero RN, Pentyala S. Cytokines as biomarkers and their respective clinical cutoff levels. *Int J Inflamm.* 2017;2017:4309485.
4. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: from clinical significance to quantification. *Adv Sci.* 2021;8:2004433.
5. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843:2563-82.
6. Cytokines have context-dependent roles that dictate their normal physiological function; however, dysregulation or chronic activation of cytokine pathways can alter tissue balance away from a return to homeostatic quiescence toward disease-associated immunopathology. *Nature Immunol.* 2019;20:1557.
7. Barcenás-Morales G, Cortes-Acevedo P, Doffinger R. Anticytokine autoantibodies leading to infection: Early recognition, diagnosis and treatment options. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32:330-6.
8. Ku CL, Chi CY, von Bernuth H, Doffinger R. Autoantibodies against cytokines: phenocopies of primary immunodeficiencies? *Hum Genet.* 2020;139:783-94.
9. Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, Kanazawa H, Trapnell BC, Hoshino Y, et al. Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals. *FEBS Lett.* 2007;581:2017-21.
10. Bustamante J. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: recent discoveries. *Hum Genet.* 2020;139:993-1000.
11. Rosain J, Kong XF, Martínez-Barricarte R, Oleaga-Quintas C, Ramírez-Alejo N, Markle J, et al. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: 2014-2018 update. *Immunol Cell Biol.* 2019;97:360-7.
12. Nahum A, Sharfe N, Broides A, Dadi H, Naghzi Z, Mandola AB, et al. Defining the biological responses of IL-6 by the study of a novel IL-6 receptor chain immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145:1011-5.
13. Béziat V, Li J, Lin JX, Ma CS, Li P, Bousfiha A, et al. A recessive form of hyper-IgE syndrome by disruption of ZNF341-dependent STAT3 transcription and activity. *Sci Immunol.* 2018;3:eaat4956.
14. Béziat V, Tavernier SJ, Chen YH, Ma CS, Materna M, Laurence A, et al. Dominant-negative mutations in human IL6ST underlie hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* 2020;217:e20191804.
15. Li J, Vinh DC, Casanova JL, Puel A. Inborn errors of immunity underlying fungal diseases in otherwise healthy individuals. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:46-57.
16. Li J, Casanova JL, Puel A. Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal Immunol.* 2018;11(3):581-9.
17. Hildebrandt J, Yalcin E, Bresser HG, Cinel G, Gappa M, Haghghi A, et al. Characterization of CSF2RA mutation related juvenile pulmonary alveolar proteinosis. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:171.
18. Trapnell BC, Nakata K, Bonella F, Campo I, Griese M, Hamilton J, et al. Pulmonary alveolar proteinosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5:1-17.
19. Ivashkiv LB. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18:545-58.
20. Höflich C, Sabat R, Rosseau S, Temmesfeld B, Slevogt H, Döcke WD, et al. Naturally occurring anti-IFN γ autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia coccovenans*. *Blood.* 2004;103:673-5.
21. Doffinger R, Helbert MR, Barcenás-Morales G, Yang K, Dupuis S, Cerrón-Gutiérrez L, et al. Autoantibodies to interferon-gamma in a patient with selective susceptibility to mycobacterial infection and organ-specific autoimmunity. *Clin Infect Dis.* 2004;38:e10-4.
22. Ku CL, Lin CH, Chang SW, Chu CC, Chan JFW, Kong XF, et al. Anti-IFN γ autoantibodies are strongly associated with HLA-DR*15:02/16:02 and HLA-DQ*05:01/05:02 across Southeast Asia. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137:945-8.
23. Liu J, Cao S, Kim S, Chung EY, Homma Y, Guan X, et al. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr Immunol Rev.* 2005;1:119-37.
24. Ullrich KAM, Schulze LL, Paap EM, Müller TM, Neurath MF, Zundler S. Immunology of IL-12: an update on functional activities and implications for disease. *EXCLI J.* 2020;19:1563-89.
25. Meager A, Wadhwa M, Dilger P, Bird C, Thorpe R, Newsom-Davis J, et al. 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. *Clin Exp Immunol.* 2003;132:128-36.
26. Burbelo PD, Browne SK, Sampaio EP, Giaccone G, Zaman R, Kristosturyan E, et al. Anti-cytokine autoantibodies are associated with opportunistic infection in patients with thymic neoplasia. *Blood.* 2010;116:4848-58.
27. Kärner J, Pihlap M, Ranki A, Krohn K, Trebusak-Podkrajsek K, Bratanic N, et al. IL-6-specific autoantibodies among APECED and thymoma patients. *Immun Inflamm Dis.* 2016;4:235-43.
28. Lee KMC, Achuthan AA, Hamilton JA. GM-CSF: a promising target in inflammation and autoimmunity. *Immunotargets Ther.* 2020;9:225-40.
29. Ataya A, Knight V, Carey BC, Lee E, Tarling EJ, Wang T. The Role of GM-CSF autoantibodies in infection and autoimmune pulmonary alveolar proteinosis: a concise review. *Front Immunol.* 2021;12:752856.

