



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA
CITOCINAS Y EL ANÁLISIS DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA NEUTRALIZANTE EN
CANINOS, EQUINOS Y HUMANOS.”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

Marcela Autran Martínez

Director de Tesis

Dra. Gabriela Barcenas Morales

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, CAMPUS 1.

COMITÉ TUTOR

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, CAMPUS 1.

Dr. José Álvaro Aguilar Setián

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS.

Dr. Rainer Doffinger

Co-Asesor

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, Agosto 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de ella y siempre sentirme bienvenida en la máxima casa de estudios.

A la Dra. Gabriela Barcenas Morales y al Dr. Rainer Doffinger por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, por su apoyo y dedicación con equipo y reactivos al laboratorio de Inmunología de la FES-Cuautitlán y durante mi estancia en Inglaterra, así como sus consejos y sugerencias en la realización del mismo, en verdad muchas gracias.

Al comité tutor: Dra. Susana Mendoza y Dr. Álvaro Aguilar por su orientación y aportaciones continuas que me permitieron mejorar como estudiante y como persona.

A Pau por toda la ayuda cibernética y el apoyo incondicional en la realización del proyecto, este logro compartido también es tuyo, a Lourdes, Sophie y Cristina por su apoyo y gran amistad.

A los honorables miembros del jurado asignado, quienes con sus comentarios, sugerencias y dudas permitieron el enriquecer el trabajo.

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

Al proyecto PIAPI, FES-Cuautitlán, UNAM. “Infección e inmunidad” con Clave PIAP1642 y PIAP1811.

Agradezco el apoyo brindado por CONACYT otorgándome una beca nacional durante el periodo 2015-2019 y adicionalmente una beca mixta durante el periodo 2015 y 2016, para realizar mi estancia de investigación en el Hospital Addenbrooke’s, Cambridge University.

A mis tutores y mentores de trabajo, Dr. Humberto Alejandro Martínez Rodríguez y Dr. Hugo Ramírez Álvarez, por permitirme continuar a su lado.

Un agradecimiento especial e invaluable a mi segunda casa de estudios, el Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Posgrado de Inmunología; especialmente al Dr. Sergio Estrada Parra y a la Dra. Iris Estrada García, así como a todos los académicos participantes por tener el enorme privilegio de formarme dentro de sus instalaciones.

A los hospitales de Enseñanza y laboratorios de la FES Cuautitlán, al Hospital Veterinario Belén por todas aquellas muestras donadas para la realización de este proyecto.

DEDICATORIAS

A todos los pacientes cuyas muestras resultaron invaluable para la realización y conclusión de este proyecto y de los sueños a futuro.

Este trabajo está dedicado a un número ilimitado de personas que quizá me faltaría nombrar y a quienes les agradezco pieza a pieza de rompecabezas todo lo que ahora formo.

A mis padres, gracias por el ejemplo de trabajo y perseverancia que pude observar en ambos. Por motivarnos a todos continuamente, siendo el mejor modelo de superación, por enseñarnos que si la vida te da mil razones para fallar, le demos mil y un razones para continuar.

A mi invaluable familia: Víctor, Yhoali y Gael, el logro es de ustedes, siempre fueron mi motor de superación y tengo presente todo el tiempo que les arrebate, espero sea fortaleza y ejemplo de perseverancia.

A todos aquellos que me faltan por nombrar: La pandilla de los laboratorios de Ciencias Biológicas y a la Sección de Salud Animal: Virología, Bacteriología e Inmunología que con su apoyo moral, profesional y consejos me animaron siempre con este proyecto, por ser mis compañeros en esta aventura, y representar un ejemplo a seguir.

A Dios por acompañarnos en todo momento de la vida a mí y a todos los que me rodean.

CONTENIDO

ÍNDICE DE ESQUEMAS	ix
INDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Citocinas.....	2
1.3. Transductor de señal y activador de transcripción (STAT)	6
1.4. Proteína C Reactiva (CRP).....	7
1.5. Autoinmunidad.....	9
1.6. Autoanticuerpos anti-citocinas asociados a la susceptibilidad a infecciones	13
1.6.1. Autoanticuerpos contra IFN γ	13
1.6.2. Autoanticuerpos contra IL-6.....	15
1.6.3. Autoanticuerpos contra células que producen citocinas Th17	16
1.6.4. Autoanticuerpos contra IL-10.....	16
1.6.5. Autoanticuerpos anti-GM-CSF	17
1.6.6. Patrones complejos de autoanticuerpos anti-citocinas	18
1.7. Bioensayos <i>in vitro</i>	19
1.8. Enfermedades autoinmunes en otras especies	21
1.9. Ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bio-Plex.....	22
1.10. Cromatografía de afinidad por columna.....	23
1.11. Afinidad y Avidéz	24
1.12. Microarreglos peptídicos.....	27

2. JUSTIFICACIÓN.....	28
3. HIPÓTESIS.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1. Objetivo general.....	31
4.2. Objetivos específicos	31
5. MATERIAL Y MÉTODOS	32
5.1. Ubicación	32
5.2. Muestras séricas.....	32
5.3. Población de estudio de caninos y equinos	32
5.4. Población de estudio de humanos	33
5.5. Categorías de enfermedades	33
5.6. Citocinas y microesferas.....	37
5.7. Obtención de los sistemas de citocinas acopladas a microesferas	37
5.8. Amino acoplamiento de proteínas (citocinas) a microesferas carboxiladas.....	37
5.9. Detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas caninas, equinas y humanas mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex)	40
5.10. Técnica de cromatografía de afinidad por columna	40
5.10.1. Preparación del material	41
5.10.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína	41
5.10.3. Procedimiento general para la purificación por afinidad	43
5.10.4. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad	45
5.11. Determinación de los niveles de autoanticuerpos contra citocinas en las muestras séricas y en algunas preparaciones de autoanticuerpos purificados mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple Luminex.....	46
5.12. Bioensayos <i>in vitro</i> para la determinación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-citocinas (IFN γ , IL-6 y IL-10) sobre la inhibición de la actividad biológica de la citocina blanco	46
5.12.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica y líneas celulares humanas.....	47

5.12.2. Evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IFN γ sobre la inhibición de la fosforilación de STAT-1 mediada por IFN γ , empleando la técnica de Luminex	48
5.12.3. Evaluación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-IL-6 sobre la inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6, empleando la técnica de Luminex	52
5.12.4. Evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-10 sobre la inhibición de la fosforilación de STAT-3 regulada por IL-10 empleando la técnica de Luminex	55
5.12.5. Evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6 sobre la inhibición de la producción de CRP mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex	58
5.13. Identificación de epítomos mediante microarreglos de péptidos	61
5.14. Análisis estadístico	62
6. RESULTADOS	64
6.1. Homología entre citocinas caninas, equinas y humanas	64
6.2. Evaluación del acoplamiento proteico, la integridad antigénica y la especificidad de cada sistema citocina-microesfera empleando anticuerpos específicos	65
6.3. Agrupación y número de muestras séricas para la detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en las diferentes especies (canino, equino y humano)	65
6.4. Determinación de la dilución óptima de trabajo para el análisis serológico de autoanticuerpos anti-citocinas mediante el ensayo multiplex	66
6.5. Detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en las muestras séricas de diferentes especies	66
6.5.1. Análisis serológico en muestras caninas	67
6.5.2. Análisis serológico en muestras equinas	78
6.5.3. Análisis serológico en muestras humanas	87
6.6. Determinación de los títulos de autoanticuerpos anti-citocinas en las muestras séricas de caninos, equinos y humanos mediante el ensayo de Luminex	98
6.7. Purificación de autoanticuerpos contra citocinas en humanos mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna.....	100
6.8. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-IFN γ en la función biológica de la fosforilación de STAT-1 mediada por IFN γ en muestras humanas	105
6.9. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-IL-6 en la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6	107

6.10. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-IL-10 en la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10	109
6.11. Evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6 sobre la inhibición de la producción de Proteína C Reactiva mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex	111
6.12. Análisis de los epítomos reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ	113
6.13. Mapeo de epítomos reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6	118
7. DISCUSIÓN.....	121
7.1. Autoanticuerpos anti-citocinas en caninos.....	121
7.1.1. Respuestas de autoanticuerpos anti-citocinas detectados en caninos y su asociación con grupos de enfermedad	121
7.1.2. Respuestas múltiples hacia autoanticuerpos anti-citocinas en caninos con enfermedad autoinmune y autoinflamatoria.....	124
7.1.3. Las citocinas producidas por Th1/Th17 y la IL-10 son citocinas blanco principales en caninos con enfermedades infecciosas	125
7.1.4. Patrones únicos de autoanticuerpos anti-citocinas en caninos.....	125
7.2. Autoanticuerpos anti-citocinas en equinos.....	126
7.2.1. Patrones específicos de autoanticuerpos anti-citocinas en equinos con enfermedad autoinmune/autoinflamatoria.....	126
7.2.2. Patrones específicos de autoanticuerpos anti-citocinas en equinos con enfermedades infecciosas	127
7.3. Autoanticuerpos anti-citocinas en humanos	127
7.3.1. Autoanticuerpos contra citocinas producidas por Th17	128
7.3.2. Autoanticuerpos anti-IFN γ	128
7.3.3. Autoanticuerpos anti-IL-6.....	129
7.3.4. Autoanticuerpos anti-GM-CSF	129
7.4. Análisis y caracterización de la actividad biológica neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina en humanos	129
7.5. Epítomos reconocidos por los autoanticuerpos contra IFN γ e IL-6	130
8. CONCLUSIONES	132
9. PERSPECTIVAS	134
10. REFERENCIAS	135

11. APÉNDICES	147
11.1. Apéndice 1.....	147
11.2. Apéndice 2.....	185

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Atributos de las citocinas.	4
Esquema 2. Representación esquemática de las diversas acciones de las citocinas.	5
Esquema 3. Factor de Transcripción STAT-1 y STAT-3	8
Esquema 4. Ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex).	12
Esquema 5. Cromatografía por afinidad.	25
Esquema 6. Escape de células T y B autorreactivas de la tolerancia central y periférica	26

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Número de muestras séricas caninas colectadas, ordenadas por grupo de pacientes especificando su padecimiento y de controles negativos.	34
Cuadro 2. Número de muestras séricas equinas colectadas y analizadas, ordenadas por grupo de pacientes , tipo de enfermedad y los controles negativos	35
Cuadro 3. Número de muestras séricas humanas colectadas y analizadas, ordenadas por grupo de pacientes especificando el tipo de enfermedad y los controles negativos	36
Cuadro 4. Sistemas citocina-microesfera empleados para el Mutliplexing	39

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas caninas mediante el sistema 45-plex citocina- microesfera	68
Figura 2. Mapa de calor de los valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras caninas de pacientes y controles sanos sin agrupación	70
Figura 3. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas en pacientes caninos e individuos clínicamente sanos	73
Figura 4. Mapa de calor de los valores MFI de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras caninas de pacientes con agrupación jerárquica	75
Figura 5. Mapa de correlación empleando el análisis de componentes principales en caninos (XLSTAT®)	77
Figura 6. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de equinos mediante el sistema 45-plex citocina- microesfera	79
Figura 6.1. Determinación de la dilución óptima de trabajo para el análisis serológico de autoanticuerpos anti-citocinas mediante el ensayo multiplex	152
Figura 7. Mapa de calor de los valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras equinas de pacientes y controles sanos sin agrupación	81
Figura 8. Mapa de calor de los valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras de pacientes equinos con agrupación jerárquica	82
Figura 9. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas en pacientes equinos e individuos clínicamente sanos	84
Figura 10. Mapa de correlación empleando el análisis de componentes principales en caninos (XLSTAT®)	86
Figura 11. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas equinas mediante el sistema 45-plex citocina- microesfera	88
Figura 12. Mapa de calor de los valores MFI de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas de pacientes y controles sanos sin agrupación	90

Figura 13. Mapa de calor de los valores MFI de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas de pacientes	92
Figura 14. Patrón de autoanticuerpos contra citocinas en pacientes humanos e individuos clínicamente sanos	94
Figura 15. Mapa de correlación empleando el análisis de componentes principales en humanos (XLSTAT®)	97
Figura 16. Valores MFI de algunas muestras séricas de pacientes en las tres diferentes especies	99
Figura 17. Purificación de autoanticuerpos anti-IFN γ e IL-10 de cuatro muestras séricas humanas	101
Figura 18. Mapa de calor de los MFI de autoanticuerpos detectados contra citocinas en muestras humanas	103
Figura 19. Purificación de autoanticuerpos anti-IL-10 en dos muestras séricas humanas	104
Figura 20. Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-1 inducida por IFN γ	106
Figura 21. Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6	108
Figura 22. Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-10	110
Figura 23. Producción de CRP en diferentes muestras positivas a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6	112
Figura 24. Mapeo de epítomos sintetizados a partir de microarreglos peptídicos comerciales	114
Figura 25. Análisis <i>in silico</i> del epítomo de interés con la secuencia del IFN γ humano	116
Figura 26. Alineación entre el epítomo de interés y el epítomo EE-IFN γ mediante el programa Mega 6.0 ®	117
Figura 27. Mapeo de epítomos sintetizados a partir de microarreglos comerciales	119
Figura 28. Representación gráfica obtenida mediante Pymol® de IL-6 en interacción con la subunidad gp130	120