30. Albogami SM, Touman AA. Viral pneumonia and pulmonary alveolar proteinosis: the cause and the effect, case report. *AME Case Rep.* 2019;3:41.
31. Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:2-11.
32. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect.* 2013;2:e60.
33. Kisand K, Bøe-Wolff AS, Podkrajšek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med.* 2010;207:299-308.
34. Puel A, Döffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med.* 2010;207:291-7.
35. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010;22:347-52.
36. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13:399-409.
37. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2020;28:115327.
38. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015;16:448-57.
39. Nanki T, Onoue I, Nagasaka K, Takayasu A, Ebisawa M, Hosoya T, et al. Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Ann Rheum Dis.* 2013;72:1100-2.
40. Puel A, Picard C, Lorrot M, Pons C, Chrabieh M, Lorenzo L, et al. Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. *J Immunol.* 2008;180:647-54.
41. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:36.
42. Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:231-42.
43. Meager A, Visvalingam K, Peterson P, Möll K, Murumägi A, Krohn K, et al. Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med.* 2006;3:1152-64.
44. Meyer S, Woodward M, Hertel C, Vlaicu P, Haque Y, Kärner J, et al. AIRE-deficient patients harbor unique high-affinity disease-ameliorating autoantibodies. *Cell.* 2016;166:582-95.
45. Gupta S, Tatouli IP, Rosen LB, Hasni S, Alevizos I, Manna ZG, et al. Distinct functions of autoantibodies against interferon in systemic lupus erythematosus: a comprehensive analysis of anticytokine autoantibodies in common rheumatic diseases. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68:1677-87.
46. Orlova EM, Sozaeva LS, Kareva MA, Oftedal BE, Wolff ASB, Breivik L, et al. Expanding the phenotypic and genotypic landscape of autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102:3546-56.
47. Troya J, Bastard P, Planas-Serra L, Ryan P, Ruiz M, de Carranza M, et al. Neutralizing autoantibodies to type I IFNs in > 10 % of patients with severe COVID-19 pneumonia hospitalized in Madrid, Spain. *J Clin Immunol.* 2021;41:914-22.
48. Goncalves D, Mezidi M, Bastard P, Perret M, Saker K, Fabien N, et al. Antibodies against type I interferon: detection and association with severe clinical outcome in COVID-19 patients. *Clin Transl Immunology.* 2021;10:1327.
49. Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, Michailidis E, Hoffmann HH, Zhang Y, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 2020;370:eabd4585.
50. Knight V, Merkel PA, O'Sullivan MD. Anticytokine autoantibodies: association with infection and immune dysregulation. *Antibodies (Basel).* 2016;5:3.
51. Browne SK. Anticytokine autoantibody-associated immunodeficiency. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:635-57.
52. Ochoa S, Ding L, Kreuzburg S, Treat J, Holland SM, Zerbe CS. Daratumumab (anti-CD38) for treatment of disseminated nontuberculous mycobacteria in a patient with anti-interferon- γ autoantibodies. *Clin Infect Dis.* 2021;72:2206-8.
53. Soye B, Borie R, Menard C, Cadranet J, Chávez L, Cottin V, et al. Rituximab for auto-immune alveolar proteinosis, a real life cohort study. *Respir Res.* 2018;19:74.
54. Seymour JF, Presneill JJ, Schoch OD, Downie GH, Moore PE, Doyle IR, et al. Therapeutic efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;163:524-31.
55. Merkel PA, Lebo T, Knight V. Functional analysis of anti-cytokine autoantibodies using flow cytometry. *Front Immunol.* 2019;10:1517.
56. Weiler FG, Peterson P, Costa-Carvalho BT, de Barros-Dorna M, Correia-Deur JE, Sader SL, et al. The heterogeneity of autoimmune polyendocrine syndrome type 1: clinical features, new mutations and cytokine autoantibodies in a Brazilian cohort from tertiary care centers. *Clin Immunol.* 2018;197:231-8.
57. Lin CH, Chi CY, Shih HP, Ding JY, Lo CC, Wang SY, et al. Identification of a major epitope by anti-interferon- γ autoantibodies in patients with mycobacterial disease. *Nat Med.* 2016;22:994-1001.
58. Von Stemann JH, Rigas AS, Thøner LW, Rasmussen DGK, Pedersen OB, Rostgaard K, et al. Prevalence and correlation of cytokine-specific autoantibodies with epidemiological factors and C-reactive protein in 8,972 healthy individuals: results from the Danish Blood Donor Study. *PLoS One.* 2017;12:e0179981.



Neutralizing Anti-interferon- γ Autoantibodies: an Ameliorating Factor in COVID-19 Infection?

Mark Kacar^{1,2} · Paulina Cortes-Acevedo³ · Vinesh Patel⁴ · Clive Carter⁵ · Pamela Hughes⁵ · Hugh P. McGann⁴ · Effrossyni Gkrania-Klotsas⁶ · Helen E. Baxendale⁷ · Gabriela Barcenas-Morales³ · Rainer Doffinger⁸ · Sinisa Savic^{1,2} 

Received: 8 March 2021 / Accepted: 12 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

To the Editor

Interferon gamma (IFN γ) is a central effector cytokine of cellular immunity. It is mainly produced by activated T-cells, natural killer cells and to a lesser extent by professional antigen presenting cells [1]. Its main roles include activation of macrophages, granuloma formation, and augmentation of anti-tumor immunity [2]. In addition, it augments antiviral immunity by inhibiting viral entry, uncoating, translation, and virion assembly [3].

Although the majority of patients infected by SARS-CoV-2 virus experience mild symptoms, approximately 15% develop a moderate phenotype resembling viral pneumonia, with a further subset presenting with severe illness characterized by hyperinflammation and acute respiratory distress syndrome [4]. These moderate and severe forms of COVID-19 typically arise after 7–10 days of illness and are characterized by hypercytokinemia and a cytokine storm, with high levels of TNF- α , IL-1 β , IL-1Ra, and IL-6 [5, 6].

Neutralizing anti-IFN γ autoantibodies were first described in 2004 in the context of selective susceptibility to non-tuberculous mycobacterial (NTM) infection [7, 8]. Lymph nodes, bones/joints, and lungs are most commonly affected, with soft tissue and skin involvement (in the form of

neutrophilic dermatosis, erythema nodosum, or exanthematous pustulosis) also commonly reported [7, 9].

Here, we report a case of previously fit 58-year-old man of Southeast Asian origin, who was found to have autoantibodies against IFN γ resulting in acquired IFN γ deficiency and NTM and COVID-19 co-infection (NTM-COV+). He initially became unwell in December 2018. Over the following 12 months, he developed folliculitis; episcleritis; intermittent rash with abscesses affecting his chest, arms, and hands (Supplementary Figure 1A, B); weight loss; reduced appetite; fatigue; arthralgia (hands, shoulders, and spine); cervical and supraclavicular lymphadenopathy; and intermittent fever with night sweats.

Investigations revealed a fluctuating leukocytosis ($12\text{--}33 \times 10^9/\text{L}$), with neutrophilia, anemia (nadir 87 g/L), persistent thrombocytosis, elevated CRP (peak of 100 mg/L), and low albumin (nadir 28 g/L). Screening tests for autoimmunity, blood-borne viruses, and syphilis were negative. Three IFN γ release assays for tuberculosis were indeterminate. Blood microscopy and culture were negative. PET-CT demonstrated widespread noncalcified lymphadenopathy in the neck, chest, and abdomen, with avid fluorodeoxyglucose uptake. Neutrophilic dermatosis seen in an initial skin sample raised the possibility of Sweet's syndrome, although dermal fibrosis

Mark Kacar and Paulina Cortes-Acevedo contributed equally to this work.