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Homología entre citocinas de caninos y humanos	147
Tabla 2. Homología entre citocinas de equinos y humanos	148
Tabla 3. Características clínicas de caninos	149
Tabla 4. Características clínicas de equinos	150
Tabla 5. Características clínicas de humanos	151
Tabla 6. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas caninas con enfermedades autoinmunes acorde a la clasificación de las principales citocinas	154
Tabla 7. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas caninas con enfermedades infecciosas acorde a la clasificación de las principales citocinas	156
Tabla 8. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas caninas con enfermedades autoinflamatorias acorde a la de las principales citocinas	157
Tabla 9. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas caninas con otras enfermedades acorde a la clasificación de las principales citocinas	158
Tabla 10. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de caninos controles sanos acorde a la clasificación de las principales citocinas	161
Tabla 11. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en sueros equinos con enfermedades autoinmunes acorde a la clasificación de las principales citocinas	162
Tabla 12. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en sueros equinos con enfermedades infecciosas y sus principales citocinas	164
Tabla 13. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de equinos clínicamente sanos acorde a la clasificación de de las principales citocinas	166

Tabla 14. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas humanas con enfermedades autoinmunes acorde a la clasificación de las principales citocinas	172
Tabla 15. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de humanos con enfermedades infecciosas acorde a la clasificación de las principales citocinas	177
Tabla 16. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de humanos con enfermedades autoinmunes e infecciosas acorde a la clasificación de de las principales citocinas	178
Tabla 17. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de humanos con otras enfermedades acorde a la clasificación de las principales citocinas	180
Tabla 18. Valores MFI de los autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de humanos controles sanos acorde a la clasificación de las principales citocinas	183
Tabla 19. Determinación del título de autoanticuerpos en diferentes muestras séricas de las tres especies	184

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos	M	Molar
α	Prefijo de anti	MAb	Anticuerpo monoclonal
Ab's	Anticuerpos	MFI	Mean of fluorescence intensity
AIRE	Regulador autoinmune	MG	Miastenia Gravis
APECED	Poliendocrinopatía autoinmune tipo 1	min	Minuto
APS-1	Síndrome poliendócrino autoinmune-1	µg	Microgramo
auto-Ab's	Autoanticuerpos	uL	Microlitro
AUI	Autoinflamación	mL	Mililitro
BSA	Albumina sérica bovina	NaN3	Azida de sodio
° C	Grados centígrados	NH2	Aminas primarias
Ca	Cáncer	NK	Natural killer
CMC	Candidiasis mucocutánea crónica	PCA	Análisis de componentes principales
CRP	Proteína C Reactiva	rpm	Revoluciones por minuto
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	rHu	Recombinante humana
G-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos.	SD	Desviación estándar
GF	Factores de crecimiento	Seg	Segundo
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos.	SLE	Lupus eritematoso sistémico
IFN	Interferones	S-NHS	N-hydroxisulfosuccinimida
IgG	Inmunoglobulina G	STAT	Transductor de señales y activador transcripcional
IL	Interleucina	OD	Otras Enfermedades
kDa	Kilodalton	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

En este trabajo se determinó la presencia de autoanticuerpos (auto-Ab's) anti-citocinas en muestras séricas de caninos, equinos y humanos con diversas enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas en comparación con controles sanos, se evaluó la actividad neutralizante de auto-Ab's sobre la función biológica *in vitro* de algunas citocinas. Los auto-Ab's anti-citocinas se han asociado con inmunodeficiencia, susceptibilidad a enfermedades infecciosas, autoinmunidad e inflamación en humanos (Browne and Holland, 2010), donde han demostrado ser causantes de enfermedades importantes, emergentes y potencialmente mortales (Browne, 2014a). Las enfermedades autoinmunes asociadas a auto-Ab's contra citocinas hasta ahora no se han investigado en el campo veterinario. Para este estudio, se emplearon sistemas de citocinas recombinantes humanas acopladas a microesferas para evaluar mediante el ensayo de Luminex la detección de auto-Ab's en un total de 501 muestras séricas de pacientes e individuos clínicamente sanos (caninos, equinos y humanos). La técnica de cromatografía de afinidad por columna permitió purificar auto-Ab's humanos contra IFN γ , IL-6 e IL-10. Utilizando bioensayos *in vitro* se determinó la capacidad neutralizante de los auto-Ab's anti-IFN γ , anti-IL-6 y anti-IL-10 sobre STAT-1 y STAT-3, así como la producción de Proteína C Reactiva. A partir de microarreglos peptídicos, se realizó un análisis *in silico* que identificó epítomos reconocidos por auto-Ab's anti-IFN γ e IL-6. En 302 de 501 sueros de las tres especies se detectaron altos niveles de auto-Ab's (MFI \geq 15000) contra al menos una citocina, mientras en los controles negativos no se detectaron auto-Ab's. Se obtuvieron preparaciones de auto-Ab's anti-citocina purificados. Los ensayos de inhibición *in vitro* de la actividad biológica de citocinas permitieron sugerir un efecto neutralizante de algunos auto-Ab's. Así mismo, se identificaron los epítomos "HELIQVMAELSPA y EALAENNLN" para IFN γ e IL-6, respectivamente. Se encontraron distintos patrones complejos de respuesta hacia los Ab's anti-citocina asociados a su enfermedad. La implicación directa de los auto-Ab's en los procesos de enfermedad evidencia una función inhibitoria o protectora sobre la actividad biológica de su citocina respectiva, así mismo los dos principales epítomos identificados poseen una localización esencial para la señalización y la activación del complejo funcional en ambas citocinas.

ABSTRACT

In this work, the presence of anti-cytokine autoantibodies (auto-Ab's) was determined in serum samples of dogs, horses and humans with several infectious, autoimmune or autoimmune and infectious diseases compared to healthy controls to evaluate the neutralizing activity of auto-Ab's on the in vitro biological function of some cytokines. Anti-cytokine auto-Ab's have been associated with immunodeficiency, susceptibility to infectious diseases, autoimmunity and inflammation in humans (Browne and Holland, 2010), where they have been shown to cause important, emerging and life-threatening diseases (Browne, 2014a). Autoimmune diseases associated to anti-cytokines auto-Ab's have not yet been investigated in the veterinary field. Due to this, human recombinant cytokine systems coupled to microparticles were used for detection of auto-Ab's in a total of 501 serum samples from patients and clinically healthy individuals by the Luminex technique. The technique of affinity column chromatography allowed to purify human auto-Ab's against IFN γ , IL-6 and IL-10. Using in vitro bioassays, the neutralizing capacity of auto-Ab's anti-IFN γ , anti-IL-6 and anti-IL-10 on STAT-1 and STAT-3 was determined, as well as the production of C Reactive Protein. Based on peptide microarrays, an in silico analysis was performed to identify epitopes recognized by auto-Ab's anti-IFN γ and anti-IL-6. In 302 out of 501 sera of the three species, high levels of anti-cytokine auto-Ab's (≥ 15000) were detected, while in the healthy controls no auto-Ab's were detected. Purified anti-cytokine auto-Ab preparations were obtained. In vitro inhibition assays of the cytokine biological activity allowed to suggest a neutralizing effect of some auto-Ab's. Likewise, the epitopes "HELIQVMAELSPA and EALAENNLN" were identified for IFN γ and IL-6, respectively. Different complex patterns of response to anti-cytokine Ab's were found associated with their disease. The direct implication of auto-Ab's in disease processes demonstrates a inhibitory or protective function on the biological activity of their targeted cytokine, the main epitopes identified have an essential location for signaling and activation of the functional complex in both cytokines.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

En el curso normal de una infección y hasta la presentación de los signos clínicos, el agente infeccioso provoca una respuesta inmune innata, seguida de una respuesta inmune adaptativa que elimina la infección y establece un estado de inmunidad protectora. Esto no ocurre en individuos con inmunodeficiencia, este término engloba todo un conjunto de entidades causadas por alteraciones cualitativas y cuantitativas de uno o más componentes específicos o inespecíficos del sistema inmune, que se manifiestan clínicamente como un incremento de la susceptibilidad a infecciones; atendiendo a su causa, pueden clasificarse en dos grandes grupos: inmunodeficiencias primarias o congénitas, cuya causa es un defecto genético intrínseco del sistema inmune, y secundarias o adquiridas, las cuales aparecen como consecuencia a una gran variedad de condiciones patológicas como neoplasias, infecciones, malnutrición, enfermedades (como el síndrome nefrótico y la enteropatía por pérdida de proteína), entre otras (Bellanti, 2016; Cortes, 2019; Egli *et al*, 2012; Fernandes, 2010).

Un ejemplo de inmunodeficiencias primarias son los reportes de mutaciones en genes que codifican para proteínas de la vía del IFN γ dependiente de IL-12, incluyendo mutaciones en los receptores alfa y beta para IFN γ y en el receptor beta1 para la IL-12, la existencia de una de estas mutaciones predisponen al individuo a una alta susceptibilidad a infecciones por micobacterias, como *Mycobacterium tuberculosis*, el cual es el agente causal de la tuberculosis y se considera como el patógeno humano más exitoso. Estos trabajos y otros estudios indican que ésta vía mediada por la IL-12 es importante para el control de *Mycobacterium tuberculosis* y otros patógenos intracelulares (Altare *et al.*, 1998a; Altare *et al.*, 1998b; Caragol *et al.*, 2003; Doffinger *et al.*, 2004; Pedral-Sampaio *et al.*, 2002; Pedral-Sampaio *et al.*, 2003; Picard *et al.*, 2015).

El desarrollo no completo de tolerancia hacia proteínas propias o a otras proteínas inmunes puede permitir el desarrollo de auto-Ab's. La presencia de auto-Ab's "naturales" con funciones neutralizantes hacia una variedad de citocinas en humanos, se han reportado en individuos sanos y en ciertos grupos de pacientes con diversas infecciones. A menudo, se observa la presencia de auto-Ab's en bajos títulos; sin embargo, títulos más elevados

podrían considerarse con cierto significado patológico funcional y se sugiere un papel potencial de estos auto-Ab's anti-citocina en la regulación del sistema inmunitario (Dinarello, 2007).

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

Por lo anterior, un cúmulo de evidencia reciente pone de relieve la importancia de las inmunodeficiencias secundarias causadas por la presencia de auto-Ab's anti-citocinas en donde altos títulos de estos auto-Ab's neutralizantes causan susceptibilidad a una amplia variedad de posibles enfermedades que amenazan la vida del individuo (Maddur *et al.*, 2010).

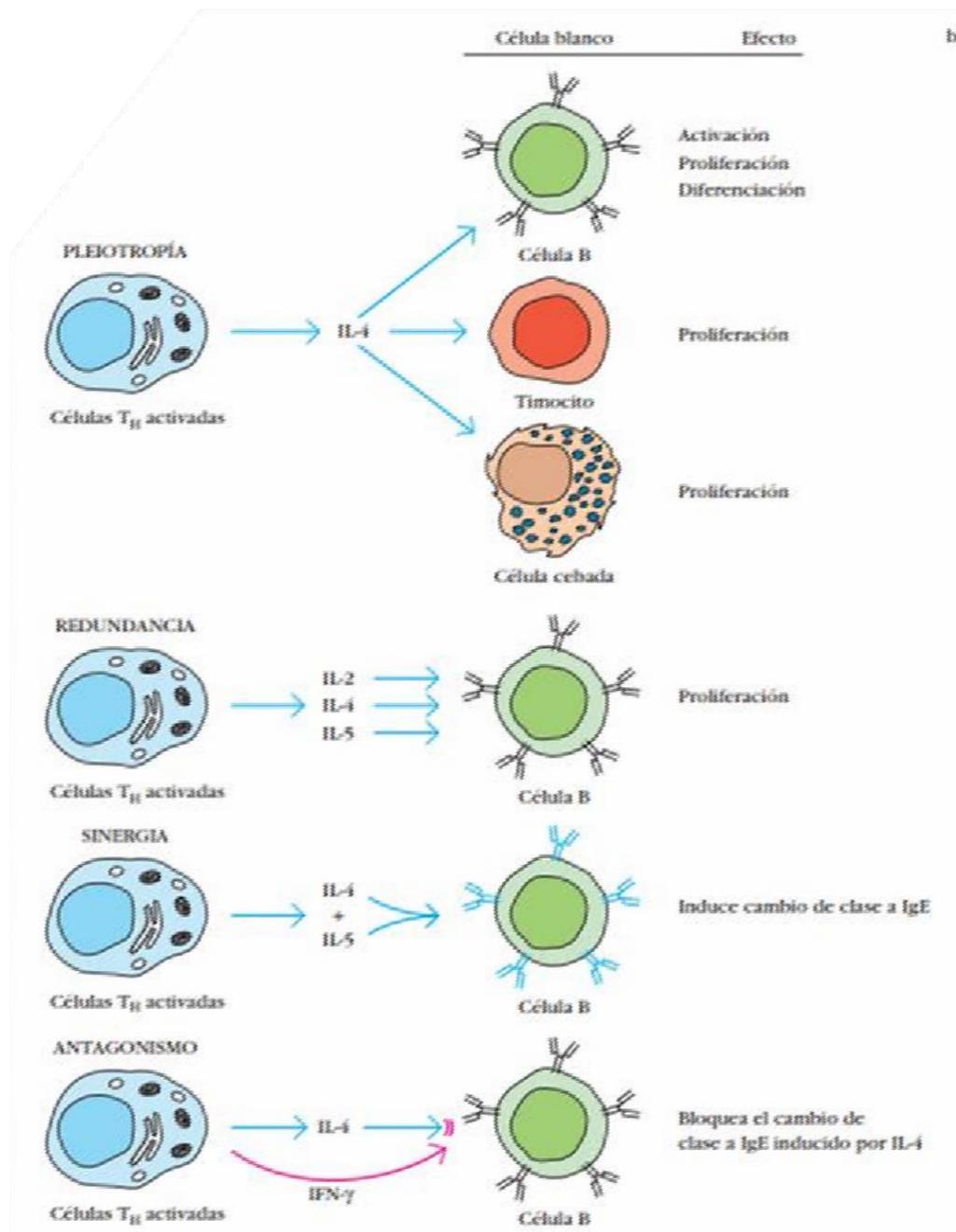
1.2. Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas y péptidos de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos que forman la red de comunicación intercelular de todos los sistemas celulares del cuerpo, incluyendo el sistema inmune. Aunque en general son producidas por leucocitos, algunas citocinas pueden también ser secretadas por otros tipos celulares. Son moléculas de señalización similares a las hormonas y a los neurotransmisores que permiten la comunicación celular, afectando el comportamiento de otras células, por medio de receptores específicos para cada una de ellas (Bellanti, 2016).