✉ Sinisa Savic
s.savic@leeds.ac.uk

¹ Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine, University of Leeds, Wellcome Trust Brenner Building, St. James University, Beckett Street, Leeds LS9 7TF, UK

² Department of Clinical Immunology and Allergy, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, Leeds, UK

³ Laboratorio 2 Inmunologia, FES-Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcalli, Mexico

⁴ Department of Infectious Diseases, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, Leeds, UK

⁵ Department of Transplant and Cellular Immunology, Leeds Teaching Hospitals NHS Trust, Leeds, UK

⁶ Department of Infectious Diseases, Cambridge University NHS Hospitals Foundation Trust, Cambridge, UK

⁷ Royal Papworth Hospital NHS Foundation Trust, Cambridge, UK

⁸ Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge CB2 2QQ, UK

suggested atypical mycobacterial infection. A cervical lymph node biopsy sample failed to demonstrate any of the hallmarks of lymphoproliferative disease. A differential diagnosis of sarcoidosis or Sweet's syndrome was made and empirical treatment with prednisolone commenced in December 2019. This improved his rash, weight loss, and lymphadenopathy, but not his fever.

In February 2020, he developed right iliac fossa pain, vomiting, productive cough, and rash. There was significant leukocytosis ($26 \times 10^9/L$) and CRP was elevated at 243 mg/L. CT imaging revealed new splenomegaly and splenic infarcts. Further dermatology review reported no features of neutrophilic dermatosis, instead resembling dermatitis (Supplementary Figure 1C); repeat skin biopsy histology was suggestive of granulomatous interstitial dermatitis. In light of the patient's ethnicity, indeterminate IFN γ release assay for TB, and evolving clinical picture, a provisional diagnosis of atypical mycobacterial infection due to IFN γ autoantibodies was made. Bone marrow staining and culture demonstrated growth of mycobacterium avium intracellulare (MAI) after 1 week of incubation. Subsequent mycobacterial blood culture was also positive for MAI.

Testing for anti-IFN γ antibodies (Ab), using a Bio-Plex methodology as previously described [10], revealed high titer anti-IFN γ Ab in NTM/COV+ patient comparable to three other patients with known autoantibodies against IFN γ (NTM/COV-) (Figure 1A, Supplementary Figure 3). We then verified the neutralizing capacity of these antibodies and their ability to interfere with IFN γ pathway signaling in an ex vivo setting by functional testing using whole blood or PBMC. NTM/COV+ patient's response to, and production of, IFN γ was measured in three independent experiments and compared to 3 other NTM/COV- patients and to healthy controls ($N = 15$). After 24-h stimulation with PHA, IL-12, or a combination of the two, we were unable to detect IFN γ in the supernatants from the patient samples, suggesting that anti-IFN γ Abs were neutralizing the endogenously produced IFN γ (Figure 1B, left panel). This was also observed in samples taken from NTM/COV- patients. By contrast, the HCs demonstrated good production of IFN γ in response to both stimuli. In addition, under the same experimental settings, stimulation with IFN γ failed to induce IL-12 production in the NTM/COV+ patient samples (Figure 1B, right panel). To further demonstrate the neutralizing capacity of the anti-IFN γ Ab, we activated HC PBMC with LPS or LPS + IFN γ in the presence of 20% control or NTM/COV+ patient serum, measuring IL-12 levels after 24-h incubation. Stimulation with LPS or LPS + IFN γ triggered production of IL-12 from HC PBMC incubated with control serum, while HC PBMC incubated with the patient serum failed to produce IL-12 (Figure 1C). This demonstrated that patient serum neutralized both endogenously produced IFN γ and exogenous IFN γ . The capacity of patient serum to neutralize recombinant IFN γ was

further confirmed by adding 20% of control or patient serum to RPMI-containing recombinant IFN γ and measuring IFN γ levels by Luminex. The patient serum completely neutralized recombinant IFN γ (Figure 1D). Lastly, we analyzed the patient's HLA type to determine whether he carried the high-risk HLA-DR alleles associated with anti-IFN γ autoantibodies. The patient was found to carry DRB1*15:02, DRB1*16:02, and DQB1*05:02 (homozygous), all of which have previously been reported to increase the risk of developing anti-IFN γ autoantibodies [11].

Treatment for MAI was started 4 weeks after hospitalization. Due to rifabutin-induced hyperbilirubinemia, the patient was established on ethambutol, azithromycin, and amikacin. Prednisolone was continued throughout his hospitalization. Injectable IFN γ -1b (Immunex) treatment [80 μ g/2.65 m² (body surface) 3 weekly] was implemented alongside plasma exchange, in an effort to raise IFN γ levels and reduce titers of anti-IFN γ autoantibodies, respectively (Supplementary Figure 2).

Further immunological investigations showed normal lymphocyte profile with reduced naïve T cells 23% (normal 49–90%). We were interested to determine if the presence of IFN γ Ab had effects on the distribution of CD4 T-helper-cells (Th) Th1, Th2, and Th17, since this might have impacted the patient's inability to clear the infection. Compared to HC, the patient had similar proportions of Th1, and TH17 cells, and slightly reduced Th2 (Supplementary Figure 1D, E).

At day 37 of admission, the patient was tested positive for SARS-CoV-2 with a nucleic acid amplification test (NAAT) from a nose and throat swab. A previous swab taken on admission had been negative. At the time of screening, the patient was pyrexial (38.1 °C) but had no respiratory symptoms. Chest imaging demonstrated novel subpleural nodules, but no changes indicating COVID-19 pneumonia. Between days 50 and 90, nose and throat swab SARS-CoV-2 NAAT tests were positive on six occasions (Supplementary Figure 2) but were negative from day 103 onwards. Steroid treatment continued uninterrupted throughout this period. The patient did not require oxygen supplementation and had no significant respiratory symptoms. He continued to receive regular plasma exchange and IFN γ -1b injections. However, this combination therapy was unlikely to have made a substantial difference in correcting his acquired immunodeficiency. Serial measurements of anti-IFN γ Ab showed some reduction in titers, but levels remained high (Figure 1A). Experiments looking at the effects of patient serum on levels of exogenously administered IFN γ demonstrated no detectable free IFN γ following incubation with serum (Figure 1D).

He eventually mounted an adequate IgG antibody response to several viral antigens including the trimeric S protein (Supplementary Figure 3). However, his MAI infection remained difficult to control. Plasma exchange and IFN γ -1b injection were stopped, but azithromycin, ethambutol, and