Las citocinas se diferencian de las hormonas en varios aspectos por ejemplo, las citocinas presentan pleiomorfismo, es decir una determinada citocina puede afectar múltiples tipos celulares, de igual manera, presentan un alto grado de redundancia y sinergismo, ya que diferentes citocinas pueden ejercer una misma función y los efectos que presentan

combinadas son mayores que la suma de sus efectos individuales. Así mismo, en algunos casos, las citocinas muestran antagonismo, es decir, los efectos de una citocina inhiben o neutralizan las acciones de otras citocinas (**Esquema 1**). La mayoría de las citocinas actúan a corta distancia de manera autocrina o paracrina. Una citocina dada puede unirse a receptores en la membrana de la misma célula que la secreta y ejercer una acción autocrina, adherirse a receptores en una célula blanco cercana a la célula productora y llevar a cabo un efecto paracrino; en unos cuantos casos, se une a células blanco de partes distantes del cuerpo y tiene una acción endocrina (**Esquema 2**). Mientras tanto las hormonas al ser sustancias segregadas por glándulas endocrinas y/o células epiteliales (carentes de conductos), suelen actuar de forma endocrina, es decir a larga distancia, además las hormonas son secretadas en forma cíclica, de manera intermitente o en pulsos; normalmente siempre está ocurriendo alguna secreción y la tasa de producción puede aumentar o disminuir, según los requerimientos celulares (Bliss, 2009; Denkers *et al.*, 2003; Kindt, 2014).

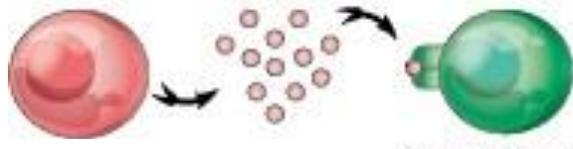
Las citocinas juegan un papel muy importante en el proceso de montaje de respuestas anti-microbianas debido a sus habilidades para regular la respuesta inmune innata y adaptativa, en la polarización de la respuesta de células T y por actuar como moléculas efectoras. Por ejemplo, en el caso de las células 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 tuberculosis*; 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 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 (Denkers, 2003; Kasama *et al.*, 1993).



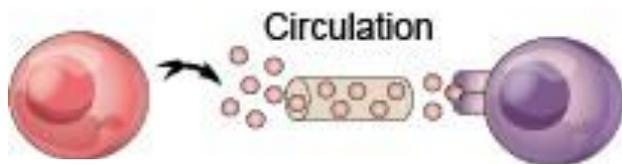
Esquema 1. Atributos de las citocinas. Las citocinas muestran características de pleiotropía, redundancia que les permiten regular la actividad celular en una forma interactiva Tomado de (Kindt, 2014).



Acción autocrina



Acción paracrina



Acción endocrina

Célula distante

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

Es posible clasificar a las citocinas de acuerdo a la función que ejercen en la respuesta inmune promoviendo o inhibiendo la inflamación (pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, respectivamente). Dentro de las citocinas pro-inflamatorias se tiene como ejemplo a miembros de la familia de la IL-6 (IL-6, IL-11, IL-31), de la IL-1 (IL-1b, IL-18, IL-33), de los interferones (IFN γ , IL-28 β o IFNL3), de IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27) y del TNF α , así como la IL-15 y la IL-21. Mientras que miembros de la familia de la IL-10 (IL-10, IL-19, IL-26) son algunos ejemplos de citocinas anti-inflamatorias con características bioquímicas comunes, estas son producidas por muchos tipos celulares en forma constitutiva o en respuesta a estímulos exógenos o endógenos; por otro lado, podemos considerar a las células que producen citocinas Th17 y que juegan un papel crucial en la respuesta inmune hacia algunos microorganismos, además de promover la inflamación y participar activamente en la autoinmunidad (Zlotnik and Yoshie, 2012).

Así mismo, existen citocinas que pueden participar en procesos de regulación, como la IL-10 e IL-22 (citocinas regulatorias), incluso pueden tener una actividad altamente pleiotrópica, reportes recientes han confirmado la existencia de algunos grupos combinados de citocinas e interferones. Las citocinas regulatorias poseen funciones homeostáticas en la hematopoyesis, el inicio de la respuesta inmune adaptativa y la vigilancia inmune (Commins *et al.*, 2008).

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

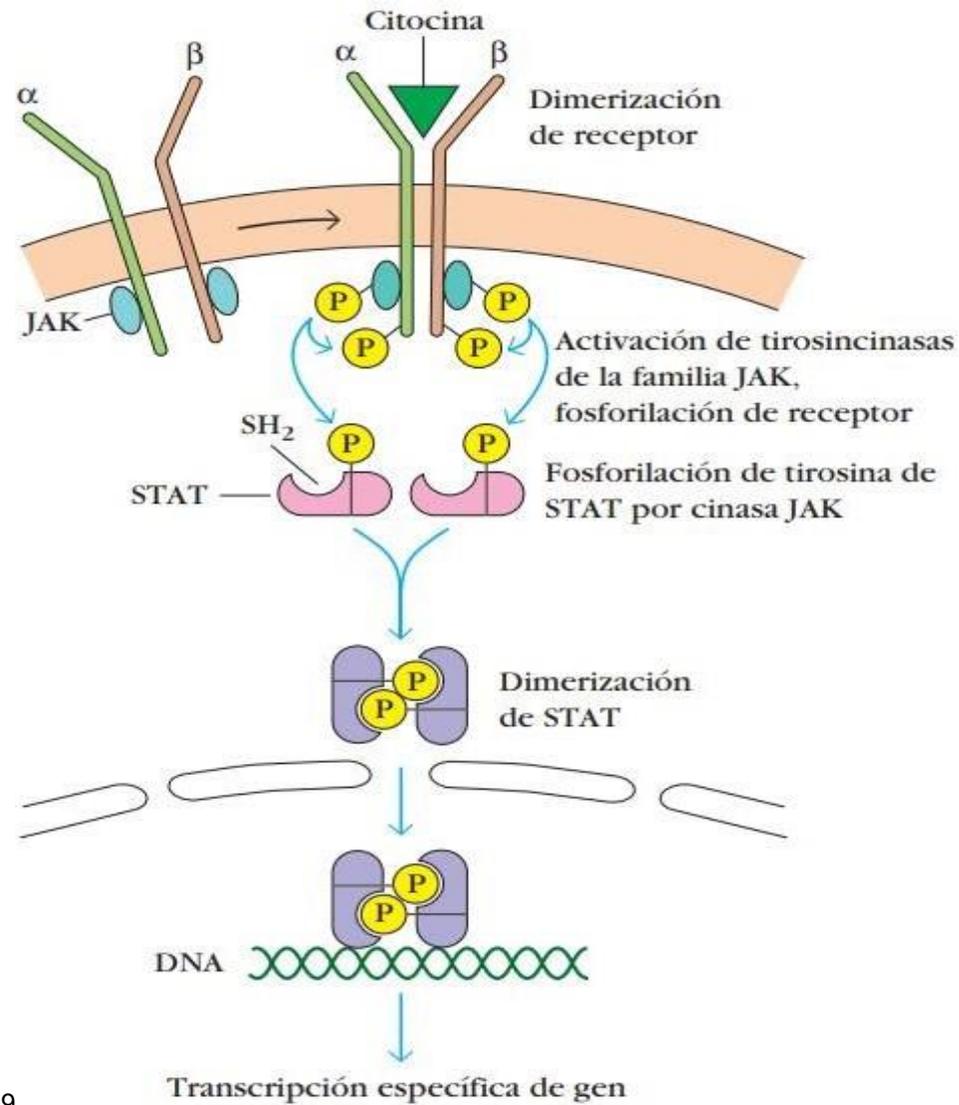
Las citocinas ejercen sus efectos biológicos uniéndose a receptores específicos expresados en la membrana de células blanco reactivas. Diferentes tipos celulares expresan estos receptores y son susceptibles a la acción de las citocinas. Cada receptor, percibe estímulos y comienza a transferir señales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

Las proteínas JAK son las únicas proteínas con actividad de tirosina cinasa que se asocian con receptores de citocinas y se unen a las regiones citoplasmáticas de los receptores de citocinas tipo I y II. La multimerización de los receptores ocurre cuando los ligandos se unen a éstos, la asociación de los receptores activados con las JAK es fundamental para iniciar la transfosforilación de JAK y el posterior reclutamiento de una o más moléculas de STAT para ser fosforiladas éstas últimas. Eventualmente, los STAT dimerizados y fosforilados ingresan al núcleo para regular la transcripción de múltiples genes diana (**Esquema 3**) (Niemand *et al.*, 2003).

Las proteínas JAKs son un componente central en la regulación de la señalización para la producción de las citocinas. Debido al papel crítico de las citocinas en la mediación de la inflamación y la inmunidad, se propone que la activación constitutiva de las JAKs puede contribuir a los desórdenes hematopoyéticos, a las enfermedades inflamatorias y a los problemas de autoinmunidad (Bellanti, 2016). Por lo tanto, la vía JAK-STAT es esencial para la síntesis de una amplia gama de citocinas y factores de crecimiento, lo que lleva a eventos celulares críticos como la hematopoyesis, la lactancia y el desarrollo del sistema inmunitario (Khajoei *et al.*, 2014).

1.4. Proteína C Reactiva (CRP)

Uno de los principales mediadores de la inflamación que se produce en respuesta a la IL-6 es la CRP, una proteína de fase aguda producida principalmente en hepatocitos siendo un activador de la inmunidad innata. La CRP posee una estructura pentamérica y un peso molecular de 120 kDa. Es secretada por los hepatocitos en respuesta a la IL-6 y al $TNF\alpha$. Posee una gran sensibilidad como marcador de inflamación y predictor de diferentes enfermedades que cursan con asociación a un proceso infeccioso, sin embargo niveles altos de CRP no explican la causa ni indican un lugar preciso de inflamación, por lo que deben ser considerados con cautela, adicionalmente un nivel de CRP más alto de lo normal no significa necesariamente un problema médico que requiera tratamiento, ya que existen otros factores que pueden aumentar los valores de esta proteína como son obesidad, tabaquismo, estrés, entre otros. Así mismo, la liberación de CRP produce la activación endotelial de la vía $NF-\kappa B$, la inducción del PAI-1, IL-6, IL-1 β , $TNF\alpha$, MCP-1 y endotelina-1 así como la inhibición de la óxido nítrico sintasa (Kamioka *et al.*, 2008; Warnberg *et al.*, 2006).



9

Esquema 3. 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, lo que causa la activación de tirosina cinasas JAK relacionadas con el receptor a través de fosforilación recíproca. Después, las del receptor 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 (Kindt, 2014).

Los mecanismos inflamatorios que se pueden presentar en las fases tempranas de un proceso infeccioso o autoinmune estimulan la secreción de diferentes mediadores químicos que por vía portal se trasladan al hígado promoviendo la síntesis de proteínas de fase aguda mencionadas anteriormente. La CRP estimula la expresión endotelial de moléculas de adhesión como E-selectina (E-S), VCAM-1 y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), estas moléculas producen un cambio conformacional en el dominio extracelular que afecta la función de las células, genera cambios intracelulares en el citoesqueleto o en su composición química, activan la transducción de señales intracelulares y son coestimuladoras para la producción de mediadores químicos como IL-2, para la expresión de antígenos de activación y la proliferación de linfocitos después del reconocimiento antigénico (Warnberg *et al.*, 2006). La participación de la inflamación en procesos de autoinmunidad ha llevado a la utilización de indicadores inflamatorios para la predicción de marcadores pronósticos en la terapia con anticuerpos.