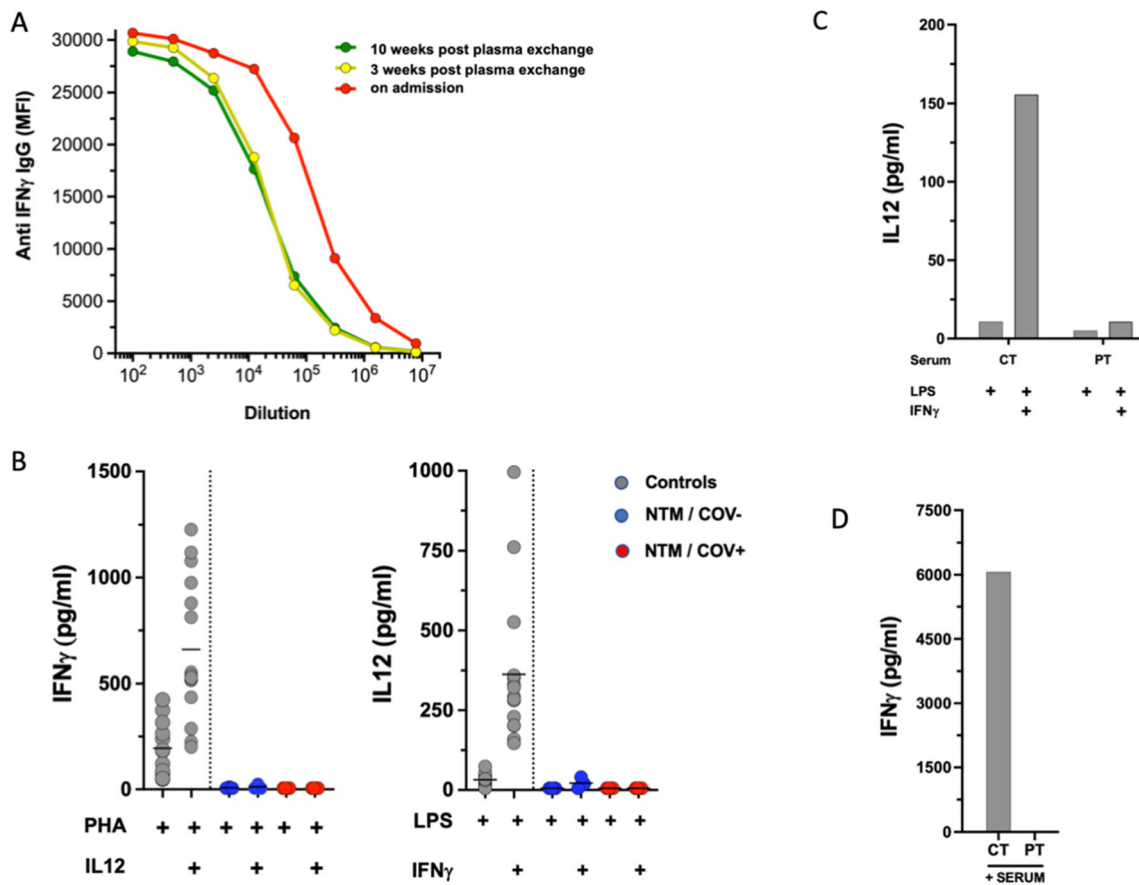


Fig. 1 **A** Detection and titration of anti-IFN γ antibody. Patient sera were diluted in seven 1/5 steps starting at 1/100. Anti-IFN γ IgG was determined by particle-based flow cytometry on a Luminex analyzer and shown as mean fluorescence intensities (MFI). **B** Induced IFN γ and IL12 levels after whole blood activation. Cytokines were measured in whole blood after 24-h stimulation using 10 μ g/mL PHA or 1 μ g/mL LPS alone or in combination with 20 μ g/mL IL12 or 20,000 IU/mL IFN γ , respectively. To account for lymphopenia, data were corrected for lymphocyte counts (in response to PHA) or monocyte counts (in response to LPS). Controls are shown as gray circles ($N = 15$), patients with acquired (a)IFN γ deficiency (N3) are shown as blue circles (NTM/

COV $^-$). For the NTM/COV $^+$ patient, data from four experiments are shown as red circles. Cytokine levels are shown as pg/mL. **C** In vitro inhibition of IFN γ using patient serum. Healthy control PBMC were activated with LPS or LPS + IFN γ in the presence of 20% control (CT) or patient (NTM/COV $^+$) serum and IL12 levels were measured in the supernatant after 24-h incubation. **D** IFN γ recovery in the presence of autologous patient (NTM/COV $^+$) serum: 20% control or patient serum was added to RPMI-containing recombinant IFN γ and IFN γ levels were determined by Luminex. No IFN γ could be recovered from the well containing patient serum showing complete antigenic neutralization by the patient's autoantibody

rifabutin were continued. In October 2020, he was treated with rituximab to good effect. By April 2021, the patient was systemically well. A PET-CT demonstrated no enlarged LN of focal nodal uptake and his splenomegaly had reduced from 16 to 13 cm. He is due to complete 2 years of anti-MAI therapy (azithromycin, ethambutol, and rifabutin).

To determine whether autoantibodies to IFN γ are associated with severity of COVID-19 infection, we tested sera from three groups; healthy volunteers (HC), healthcare workers with asymptomatic or predominantly mild COVID-19 infection (COV-HCW), and patients hospitalized with COVID-19 (COV-PAT). Both the COV-HCW and the COV-PAT group, showed similarly increased anti-IFN γ Ab levels when compared to healthy controls. However, antibody levels remained low when compared to the NTM/COV $^+$ patient and the NTM/COV $^-$ disease controls.