La CRP es uno de los biomarcadores más aceptado, porque refleja apropiadamente el proceso inflamatorio subyacente y se correlaciona con otras moléculas como VCAM-1 e IL-6. Por lo anterior, resultó interesante establecer un ensayo que determine la producción de CRP en pacientes con inflamación e infecciones recurrentes, para caracterizar la habilidad de los auto-Ab's para bloquear la producción de CRP dependiente de la vía de señalización de IL-6 (Jones *et al.*, 1999; Nanki *et al.*, 2013; Puel *et al.*, 2008a).

1.5. Autoinmunidad

La integridad del sistema inmunitario es fundamental para la protección del individuo contra los microorganismos infecciosos y sus productos tóxicos. Los defectos en uno o más de los componentes del sistema inmunitario pueden conducir a la aparición de trastornos graves que a menudo son mortales, algunos de estos defectos son la autoinmunidad y las inmunodeficiencias (Rosenblum *et al.*, 2015).

El término de autoinmunidad se refiere a una inapropiada respuesta inmune contra componentes propios del hospedero que resulta en condiciones patológicas. En forma muy general las enfermedades autoinmunes son caracterizadas por una activación de células T y células B autorreactivas, y están asociadas en algunos casos con la producción de auto-Ab's

contra moléculas propias (Agmon-Levin *et al.*, 2009; Baharav *et al.*, 1994; Hewagama and Richardson, 2009; Invernizzi, 2009; Kivity *et al.*, 2009).

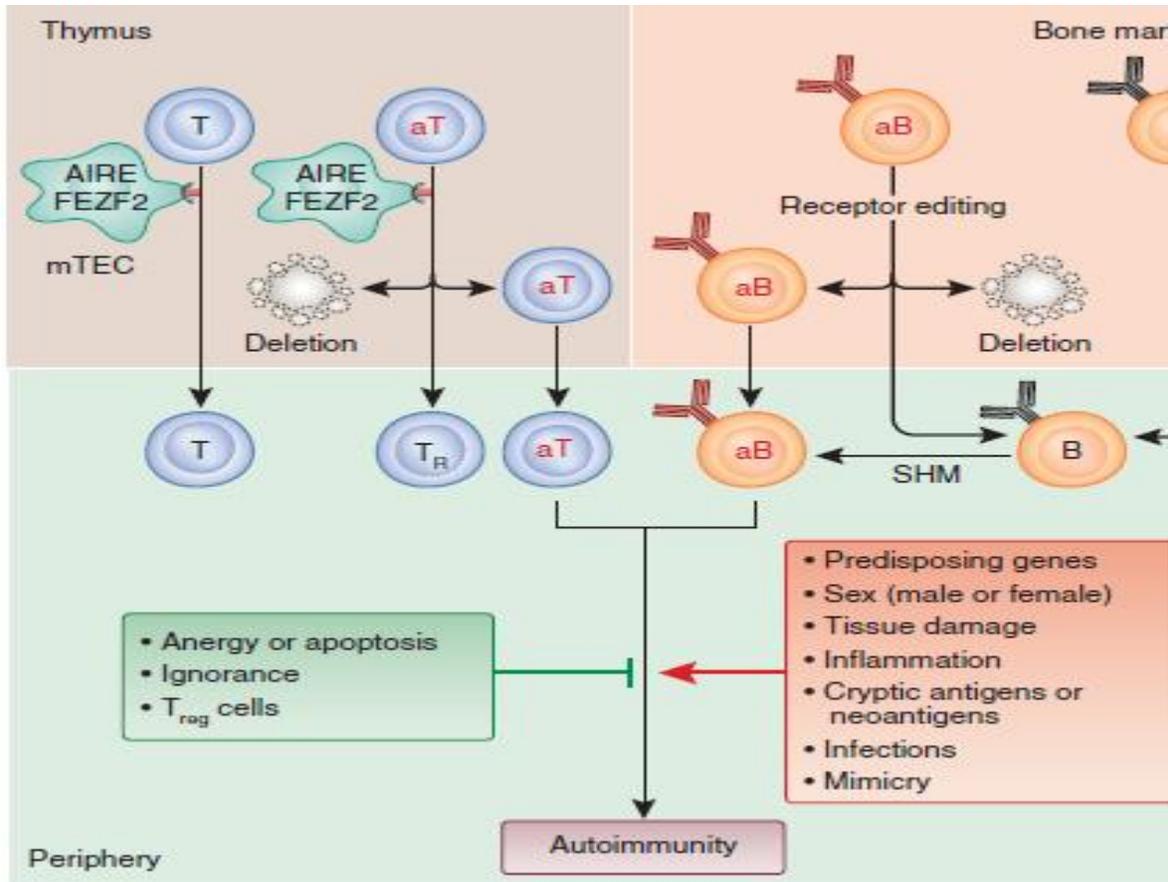
La distinción entre lo extraño y lo propio por el sistema inmune no es absoluta, en ciertas circunstancias la respuesta inmunitaria puede ser dirigida de manera incorrecta contra la misma entidad que se pretende proteger. En consecuencia, las respuestas aberrantes a lo propio se han relacionado con un amplio repertorio de trastornos autoinmunes y autoinflamatorios, definidos colectivamente como enfermedades autoinmunes (Theofilopoulos *et al.*, 2017).

La respuesta inmune contra antígenos propios varía desde un bajo nivel "fisiológico" de autorreactividad esencial para la selección de linfocitos y la homeostasis del sistema inmunitario, a un nivel intermedio de autoinmunidad que se manifiesta como auto-Ab's circulantes e infiltrados en tejidos menores sin consecuencias clínicas, a la autoinmunidad patógena asociada con lesión orgánica mediada por el sistema inmune. La mayoría de las enfermedades autoinmunes exhiben heterogeneidad clínica, una naturaleza poligénica y contribuciones multifactoriales que a menudo requieren factores genéticos y ambientales. Una pregunta clave en este campo es cómo un sistema de reconocimiento de antígenos inmensamente diverso, creado principalmente para detectar y eliminar patógenos nocivos, evita provocar respuestas auto destructivas. Los principales mecanismos de tolerancia se ejercitan centralmente: en el timo, para las células T, en el hígado fetal y médula ósea, para células B (Legoux *et al.*, 2015; Malhotra *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2015).

La opinión predominante ha sido que la selección negativa elimina las células T autorreactivas con alta fidelidad. Sin embargo, una serie de estudios han mostrado una considerable "fuga" en este proceso (**Esquema 4**). Por ejemplo, algunos análisis han demostrado que la frecuencia y la avidéz de las células T CD8+ específicas para diversos péptidos derivados de virus están en el mismo rango que las células que reconocen los auto-péptidos, en cuanto a las células T CD8+ específicas para un antígeno determinado, se ha observado que la predisposición genética a enfermedades autoinmunes supone un riesgo mucho mayor en las mujeres respecto a los hombres (Malhotra *et al.*, 2016). Por lo tanto, se ha supuesto que la selección negativa "poda" el repertorio con una eficiencia proporcional al grado de expresión de auto-antígenos expresado en el timo, pero no elimina completamente las células T autorreactivas. Durante la diferenciación, los precursores de células T y B con

autorreactividad se seleccionan positivamente en la corteza tímica y médula ósea, respectivamente; aquellos con baja avidéz hacia sí mismos se exportan a la periferia, las células T autorreactivas con alta avidéz por los antígenos propios expresados en las células epiteliales del timo medular, se encuentran bajo el control del gen regulador de autoinmunidad (AIRE) o la Familia de dedos de Zinc 2 (FEZF2), y se eliminan o diferencian en células T reguladoras (Treg), mientras que las células B autorreactivas pueden ser eliminadas o reclasificadas mediante edición del receptor. Sin embargo, la tolerancia central es incompleta y algunas células T y B reactivas se exportan a la periferia. La generación de células B autorreactivas también puede ocurrir en la periferia por el proceso de hipermutación somática. Las células exportadas normalmente están controladas por mecanismos de tolerancia periféricos, que incluyen moléculas inhibitorias, anergia, ignorancia y supresión por las células Treg. Sin embargo, existen organismos genéticamente predispuestos donde diversos factores, como el daño tisular, la inflamación, la presentación de autoantígenos secuestrados y los miméticos microbianos, podrían provocar una ruptura en la tolerancia y conducir a la autoinmunidad (Lees *et al.*, 2006; Malhotra *et al.*, 2016).

El desarrollo no completo de tolerancia hacia componentes propios, como podrían ser las citocinas, puede permitir el desarrollo de auto-Ab's contra éstos; interesantemente, en los últimos años los auto-Ab's contra citocinas son cada vez más reconocidos como posibles desencadenantes de inmunodeficiencias secundarias, aunque no se ha logrado establecer la causalidad definitiva en todos los casos, estos auto-Ab's que generalmente son de clase IgG pueden participar en la susceptibilidad del individuo a diversas manifestaciones infecciosas y/o inmunológicas dependiendo de la citocina blanco. Es importante mencionar que la presencia de auto-Ab's en niveles bajos se ha identificado en la mayoría de los individuos clínicamente sanos, se ha sugerido que pueden desempeñar un papel en la regulación fisiológica de las actividades biológicas de las citocinas, ya sea por neutralización o quizás prolongando su vida media por la formación de complejos citocina-anticuerpo (Dinarello, 2007; Kearney *et al.*, 1994).



Esquema 4. Escape de células T autorreactivas y células B de la tolerancia central y el compromiso en la periferia. Los precursores de células T y B con autorreactividad se seleccionan positivamente en los órganos de tolerancia central. Sin embargo, la tolerancia central es incompleta y algunas células T y B reactivas se exportan a la periferia. Las células exportadas están controladas por mecanismos de tolerancia periféricos, aunque en organismos genéticamente predispuestos, el daño tisular, la inflamación y la presentación de autoantígenos secuestrados, crípticos o nuevos o los miméticos microbianos podrían provocar una ruptura en la tolerancia y la autoinmunidad (Malhotra *et al.*, 2016).

1.6. Autoanticuerpos anti-citocinas asociados a la susceptibilidad a infecciones

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

En algunos reportes que han identificado auto-Ab's contra citocinas, han establecido la asociación de éstos en la patogénesis de las enfermedades infecciosas, sin embargo, el mecanismo subyacente al desarrollo de los auto-Ab's hacia algunas citocinas no está claro aún, a pesar del creciente reconocimiento de su impacto clínico. Paulatinamente, se han incrementado el número de estudios en donde se identifica la presencia de auto-Ab's anti-citocinas con funciones neutralizantes individuales o como parte de patrones complejos de auto-Ab's que se asocian con inmunodeficiencias caracterizadas por susceptibilidad a diferentes patógenos (Patel *et al.*, 2008).

1.6.1. Autoanticuerpos contra IFN γ

El IFN γ es la citocina clave en la defensa intracelular del huésped, es producida principalmente por células Th1 y asesinas naturales (NK) en respuesta a estímulos que involucran la coestimulación mediada por IL-12/23; el IFN γ actúa sobre los macrófagos y otras células en las cuales induce la destrucción intracelular de patógenos fagocitados. Por lo anterior, resulta esencial participación de esta citocina como molécula clave en la defensa contra patógenos intracelulares facultativos. Interesantemente, una correlación entre la presencia de auto-Ab's neutralizantes hacia IFN γ y la susceptibilidad a infecciones micobacterianas ha sido reportada en diversos estudios, en humanos donde se demuestran que existe una deficiencia adquirida en la inmunidad mediada por esta citocina. Las características clínicas de los pacientes con auto-Ab's anti-IFN γ de la clase IgG son análogas a aquellos con defectos genéticos en la vía IFN γ /IL-12, que se caracteriza porque presentan una infección diseminada por micobacterias de baja virulencia, indicando que los auto-Ab's

anti-IFN γ de la clase IgG inducen un estado de inmunodeficiencia adquirida y predisponen al huésped a las infecciones por micobacterias (Bustamante *et al.*, 2014).

En 2004, Döffinger y colaboradores describen a un paciente con una infección diseminada causada por *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium chelonae* que posteriormente falleció por la infección, el paciente también desarrolló diabetes autoinmune (tipo I) e hipotiroidismo primario; en su suero se detectó un alto título de auto-Ab's anti-IFN γ de la clase IgG capaz de bloquear *in vitro* la respuesta de producción de TNF α por las células mononucleares de sangre periférica (PBMC'S) de donadores sanos (Doffinger *et al.*, 2004). Al mismo tiempo, Hofflich 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 causada por este último microorganismo, importantemente, en el plasma del paciente se detectó una fuerte actividad inhibitoria de auto-Ab's anti-IFN γ (Hoflich *et al.*, 2004).

Los anticuerpos anti-IFN γ pueden ser funcionales ya que son capaces de 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's. Estas observaciones sugirieron que los auto-Ab's contra IFN γ pueden inducir una susceptibilidad de inicio tardío a infecciones micobacterianas diseminadas (Kampmann *et al.*, 2005). Así mismo, otro grupo de investigadores detectó altos títulos de auto-Ab's anti-IFN γ de la clase IgG neutralizantes en el plasma de seis pacientes que presentaban infección diseminada predominantemente con micobacterias de crecimiento rápido, demostrando que estos auto-Ab's tienen una actividad biológica *in vitro* neutralizante del IFN γ , afectando la fosforilación de STAT-1 y la sobre-expresión de citocinas (TNF γ e IL-12), ambos dependientes de IFN γ (Smita Y. Patel *et al.*, 2005).

Posteriormente, en 2009, Baerlecken y colaboradores describen a un individuo con una infección multifocal por *Mycobacterium avium-intracellulare* que presentaba un alto título de auto-Ab's anti-IFN γ , quien con un tratamiento de plasmaféresis y ciclofosfamida en conjunto con la quimioterapia anti-micobacteriana logró la remisión del proceso infeccioso (Baerlecken *et al.*, 2009). Diferentes reportes han demostrado la presencia de auto-Ab's contra IFN γ en

individuos con susceptibilidad a infecciones por patógenos intracelulares (Browne and Holland, 2014b; Lin *et al.*, 2016).

1.6.2. Autoanticuerpos contra IL-6.

La IL-6 es una citocina pleiotrópica, la cual es rápidamente producida en respuesta a daño tisular e infecciones, jugando un papel importante en la inmunidad innata y adaptativa. En el 2008, Puel y colaboradores reportaron el caso de un niño con celulitis estafilocócica recurrente y abscesos subcutáneos, en el curso de los acontecimientos clínicos se identificó la aparición de auto-Ab's anti-IL-6 que precedió a la infección por *Staphylococcus* (Puel *et al.*, 2008a). Así mismo, otros tres pacientes con altos títulos de auto-Ab's neutralizantes contra la IL-6 presentaron infecciones por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* y *Escherichia coli*, es de notar que en todos los pacientes los niveles de la proteína C reactiva en respuesta a estas infecciones no fue elevado; este hallazgo puede ser explicado debido la presencia de auto-Ab's anti-IL-6 en el suero de estos pacientes, dado que estos auto-Ab's pueden estar bloqueando la vía de señalización de la IL-6 e inhibir el incremento de la proteína C reactiva (CRP) (Browne and Holland, 2014b; Nanki *et al.*, 2013). Es importante mencionar que previamente a estos estudios existía un reporte de inmunodeficiencia primaria asociado con defectos en la vía de señalización de la IL-6, particularmente la deficiencia en la producción de esta citocina se relacionó como un factor predisponente del huésped a infecciones bacterianas piogénicas (Puel *et al.*, 2008b)

Sin embargo, existen reportes donde mencionan que los auto-Ab's anti-citocina exacerbaban las enfermedades incrementando la biodisponibilidad de la citocina objetivo, tal como se muestra para IL-6 en la esclerosis sistémica, donde la formación de inmuno-complejos se asocia con la intensificación de los signos clínicos; de forma similar se ha reportado para los auto-Ab's anti-IL-8 en el síndrome de dificultad respiratoria del adulto y en la artritis reumatoide. Por lo tanto, un papel importante de los auto-Ab's anti-citocinas en la modulación de enfermedades autoinflamatorias es cada vez más reconocido (Knight *et al.*, 2016).

1.6.3. Autoanticuerpos contra células que producen citocinas Th17

Para el desarrollo de células Th17 es requerida la IL-23 que se produce principalmente por células dendríticas y macrófagos, las células Th17 producen principalmente citocinas como la IL-17A, IL-17F e IL-22, que juegan un papel importante en la defensa de las mucosas particularmente contra *Candida*, a través del reclutamiento y activación de los neutrófilos induciendo la liberación de defensinas anti-fúngicas. En este sentido, la presencia de auto-Ab's neutralizantes hacia citocinas Th17 se ha asociado a individuos con predisposición a infecciones fúngicas diseminadas. Interesantemente, diferentes reportes han encontrado auto-Ab's neutralizantes hacia el grupo de citocinas IL-17 asociados a infecciones micóticas generalizadas; así mismo auto-Ab's 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 (Baerlecken *et al.*, 2009; Dubin and Kolls, 2008; Kisand *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2016; Puel *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2008a).

1.6.4. Autoanticuerpos contra IL-10

La IL-10 es sintetizada por células inmunológicas, tejidos neuroendocrinos y neurales. La producción de IL-10 se ve inhibida por varias citocinas, como la IL-4, IL-13 e IFN γ , para su autorregulación. La IL-10 actúa sobre las células presentadoras de antígeno mediante la inhibición de la síntesis de citocinas, moléculas co-estimuladoras y moléculas HLA clase II. Así mismo, la IL-10 regula la proliferación y diferenciación de las células T, destacando en particular su capacidad para inhibir citocinas proinflamatorias, aumentar la proliferación de mastocitos e impedir la producción de IFN γ ; esta citocina tiene una particular función pleiotrópica, ya que inhibe de manera general mecanismos inmunes (Medina *et al.*, 2011). Recientemente, se ha reportado la presencia de auto-Ab's anti-IL-10 como una nueva causa de inicio muy temprano de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, del inglés *Inflammatory bowel disease*), donde se sugiere que la deficiencia funcional de IL-10 es debida a un alto título de auto-Ab's neutralizantes contra IL-10; así mismo, la identificación de estos auto-Ab's se ha propuesto como un nuevo mecanismo patogénico para IBD, lo cual ha permitido implementar una terapia inmunológica dirigida que previene la inmunosupresión a largo plazo

y la resolución, más que el control del proceso inflamatorio (Glocker *et al.*, 2011; Venero and Ribaldone, 2018).

1.6.5. Autoanticuerpos anti-GM-CSF

El GM-CSF es una citocina perteneciente a la familia de factores estimulantes de colonias y parte de los factores de crecimiento hematopoyético, esta citocina se pliega en una estructura agrupada de cuatro hélices α anti-paralelas, la cual es producida por células mieloides, células dendríticas, 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 maduración convencional de la células dendríticas (para presentación de antígenos), la polarización de los macrófagos M1 (para la producción de citocinas proinflamatorias, fagocitosis y presentación de antígenos), la activación de neutrófilos (fagocitosis, estallido oxidativo y producción de óxido nítrico) y la angiogénesis (Bellanti, 2016). Es reconocido que *Cryptococcus* tiene la capacidad de disminuir la producción de GM-CSF por linfocitos T y células NK, por ende afectando la actividad fagocítica de los macrófagos, lo que implica que una actividad defectuosa del macrófago alveolar permite la diseminación y penetración hacia sistema nervioso central (Trapnell *et al.*, 2009).

Particularmente, los pacientes que sufren de proteinosis alveolar pulmonar (PAP) presentan auto-Ab's neutralizantes contra el GM-CSF y muestran una alta mortalidad debido a la infección por *Nocardia*, los autores confirman la relación causal entre el funcionamiento defectuoso de GM-CSF por los auto-Ab's y PAP (Akasaka *et al.*, 2009; Trapnell *et al.*, 2009). Por otra parte en 2013, Rosen y sus colaboradores reportaron la posible relación entre pacientes que presentaban meningitis criptocócica y altos títulos de auto-Ab's contra GM-CSF, aunque algunos no presentaban PAP o alguna otra condición de inmunocompromiso (Rosen *et al.*, 2013). Así mismo, Browne estableció la relación entre altos títulos de auto-Ab's anti-GM-CSF en el plasma de cinco pacientes con meningitis, de un total de siete (solo dos de ellos presentaban PAP); se observó que el plasma de dichos pacientes inhibió la fosforilación de STAT-5 inducida por GM-CSF y bloqueó la expresión de la proteína MIP-1 α inducida también por GM-CSF, demostrando que estos auto-Ab's estaban biológicamente

activos y que eran los causantes de una susceptibilidad a meningitis por *Nocardia* (Browne, 2014a).

1.6.6. Patrones complejos de autoanticuerpos anti-citocinas

Recientemente se han descrito diferentes condiciones de enfermedad multisistémica que identifican un amplio repertorio de patrones de auto-Ab's anti-citocinas en individuos con síndrome multi-orgánico, tales como los pacientes con poliendocrinopatía autoinmune tipo 1 (APECED, del inglés *Autoimmune Poly-Endocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*), causada por mutaciones en el gen AIRE (AIRE, del inglés "*Autoimmune regulator*") en estos pacientes se reportó la presencia de auto-Ab's neutralizantes contra IFN γ , IFN2a, IL-17A e IL-22, demostrándose una correlación positiva entre la aparición de complicaciones infecciosas (por hongos, micobacterias y virus) y la complejidad de respuesta de sus auto-Ab's; existen situaciones donde se ha observado la presencias de auto-Ab's hacia múltiples citocinas en procesos infecciosos y de autoinmunidad; estas respuesta de auto-Ab's no son exclusivas hacia una citocina blanco, por lo tanto, el termino respuesta compleja incluye la enfermedad del paciente y la detección hacia múltiples auto-Ab's anti-citocina. Basado en lo anterior, podemos considerar que la detección de auto-Ab's contra IL-17 e interferones tipo I tiene una asociación relevante en la infección crónica por *Candida* en mucosas (Kisand *et al.*, 2010; Wolff *et al.*, 2013).

El reconocimiento de las inmunodeficiencias secundarias causadas por la presencia de auto-Ab's anti-citocinas en individuos y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas ha ido incrementando paulatinamente (Knight *et al.*, 2016; Maddur *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2015). Por lo que la profundización en la investigación de los auto-Ab's anti-citocinas resulta interesante para generar más conocimientos de la enfermedad autoinmune y los mecanismos de tolerancia, lo cual podrá ser utilizado para estudios adicionales específicos que determinen la asociación de los auto-Ab's con la autoinmunidad y la susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

1.7. Bioensayos *in vitro*

El estudio de los auto-Ab's anti-citocina ha generado el desarrollo de análisis *in vitro* que permiten caracterizar el papel funcional que estos tienen sobre la actividad biológica de su citocina blanco. En la literatura existe una serie de reportes que utilizan diferentes ensayos de señalización celular, basados en la determinación de la capacidad neutralizante de los auto-Ab's sobre la función biológica de diferentes mediadores químicos tales como IFN α , IL-6, IL-12, IL-10, etc. (Browne, 2014a; Knight *et al.*, 2016).

En este sentido, en los ensayos de inhibición de la fosforilación de factores de transcripción (como STAT-1 y STAT-3), se ha evaluado la función de los auto-Ab's anti-IFN α utilizando cultivos *in vitro* de PBMC's estimuladas con IFN α que han demostrado que los auto-Ab's anti-IFN α poseen actividad biológica neutralizante, pues son capaces de inhibir la fosforilación del factor de transcripción STAT-1, dicha evaluación se realizó empleando un sistema de citometría de flujo mediante el ensayo de Luminex (Chi *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005).

Otro ensayo para evaluar la función biológica inhibitoria de los auto-Ab's hacia IFN γ , utilizó PBMC's de donadores sanos, las cuales son estimuladas de forma exógena usando LPS con o sin rHu-IFN γ , en presencia de la muestra sérica (positiva o negativa a los auto-Ab's anti-IFN γ), posteriormente se determina la producción de TNF α en los sobrenadantes de los cultivos, en este ensayo la disminución en los niveles de TNF α indica una función inhibitoria por parte de los auto-Ab's anti-IFN γ contenidos en la muestra sérica evaluada (Doffinger *et al.*, 2004).

Considerando que la citocina GM-CSF modera el incremento de la regulación del LPS en la inducción de la producción de IL-6 por las células U937, estas condiciones han permitido evaluar la actividad neutralizante de sueros con altos títulos de auto-Ab's contra GM-CSF, este ensayo resulta crítico dado que la respuesta de las células del sistema inmunitario son dependientes de IL-6 e IL-23, se ha demostrado que el GM-CSF promueve procesos de autoinmunidad por incremento en la vía de señalización de IL-6, por lo que se sugiere un papel importante en el incremento de estas citocinas y la regulación de esta cascada de señalización (Akasaka *et al.*, 2009; Browne, 2014a; Kitamura *et al.*, 1999).

Por otra parte, la citocina IL-12 posee la habilidad de inducir sinérgicamente el incremento en la regulación de la producción de IFN γ , por lo que el uso de PBMC's, en coestimulación con la citocina exógena rHu-IL-18 se ha utilizado para evaluar la actividad neutralizante de sueros con altos niveles auto-Ab's contra IL-12; dicho ensayo se ha realizado empleando la muestra sérica (positiva o negativa a auto-Ab's anti-IL-12) en presencia de la citocina rHu-IL-12, rHu-IL-18 o en combinación (para inducir sinérgicamente el incremento de la producción de IFN γ), y posteriormente determinar la concentración de IFN γ en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Rosenberg *et al.*, 2016).

Con la finalidad de evaluar la función biológica de los auto-Ab's hacia IL-17, se han empleado fibroblastos transformados SV-40, estos son estimulados con la citocina rHu-IL-17 en presencia o ausencia de la muestra sérica positiva a auto-Ab's anti-IL-17, posteriormente se determina la producción de IL-6, dichos ensayos han mostrado que los auto-Ab's contra IL-17 inhiben la producción de IL-6 en comparación con los controles (Puel *et al.*, 2010).