We describe here a single patient with autoantibodies to IFN γ and NTM and COVID-19 co-infection. We investigated whether severity of COVID19 infection is associated with anti-IFN γ Ab by studying two cohorts of infected individuals, one with severe disease and the other with mild/asymptomatic disease. The patient with NMT and COVID-19 co-infection, despite apparent IFN γ deficiency, did not have severe COVID-19 disease. Exploring associations between anti-IFN γ Ab and COVID-19 disease severity in a larger cohort of patients, we found no obvious link. Among infected individuals, both severe and mild or asymptomatic COVID-19 infection patients had similar levels of anti-IFN γ Ab. These autoantibodies appear to develop during the course of infection, since they were not readily detectable in a non-infected cohort. Furthermore, antibody titers were much lower compared to patients with confirmed acquired IFN γ deficiency.

This suggests that anti-IFN γ Ab seen in these two groups of patents might be a transient phenomenon, with limited neutralizing capacity against IFN γ .

Unlike type I IFNs, which are required for a robust response to COVID-19 infection, the role of IFN γ is less clearly defined. In experimental models using human epithelial cells, IFN γ has been shown to promote SARS-CoV-2 infection [12]. Another study demonstrated that lower circulating levels of IFN γ are associated with more severe COVID-19 infection course and greater chance of developing lung fibrosis [13], while the functional exhaustion of both type I and type II IFN production was independently linked with a severe disease course [14]. Although serum levels of IFN γ in severe COVID-19 appear to be significantly lower than is typically seen in hyperinflammatory disease states such as secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) or macrophage activation syndrome (MAS) [15], IFN γ has been shown to act synergistically with TNF at a local tissue level, promoting macrophage activation and lung damage [16, 17].

Our experience suggests that the complete absence of IFN γ signaling does not result in a worse COVID-19 outcome and that IFN γ is not necessary to control this virus. However, the potential role of IFN γ in local hyperinflammatory responses and lung injury remains ill-defined. Arguably, the mild disease phenotype in our patient may have resulted from prolonged corticosteroid therapy rather than impairment of the IFN γ pathway (or both), given that corticosteroid therapy has been clearly shown to reduce inflammatory complications of COVID-19 and improve overall outcomes [18].

Although studies of inborn errors of immunity (IEI) provide unique insights into functioning of the immune system, such models are imperfect. The outcomes of COVID-19 infection in patients with various types of IEI have not been easy to predict. Various retrospective studies show that outcomes are often better than anticipated [19]. However, other factors such as age, sex, and comorbidities, known to be associated with COVID-19 disease severity, also play an important role [20].

Our study suggests a redundant role of IFN γ to control SARS-CoV-2 and provides an outline of what to expect when patients with this rare acquired immune deficiency encounter a viral illness characterized by immune hyperactivation.

Abbreviations IFN γ , Interferon gamma; ARDS, Acute respiratory distress syndrome; JAK, Janus kinase; MAS, Macrophage activation syndrome; NTM, Non-tuberculous mycobacterium

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01102-7>.

Acknowledgements We would like to thank the Royal Papworth Hospital NHS Trust (RPH) Research and Development Team staff for their support in recruitment to the study and RPH patients from who donated serum samples that were used in this study.

Author Contribution MK, VP, HM, and EGK collected clinical information; PCA, CC, PH, and GBM performed experiments; RD, GBC, HEB, and SS analyzed data; and MK, VP, and SS wrote first draft of the manuscript. HEB and EGK provided sera for COVID-19 patients and healthy control groups. All authors read, edited, and approved the manuscript. RD and SS design and funded the study.

Funding This research is supported by the National Institute for Health Research (NIHR) Leeds Biomedical Research Centre and grant from CSL Behring. HEB received funding from the Royal Papworth Hospital NHS Trust R&D Pump priming award which was used to support COVID-19 serum surveillance studies.

EGK is supported by the NIHR CRN Greenshoots Award.

Paulina Cortes-Acevedo acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACYT) number 829997.

GB-M is supported by grants from UNAM, PI-API2009.