Para analizar la actividad neutralizante de los auto-Ab's anti-IL-6 y anti-IL-10, se han empleado las líneas celulares Hep3B y U937, respectivamente, donde dichas células se estimulan con la citocina deseada (rHu-IL-6 o rHu-IL-10) en presencia o ausencia de la muestra sérica positiva a auto-Ab's, para finalmente evaluar los niveles de fosforilación de STAT-3 (Puel *et al.*, 2008a). Así mismo, uno de los principales mediadores químicos de la inflamación que se produce en respuesta a la IL-6 es la CRP, esta proteína de fase aguda es producida principalmente por hepatocitos y es un contribuyente directo en la patogénesis de diferentes enfermedades en las que participa la respuesta inmune innata (Nanki *et al.*, 2013; Noack and Miossec, 2014).

En humanos, el nivel de CRP en suero es bajo en condiciones normales, pero aumenta hasta 1000 veces durante la inflamación (Das *et al.*, 2003), por lo que en algunos estudios se ha determinado la producción de CRP por la línea celular Hep3B, utilizando una coestimulación con rHu-IL-6 e IL-1 β para detectar cualquier alteración producida por efecto de la actividad neutralizante de los auto-Ab's anti-IL-6 (Davies, 2016) .

1.8. Enfermedades autoinmunes en otras especies

En el área veterinaria, no existen reportes que describan la presencia de auto-Ab's contra citocinas en las enfermedades autoinmunes. Es importante mencionar que el primer modelo animal espontáneo de autoinmunidad fue el ratón negro de Nueva Zelanda, descubierto en 1959. Interesantemente a pesar de que diferentes modelos de autoinmunidad se han desarrollado en roedores, el reconocimiento de las enfermedades autoinmunes en otras especies llevo tiempo después. Siendo las más frecuentes en animales domésticos, el lupus eritematoso sistémico, trombocitopenia, anemia hemolítica autoinmune, miastenia gravis autoinmune, nefritis y diabetes mellitus, siendo patologías bastante comunes en la actualidad (Gershwin, 2017).

Cada vez es más reconocido que los eventos previos a la autoinmunidad clínica pueden ser precedidos por la infección; resaltando los estudios realizados en caninos se especula que algunos agentes infecciosos (*Leishmania*, *Babesia*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* y *Anaplasma*) podrían desencadenar la producción de auto-Ab's y la enfermedad autoinmune, algunos otros factores como la inmunoterapia, uso de corticosteroides y vacunas pueden contribuir en forma importante (Ercolini and Miller, 2009; Garza *et al.*, 2000). Los auto-Ab's están dirigidos hacia diferentes componentes celulares. Sin embargo, no existen evidencias directas que demuestren la presencia de auto-Ab's contra mediadores químicos de la respuesta inmune en animales domésticos, a pesar del aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-8) durante ciertas infecciones (Gershwin, 2017; McVey *et al.*, 1989). Otro caso es la afección denominada laminitis crónica en equinos, esta enfermedad inflamatoria crónica se asocia con alteraciones sistémicas en la respuesta inmune contra diferentes componentes de la membrana basal, así mismo daño tisular generado por las metaloproteinasas de matriz por mencionar algunas causas; observando que animales enfermos producen niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas (McVey *et al.*, 1989; Steelman *et al.*, 2014). En forma general, las enfermedades autoinmunes presentan un amplio campo de estudio en diferentes especies (Gershwin, 2017).

Es importante recalcar lo mencionado anteriormente dado que dentro del área veterinaria no existen reportes de la presencia de auto-Ab's anti-citocinas relacionados con enfermedades infecciosas y/o autoinmunes; sin embargo, el concepto de "una medicina" se ha vuelto popular en años recientes, a causa de la observación de que diversas enfermedades que ocurren en humanos también se presentan en animales domésticos (Yeboa *et al.*, 2017).

1.9. Ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bio-Plex

El ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple de Bio-Plex (Luminex) es un sistema basado en citometría de flujo, que utiliza microesferas de poliestireno con un diámetro de 5.6 micras como soporte sólido y microplacas con filtro de fondo para obtener 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, este código es establecido mediante dos diferentes colorantes fluorescentes que se presentan en proporciones que varían de acuerdo a cada región. Cada conjunto de microesferas se puede acoplar con una molécula específica (analito), las diferentes microesferas acopladas se pueden mezclar en un pozo para ser incubadas con la muestra sérica, para permitir el reconocimiento de los analitos por los anticuerpos específicos. Teóricamente, en la práctica se pueden medir simultáneamente hasta 100 parámetros individuales en una sola etapa del ensayo. Las microesferas se detectan utilizando un flujo de dos láseres del citómetro, un láser excita los colorantes fluorescentes internos que identifican la región de cada microesfera y el segundo láser excita el colorante informador capturado durante el ensayo, obteniéndose de este último un valor numérico de intensidad de fluorescencia (Rosenberg *et al.*, 2016; Stephen, 2006).

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 inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay*). La sensibilidad de este método es comparable a un ELISA convencional pero permite investigaciones complejas, analizando una serie de diferentes análisis en forma simultánea y usando pequeñas alícuotas de reactivos para el ensayo; de

igual forma existe una gran flexibilidad para realizar diferentes variaciones en el análisis serológico (Stephen, 2006).

Para el caso del ensayo Luminex indirecto, cada analito es acoplado covalentemente a microesferas con una región en particular. Posteriormente, se añade la muestra problema (anticuerpo primario) para permitir la unión de los anticuerpos específicos al analito y finalmente se agrega un anticuerpo anti-inmunoglobulina especie específico (anticuerpo secundario), el cual puede estar conjugado con un fluorocromo como estreptavidina-ficoeritrina (PE, ficoeritrina) o con biotina, para este último caso es necesario utilizar la PE-ficoeritrina como molécula indicadora (**Esquema 5, PANEL A**). Después de la incubación se realiza la lectura del sistema empleando el lector 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 indica la detección del anticuerpo capturado. El sistema emite señales fluorescentes simultáneamente para cada microesfera, traduciendo las señales en datos (valores de intensidad de fluorescencia) de cada muestra para todos los parámetros medidos (analitos) (**Esquema 5, PANEL B**) (Stephen, 2006).

1.10. Cromatografía de afinidad por columna

Es de suma importancia seleccionar la metodología apropiada para la purificación de anticuerpos, ya que de ésta depende el rendimiento y la pureza de los mismos, además de los costos del procedimiento. La eficacia de la purificación por afinidad 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 este ligando (Huse *et al.*, 2002).

Debido al reconocimiento específico de los anticuerpos, es común también emplear la purificación con un antígeno inmovilizado como ligando. Este método es ventajoso cuando se pretende obtener un anticuerpo específico a partir de una mezcla de inmunoglobulinas con diferentes especificidades (**Esquema 6**). 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 mediante el uso de un cambio en el pH de la fase móvil, aunque

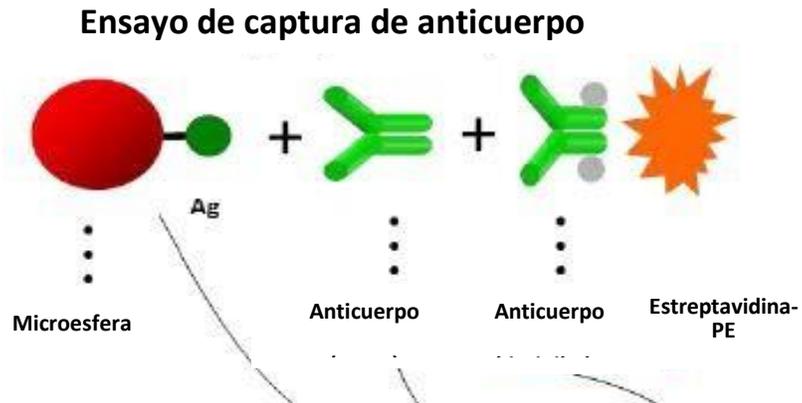
también puede emplearse un agente caotrópico o modificador orgánico. La elución por etapas para obtención de diferentes fracciones se usa frecuentemente durante la purificación de los anticuerpos, donde dichas fracciones se deben de analizar mediante otro método para determinar en cuales de ellas se encuentran los anticuerpos purificados (Huse *et al.*, 2002; Sobansky and Hage, 2012)

La cromatografía de afinidad por columna es una técnica ampliamente usada en el aislamiento y purificación de anticuerpos, la molécula de interés se une a través de sus grupos amino libres a partículas de agarosa activadas con bromuro de cianógeno que escinde enlaces peptídicos en el lado carboxílico de los grupos de metionina (Sweden, 2002). La unión que se genera es altamente específica sobre una matriz inerte y porosa, el procedimiento permite la unión del ligando inmovilizado que posee la fuerza necesaria para evitar eliminar a la proteína evitando que sea inmovilizada para poder ser removida posteriormente. Es importante cuidar que las condiciones de la solución no produzcan daño irreversible a la proteína, puesto que el mecanismo de unión es altamente específico, se deben usar condiciones drásticas como el cambio de pH, fuerza iónica y temperatura (Erkens *et al.*, 2017; Klonisch *et al.*, 1996).

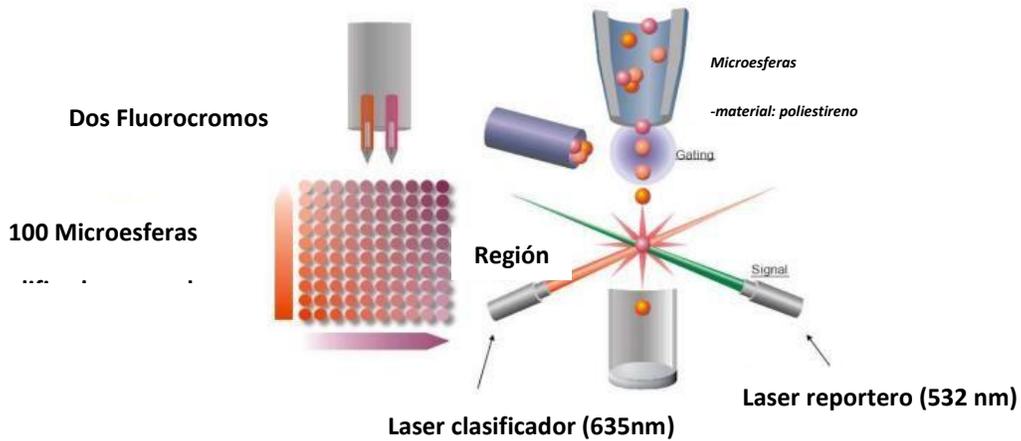
1.11. Afinidad y Avidéz

La afinidad de un autoanticuerpo es la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas resultantes de la unión entre el paratopo de un fragmento Fab y su epítipo, la unión Ag-Ab (antígeno-anticuerpo) obedece las reglas de la química. El anticuerpo se une al antígeno usando toda la gama de interacciones de enlace no covalente los cuales comprenden enlaces de hidrógeno y enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas y Van der Waals con el fin de mantener en estrecha proximidad a las moléculas. Este tipo de enlaces permite que la reacción sea reversible, de modo que puede aplicarse al equilibrio la ley de acción de masas y puede determinarse una constante de equilibrio K , o constante de asociación. Debido a la estructura multivalente de los anticuerpos, se pueden formar múltiples complejos tridimensionales por lo que se generan una gran cantidad de interacciones químicas generando una fuerza de interacción que se denomina avidéz, así por ejemplo, un anticuerpo de clase IgG podría tener la misma afinidad que un anticuerpo de clase IgM pero este último tendrá mayor avidéz por su estructura multivalente (Owen, 2014; Male, 2013).

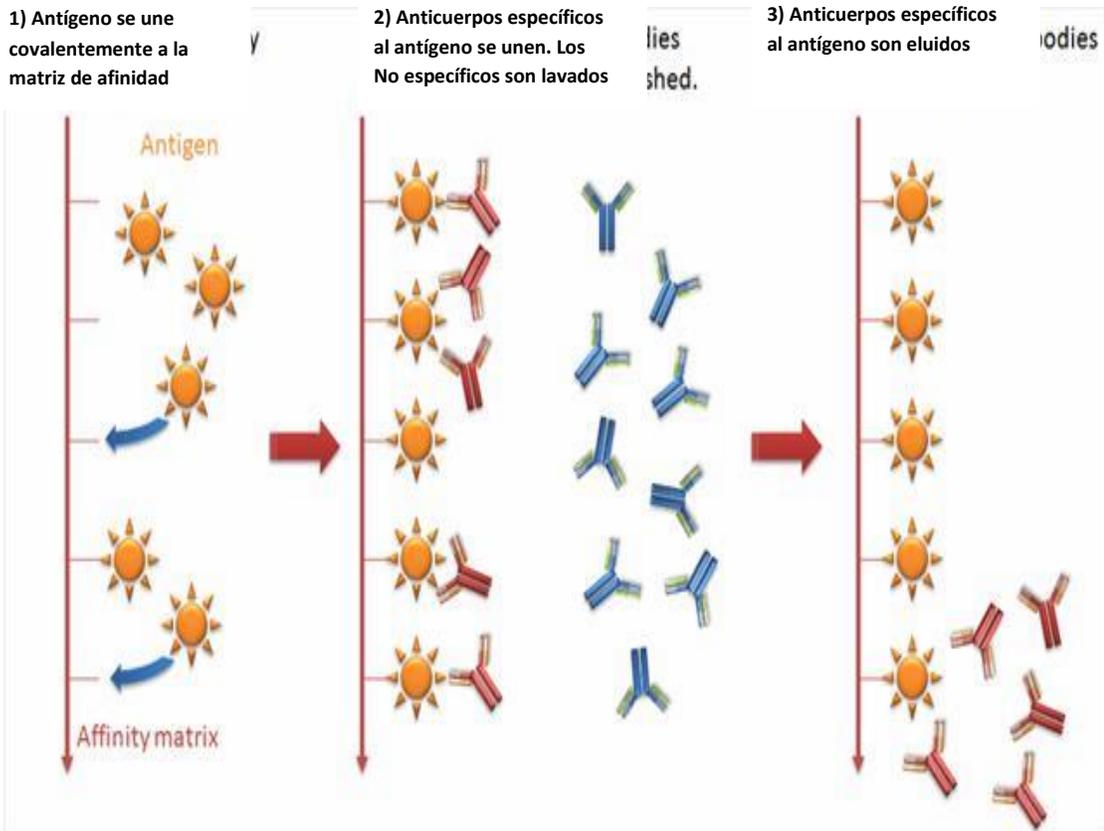
PANEL A)



PANEL B)



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



Esquema 6. Cromatografía por afinidad. La purificación de anticuerpos por afinidad implica 3 pasos principales: 1) Acoplar el antígeno a la matriz. 2) La incubación de una muestra cruda con el soporte de afinidad para permitir que la molécula diana en la muestra se una al ligando inmovilizado y lavar los componentes de muestra no enlazados del soporte. 3) La elución (disociación y recuperación) de la molécula diana del ligando inmovilizado al alterar las condiciones del buffer amortiguador de modo que ya no se produce la interacción de unión (Liu *et al.*, 2012).

1.12. Microarreglos peptídicos

Los microarreglos son matrices bidimensionales de alta densidad donde se ha inmovilizado un material que se utiliza como sonda biológica y que puede ser ácido nucleico, proteína, pequeñas moléculas, etc. Estos poseen las características siguientes: son sustratos planos, en los que moléculas dianas microscópicas son inmovilizadas formando filas y columnas, existiendo además una unión específica entre las moléculas dianas inmovilizadas en el soporte plano y las moléculas en solución (Rosenberg *et al.*, 2016).

Desde su introducción en 1995 se han expandido rápidamente en todas las áreas principales de la investigación biomédica, el éxito del empleo de la tecnología en el campo de la genómica ha dado lugar a su expansión y adaptación al estudio de proteínas, reacciones enzimáticas o inmunológicas. La identificación y mapeo de los epítomos pueden proporcionar una información adicional para el diagnóstico y pronóstico de enfermedad, se han aplicado para la descripción de patrones de reconocimiento de epítomos de las proteínas en diversos grupos de enfermedad. La tecnología de microarreglos de péptidos ofrece la posibilidad de determinar patrones de reconocimiento que pueden tener una aplicación clínica y supone una gran oportunidad de estudio *in vitro* de la respuesta e identificación de epítomos, que pueden ser utilizados para analizar la historia clínica de los pacientes, su enfermedad y las modificaciones en los tratamientos (Thiele, 2009; Zerweck *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se ha logrado evidenciar la importancia de las inmunodeficiencias secundarias causadas por la presencia de altos niveles de auto-Ab's contra algunos mediadores químicos, como son las citocinas, afectando el adecuado desarrollo de las funciones celulares y la eliminación de los patógenos, lo que predispone al hospedador a enfermedades infecciosas causadas por microorganismos oportunistas tales como hongos, bacterias y virus (Browne, 2014a; Puel, 2013).

Las evidencias en humanos que apuntan a la existencia de una correlación entre la presencia de niveles elevados de auto-Ab's contra algunas citocinas y la predisposición a infecciones causadas por diversos microorganismos (Barcenas-Morales *et al.*, 2016; Browne and Holland, 2010; Doffinger *et al.*, 2004; Dubin and Kolls, 2008; Hoflich *et al.*, 2004; Kampmann *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2005; Puel, 2013; Puel *et al.*, 2008b); así como, los hallazgos preliminares obtenidos por el grupo de trabajo, donde se detectó la presencia de auto-Ab's anti-citocinas en caninos y equinos (Cortes 2016, 2019); todos estos reportes indican que es importante extender los estudios en estas especies.

Por lo tanto, la detección de auto-Ab's contra citocinas con un mayor número de muestras séricas de caninos y equinos, y la determinación de si estos auto-Ab's tienen un efecto sobre la función biológica de sus moléculas diana, es una contribución al conocimiento de las enfermedades autoinmunes en el área veterinaria donde hasta la fecha no hay reportes al respecto.

Así mismo, es importante dar continuidad a los estudios de detección de auto-Ab's contra citocinas en muestras séricas humanas, a fin de esclarecer la participación de los mismos en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas. En la mayoría de los casos donde se reporta la existencia de los auto-Ab's anti-citocinas, los estímulos que provocan la producción de los mismos permanecen desconocidos y la razón por la cual los estos auto-Ab's pueden o no causar patología no está del todo clara. Sin embargo, la opinión predominante es que, cuando estos tienen suficiente afinidad y están presentes por encima de un cierto umbral de concentración, pueden neutralizar la actividad biológica de la citocina,

simplemente uniéndose y evitando su interacción con el receptor celular afín, afectando de esta forma la función sobre las células del sistema inmunitario (Pohl *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el empleo de sistemas de citocinas humanas recombinantes acopladas a microesferas para la detección de auto-Ab's en sueros de otras especies se realizó *de novo*, considerando que las citocinas caninas y equinas son moléculas proteicas con una disponibilidad comercial limitada (Levin *et al.*, 2014); pero se encuentran altamente conservadas en estas diferentes especies, por lo que se elaboró un análisis *in silico* comparativo donde se demostró que las citocinas caninas y equinas eran suficientemente homologas (porcentaje de homología, valores de similitud y divergencia) a sus contrapartes humanas con la finalidad de permitir un reconocimiento por reactividad cruzada policlonal objetiva.

Por otra parte, la estandarización de los bioensayos *in vitro* para el análisis y la determinación de la capacidad neutralizante de auto-Ab's contra citocinas, detectados inicialmente en muestras séricas de pacientes humanos, es importante para evaluar la función biológica de estos mediadores químicos pueden provocar la pérdida del efecto al tratamiento y probablemente alteraciones de la función inmune, predisponiendo al hospedero a una susceptibilidad a diversos agentes infecciosos. Así mismo, la implementación de estos estudios permitirá extender los ensayos funcionales en otras especies.

3. HIPÓTESIS

Las muestras séricas caninas, equinas y humanas provenientes de individuos con diferentes grupos de enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas presentaran niveles considerables de auto-Ab's contra citocinas, los cuales podrán tener una capacidad inhibitoria sobre la actividad biológica de dichos mediadores químicos esenciales para el desarrollo de la respuesta inmunitaria.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la presencia de auto-Ab's contra citocinas en muestras séricas de caninos, equinos y humanos con diversas enfermedades infecciosas, autoinmunes o ambas para evaluar la actividad neutralizante de los auto-Ab's anti-citocinas relevantes por especie sobre la función biológica *in vitro* de estos mediadores químicos del sistema inmune.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Analizar muestras séricas de caninos, equinos y humanos para la detección y determinación de los niveles de auto-Ab's contra mediadores químicos, empleando los sistemas de citocinas humanas recombinantes acopladas a micropartículas, mediante el ensayo de arreglo de microesferas en suspensión múltiple (Luminex).

4.2.2. Purificar los auto-Ab's contra las citocinas, detectados en muestras séricas humanas, mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna.

4.2.3. Evaluar la función neutralizante de algunos auto-Ab's anti-citocinas sobre la actividad biológica *in vitro* de la citocina blanco, analizando el efecto de estos auto-Ab's sobre la inhibición de la fosforilación de factores de transcripción (STAT-1 y STAT-3) y de la producción de CRP regulados por citocinas, empleando PBMC's o líneas celulares.

4.2.4. Identificar los posibles epítomos reconocidos por auto-Ab's contra IFN γ e IL-6 mediante microarreglos de péptidos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Ubicación

El presente proyecto se desarrolló en el Laboratorio 2 de Inmunología ubicado en el edificio de Posgrado Campus 1, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México y en el Laboratorio de Inmunología y Bioquímica en el Hospital Addenbrooke's de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.

5.2. Muestras séricas

Las muestras séricas correspondientes a caninos y equinos analizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el banco de sueros del Laboratorio interno en el Hospital de Pequeñas Especies y en el Hospital de Equinos de la FES Cuautitlán, así como en el banco de sueros del Laboratorio de Virología Genética y Biología molecular, de la FES Cuautitlán Campo 4, UNAM. La colección de sueros humanos empleada en este estudio fue donada por el Dr. R. Döffinger (Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.). Todos los sueros se distribuyeron en alícuotas y se conservaron a -20C. Para todas las muestras donadas, se obtuvo un formato de consentimiento informado previamente autorizado.

5.3. Población de estudio de caninos y equinos

Se obtuvieron las muestras de suero de pacientes (>1 año hasta 9 años) e individuos control sanos (>1 año hasta 8 años) con el consentimiento informado del propietario. El estudio fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado de Animales Experimentales del Programa de Posgrado de Producción y Sanidad Animal (UNAM, México) clave CI_0946 y se llevó a cabo de conformidad con la Ley (Procedimientos Científicos) para Animales y sus correspondientes directrices de Guía de Institutos Nacionales de la Salud. Para los sujetos controles negativos se consideraron individuos clínicamente sanos según el historial clínico, el examen físico, el hemograma y panel de bioquímica sanguínea; mientras que para los pacientes se recopilaban los expedientes completos integrados en base a los perfiles de análisis clínicos. De ambos grupos se obtuvieron los registros de datos sobre edad, sexo,

acceso diario al exterior, origen, historial de vacunación, perfiles bioquímicos clínicos, pruebas serológicas y paneles hematológicos completos.

5.4. Población de estudio de humanos

El grupo de pacientes humanos fue seleccionado de forma aleatoria a partir de una base de datos aleatoria que incluía registros completos del expediente clínico, de forma similar a las otras dos especies, mientras que en el grupo de individuos clínicamente sanos que se incluyeron como controles negativos, se seleccionaron individuos con ausencia de enfermedad congénita y otros padecimientos. En ambos casos el grupo etario tuvo un rango desde 2 hasta 69 años.

5.5. Categorías de enfermedades

Se analizaron aproximadamente 501 muestras séricas en total, incluyendo pacientes e individuos clínicamente sanos (controles negativos), donde dependiendo de la especie, la población de pacientes se dividió en diferentes grupos de enfermedades principales según sus trastornos. Particularmente, 100 muestras séricas correspondieron a caninos y 100 a equinos, de las cuales para cada especie 50 muestras fueron de pacientes y 50 de controles negativos (**Cuadro 1** y **Cuadro 2**). Mientras que de las 301 muestras séricas humanas totales, 251 correspondieron a pacientes y 50 a individuos clínicamente sanos (**Cuadro 3**).

Enfermedad	Número de muestras
Autoinmunidad /Autoinflamación (AID/AUI)	32
Enfermedades Infecciosas (ID)	17
Cáncer (Ca)	2
Subtotal	51
Controles negativos	
Individuos clínicamente sanos (HC)	50
Total de muestras analizadas	101

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

Enfermedad	Número de muestras
Autoinmunidad y autoinflamación (AID/AUI)	20
Enfermedades Infecciosas (ID)	30
Subtotal	50
Controles negativos	
Individuos clínicamente sanos (HC)	50
Total de muestras analizadas	100

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

Enfermedad	Número de muestras
Autoinmunidad (AID)	133
Enfermedades Infecciosas (AUI)	126
Autoinmunidad e infecciones (AID/ID)	10
Otras Enfermedades (OD)	32
Subtotal	251
Controles negativos	
Individuos clínicamente sanos (HC)	50
Total de muestras analizadas	301

Cuadro 3. Número de muestras séricas humanas colectadas y analizadas, ordenadas por grupo de pacientes especificando su padecimiento y de controles negativos.

5.6. Citocinas y microesferas

Considerando que la disponibilidad comercial de citocinas de diferentes especies a la humana, así como de los reactivos relacionados es limitada, se emplearon citocinas humanas recombinantes, por lo que fue necesario demostrar que las citocinas caninas y equinas son suficientemente homólogas (porcentaje de homología, matriz de similitud y divergencia) con las de la especie humana, para lograr un reconocimiento cruzado policlonal sustantivo e informativo. El análisis de homología y la matriz de identidad se realizó utilizando la base de datos GenBank NCBI® y Protein Data Bank PDB®, el Programa Bioedit® y MEGA 6®, que permitió analizar, reconocer y comparar las secuencias de péptidos de citocinas de las diferentes especies. Por otra parte, las citocinas utilizadas para el acoplamiento se obtuvieron de la compañía R&D Systems®, mientras que las microesferas a las que se acoplaron dichos analitos se adquirieron de la marca Bio-Rad®.