Data Availability The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Declarations

Ethics Approval Ethics approval was granted by the Leeds (East) Research Ethics Committee. The study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards (ethics approval: IRAS project ID: 96194 REC: 12/WA/0148).

Consent to Participate

Participants provided their consent to participate in this study.

Consent for Publication Consent was sought and gained from the participant (the main case) to publish the findings of this study.

Competing Interests The authors declare no competing interests.

Disclaimer The views expressed are those of the authors and not necessarily those of the NHS, the NIHR, or the Department of Health.

References

1. Castro F, Cardoso AP, Goncalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. *Front Immunol*. 2018;9:847.
2. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163–89.
3. MacMicking JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(5):367–82.
4. Fu L, Wang B, Yuan T, Chen X, Ao Y, Fitzpatrick T, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a systematic review and meta-analysis. *J Inf Secur*. 2020;80(6):656–65.
5. Yang Y, Shen C, Li J, Yuan J, Wei J, Huang F, et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(1):119–27 e4.
6. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan. *China Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
7. Doffinger R, Helbert MR, Barcenas-Morales G, Yang K, Dupuis S, Ceron-Gutierrez L, et al. Autoantibodies to interferon-gamma in a

- patient with selective susceptibility to mycobacterial infection and organ-specific autoimmunity. *Clin Infect Dis*. 2004;38(1):e10–4.
8. Hoflich C, Sabat R, Rosseau S, Temmesfeld B, Slevogt H, Docke WD, et al. Naturally occurring anti-IFN-gamma autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia coccovenans*. *Blood*. 2004;103(2):673–5.
 9. Ku CL, Chi CY, von Bernuth H, Doffinger R. Autoantibodies against cytokines: phenocopies of primary immunodeficiencies? *Hum Genet*. 2020;139(6–7):783–94.
 10. Puel A, Doffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med*. 2010;207(2):291–7.
 11. Ku CL, Lin CH, Chang SW, Chu CC, Chan JF, Kong XF, et al. Anti-IFN-gamma autoantibodies are strongly associated with HLA-DR*15:02/16:02 and HLA-DQ*05:01/05:02 across Southeast Asia. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(3):945–8 e8.
 12. Heuberger J, Trimpert J, Vladimirova D, Goosmann C, Lin M, Schmuck R, et al. Epithelial response to IFN-gamma promotes SARS-CoV-2 infection. *EMBO Mol Med*. 2021;13(4):e13191.
 13. Hu ZJ, Xu J, Yin JM, Li L, Hou W, Zhang LL, et al. Lower circulating interferon-gamma is a risk factor for lung fibrosis in COVID-19 patients. *Front Immunol*. 2020;11:585647.
 14. Ruetsch C, Brglez V, Cremoni M, Zorzi K, Fernandez C, Boyer-Suavet S, et al. Functional exhaustion of type I and II interferons production in severe COVID-19 patients. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:603961.
 15. Kessel C, Vollenberg R, Masjosthusmann K, Hinze C, Wittkowski H, Debaugnies F, et al. Discrimination of COVID-19 from inflammation-induced cytokine storm syndromes by disease-related blood biomarkers. *Arthritis Rheum*. 2021.
 16. Karki R, Sharma BR, Tuladhar S, Williams EP, Zalduondo L, Samir P, et al. Synergism of TNF-alpha and IFN-gamma triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. *Cell*. 2021;184(1):149–68 e17.
 17. Zhang F, Mears JR, Shakib L, Beynor JJ, Shanaj S, Korsunsky I, et al. IFN-gamma and TNF-alpha drive a CXCL10+ CCL2+ macrophage phenotype expanded in severe COVID-19 lungs and inflammatory diseases with tissue inflammation. *Genome Med*. 2021;13(1):64.
 18. Group RC, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384(8):693–704.
 19. Meyts I, Buccioli G, Quinti I, Neven B, Fischer A, Seoane E, et al. Coronavirus disease 2019 in patients with inborn errors of immunity: an international study. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(2):520–31.
 20. Shields AM, Burns SO, Savic S, Richter AG. Consortium UPC-. COVID-19 in patients with primary and secondary immunodeficiency: the United Kingdom experience. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(3):870–5 e1.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.