5.7. Obtención de los sistemas de citocinas acopladas a microesferas

Algunos de los diferentes sistemas citocina-microesfera empleados fueron donados por el Departamento de Bioquímica (Dr. Doffinger), mientras que otros sistemas (IFN γ , IL-6, IL-10, BSA) fueron elaborados en el laboratorio de trabajo; en conjunto todos los sistemas utilizados en el presente estudio fueron validados a partir de resultados del grupo de trabajo (Cortes, 2016, 2019).

5.8. Amino acoplamiento de proteínas (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 μ m, vía grupos carboxilos en la superficie de estas microesferas. Esto se realizó mediante reacciones vía carbodiimida que incluyen los grupos amino de las proteínas primarias y los grupos carboxilos funcionales unidos en la superficie de microesferas de poliestireno. La unión covalente es permanente, sin dejar proteínas sin acoplar después del lavado, aún después de meses de almacenamiento (Rosenberg *et al.*, 2016), los 45 sistemas analizados se muestran en el **Cuadro 4**.

Brevemente, las citocinas humanas recombinantes ($\text{IFN}\gamma$, IL-6, IL-10, entre otras) y albumina de suero bovino (BSA, No. Cat. 5217-100G, R&D Systems, Minneapolis, Minn.) se enlistan en la **Tabla 1** del **Apéndice 1**, las cuales se acoplaron covalentemente a las microesferas carboxiladas (Bio-Plex, Bio-Rad® Laboratories, Hercules, California) como se describió anteriormente (Rosenberg *et al.*, 2016). En resumen, para el procedimiento de acoplamiento, las microesferas se activaron con Hidrocloruro de 1-etil-3- [3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC; Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Mass. Cat. Núm. E6383) en presencia de N-hidroxisuccinimida (NHS; Thermo Fisher® Cat. Núm. 606682-6), de acuerdo con las instrucciones del fabricante para formar intermediarios reactivos con amina.

Las microesferas activadas posteriormente se incubaron con la citocina rHu de interés (20 ug/mL) durante 3 horas a 37 °C en un rotador en la oscuridad, una vez acopladas se lavaron y contaron hasta ajustar a una concentración de 2×10^6 microesferas/mL para almacenarse en buffer de bloqueo (SFB al 1%, Sigma-Aldrich® Cat. Nu. 997RA) en solución salina bufferada con fosfato (PBS; Gibco®, Cat. Nu. 10010023) y 0.05% de azida sódica NaN_3 (Sigma-Aldrich®, Cat. Nu.26628-22-8), antes de utilizar las microesferas, se aseguró el acoplamiento exitoso de las citocinas rHu a su conjunto de microesferas respectivas que se verificaron con sus respectivos anticuerpos monoclonales (mAb) específicos (R&D Systems®, Minneapolis, Minnesota). Se elaboró el sistema BSA-microesfera como control negativo.

No.	Analito Recombinante acoplado	Región de la microesfera	No.	Analito Recombinante acoplado	Región de la microesfera
1	IFN γ	26	24	IL-28A	45
2	TNF α	18	25	IL-28B	46
3	IL-12	53	26	Blank Bead	66
4	IFN α	10	27	G-CSF	76
5	IL-6	28	28	IL-8	78
6	IL1b	33	29	IL-27	40
7	IL-18	80	30	IL-21	50
8	GM-CSF	79	31	IL-3	13
9	IL17A	21	32	IL-4	15
10	IL-10	56	33	IL-5	17
11	BSA	4	34	IL-7	19
12	IL-17F	05	35	IL-9	23
13	IFN β	6	36	IL-11	29
14	IL-22	08	37	IL-13	34
15	IL-23	49	38	IL-16	39
16	IFN ω	35	39	IL-19	41
17	IFN λ	22	40	IL-20	48
18	IL-2	52	41	IL-31	55
19	LPS	89	42	IL-33	57
20	IL-15	47	43	IL-1 α	12
21	IL-25	31	44	APRIL	58
22	TGFb1	3	45	TRANCE	86
23	Linfotoxina- α	61			

Cuadro 4. Sistemas establecidos citocina-microesfera 45plex, empleados en la técnica microesferas en suspensión múltiple de Luminex y las regiones correspondientes a cada analito y/o citocina utilizado en el ensayo para la evaluación de las muestras séricas.

5.9. Detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en muestras séricas caninas, equinas y humanas mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple (Luminex)

La detección de auto-Ab's en las muestras séricas se realizó en microplacas con filtro de 96 pozos (Multiscreen HTS Millipore®, UK, Cat. MSBVN1210), siguiendo la metodología para la evaluación de los sistemas citocinas-microesferas. Brevemente, se sirvieron 50 uL de las muestras problema (diluidas 1/200) a cada pozo conteniendo los sistemas citocinas-microesferas, se incubaron durante media hora a 37 °C y protegidas de la luz empleando un agitador orbital (Thermomixer comfort, Eppendorf, Cat. 22331), simultáneamente se incluyeron los controles positivos disponibles (anticuerpos anti-citocina biotinilados, R&D® Systems). El líquido de los pozos se extrajo utilizando un sistema de vacío (Millipore® Cat. MSVMHTS00) y se realizaron tres lavados con PBS-Tween. Se agregaron 50 uL de los anticuerpos secundarios especie específicos conjugados con PE (Anti-Human IgG-Fc Specific-R-PE, Leinco Technologies® I-127; Goat anti-dog IgG-PE, sc-373, Santa Cruz Biotechnology®; Goat anti-horse IgG-PE, sc-3735, Santa Cruz Biotechnology®) y se incubaron durante una hora en las condiciones anteriores. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados de la microplaca. Finalmente se agregaron 150 uL de PBS-Tween por pozo, se agitó la placa por tres minutos y se procedió a hacer la lectura en el analizador Bio-Plex utilizando el software Bio-Plex manager V 3.0 (Bio-Rad®).

5.10. Técnica de cromatografía de afinidad por columna

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

1. Columnas de centrifugación con resina de acoplamiento amino enlace: cada columna contiene 400 uL de una suspensión al 4 % de perlas de agarosa con 25 % de un compuesto acuoso.
2. Solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2 (Coupling Buffer): Solución salina amortiguadora de fosfatos, un 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.

3. Solución amortiguadora de enfriamiento (Quenching Buffer): 50 mL, 1 M Tris-HCl, 0.05% de azida de sodio (NaN₃), pH 7.4.
4. Solución de Cianoborohidruro de sodio al 5 M (NaCNBH₃, mw 62.84): 0.5 mL, disuelto en NaOH 0.01 M.
5. Solución de lavado (Wash Solution): 25 mL, 1 M NaCl, 0.05 % NaN₃.
6. Solución amortiguadora de Elución (Elution Buffer): 50 mL, pH 2.8, contiene aminos primarios.
7. Tubos de colección para microcentrífuga: Viales con una capacidad de 0.5 mL.
8. 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 NaN₃.

5.10.1. Preparación del material

Solución amortiguadora de acoplamiento pH 7.2 en sobre: Este componente contiene solución salina amortiguadora de fosfatos con fosfato de sodio [0.1M], Cloruro de sodio [0.15M], 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 se filtró la solución empleando una membrana con un tamaño de poro de 0.22 μ m o se añadió azida de sodio a una concentración final de 0.02% y se almacenó a 4 °C.

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

5.10.2. Procedimiento para el acoplamiento de la proteína

A) Preparación de la columna e inmovilización de la proteína

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

la resina permaneciera húmeda todo el tiempo se realizaron los pasos de centrifugación a 3500 rpm en una centrifuga 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 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 2000 rpm por 30 segundos, para remover la solución amortiguadora de almacenamiento.

3. Se removió la tapa superior y se insertó el tapón, la resina se resuspendió adicionando 400 uL de la solución amortiguadora de acoplamiento utilizado para disolver la muestra. Después se removió el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó a 2000 rpm 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 adicionó 400 uL de la muestra (0.5 mg/mL) directamente en la resina, se reemplazó la tapa y se mezcló.

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

5. Se destapó la columna en una campana de extracción y se añadió 5 uL de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se volvió a colocar la tapa y se mezcló.

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

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

7. Posteriormente, se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó 2000 rpm por 1 minuto (para coleccionar el fluido con la proteína no unida). Para determinar la eficacia del acoplamiento, se evaluó el fluido pasante con un ensayo de proteínas y se comparó con la concentración o la cantidad inicial (Vial: B).

8. Se removió la tapa de la columna y se insertó el tapón. Se adicionaron 500 uL de la solución amortiguadora de acoplamiento, se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió el tapón, después se aflojó la tapa, y se colocó la columna en un tubo de colección y se

centrifugó. Se repitió este paso dos veces más. Se guardó el fluido pasante para evaluar la eficiencia de acoplamiento (Vial: C y D).

Nota: Cuando la reacción se incubó toda la noche, se invirtió cuidadosamente la columna diez veces para desalojar cualquier resina restante en la tapa. Se aflojó la tapa de la columna y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó a 2000 rpm, guardando el fluido pasante para evaluar la eficacia del acoplamiento. Se repitió este paso dos veces más.

B) Bloqueo de los sitios activos de unión remanentes

1. Se destapó la columna y se insertó el tapón. Posteriormente se adicionaron 500 uL de solución amortiguadora de enfriamiento a la resina pH 7.4, se reemplazó la tapa y se mezcló.
2. Se retiró la tapa de la columna y el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.
3. Se repitieron los pasos 1-2. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 500 uL de solución amortiguadora de enfriamiento directamente a la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló.
4. En una campana de extracción se quitó la tapa de la columna y se adicionaron 10 uL de la solución cianoborohidruro de sodio a la reacción acuosa. Se tapó la columna y se mezcló. Se incubó la reacción a 37 °C durante 60 minutos, mezclando cada 15 minutos.
5. Se quitó el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.

Nota: Como la columna se utilizó en forma inmediata fue necesario equilibrarla adicionando 500 uL de solución amortiguadora de acoplamiento y se centrifugó a 2000 rpm por 1 minuto, se realizó esto dos veces. Y se continuó con el paso 2 del procedimiento general para la purificación por afinidad (punto 5.10.3).

5.10.3. Procedimiento general para la purificación por afinidad

A) Formación del complejo anticuerpo-antígeno unido a la resina

1. La columna con la resina conteniendo la citocina se equilibró a 37 °C.
2. Se removió primero la tapa de la columna y después el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido que paso.

3. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 500 uL de la muestra sérica diluida volumen:volumen 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 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).
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 volumen: volumen, y se le adicionó Tween-20 a una concentración final de 0.05%. Se quitó la tapa de la columna, se insertó el tapón y se adicionaron 300 uL de la solución. Se reemplazó la tapa y cuidadosamente se invirtió la columna diez 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 uL de solución amortiguadora de acoplamiento, se reemplazó la tapa y gentilmente se invirtió el tubo (columna) 10 veces. Se aflojó la tapa y se removió el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido obtenido en el vial, se repitió esta paso una vez más (Viales: I y J).
8. Se destapó la columna y se colocó el tapón, se adicionaron 300 uL de la solución amortiguadora de acoplamiento, en incrementos de 100 uL, en la superficie interior de la columna para lavar y bajar la resina, fue muy importante no mezclar la resina. Se removió el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, centrifugar y coleccionar el fluido pasante (Vial: K).

B) Elución de los autoanticuerpos anti-citocina

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

2. Se destapó la columna y se colocó el tapón. Se colocó la columna en un tubo de colección y se centrifugó (Vial: E-1). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 15 uL de Tris 1M, pH 9.0 (5 uL para 100 uL de volumen de elución).
3. Se repitieron los pasos 1 y 2 seis veces o según sea necesario (mínimo 3 veces) (Viales: E-2, E-3, E-4, E-5 E-6 y E-7).
4. Para asegurar la elución completa del anticuerpo de la columna se realizó un cambio de pH de la solución amortiguadora de elución, ajustando 5 mL de esta solución amortiguadora a un pH 2.0 (empleando una solución 1 M de HCl), y un aumento en el volumen empleado, como se indica en los pasos posteriores.
5. Se colocó el tapón a la columna y se adicionaron 300 uL de la solución amortiguadora de elución a lo largo de los lados de la columna sobre la resina. Se reemplazó la tapa y se mezcló. Se incubó la columna durante 5 minutos a 37 °C.
6. Se destapó la columna y se colocó el tapón. La columna se colocó en un tubo de colección y se centrifugó (Vial: E-5). Se neutralizó el pH bajo de la fracción eluida añadiendo 18 uL de Tris 1M, pH 9.0 (para 300 uL de volumen de elución).
7. Se repitieron los pasos 5 y 6 según fue necesario (Viales: E-9, E-10, E-11 y E-12).
8. Se regeneró la resina tan pronto como fue posible después de la elución mediante el lavado una vez con 300 uL de solución de acoplamiento conteniendo azida de sodio al 0.02%. Se almacenó la columna a 4 °C.
9. Finalmente, a cada fracción de eluido (12 fracciones) se le agregaron 30 uL de una solución de BSA al 4.5% y se conservaron en refrigeración hasta el análisis.

5.10.4. Lavado y almacenamiento de la columna de afinidad

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

1. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 500 uL de la solución de lavado. Se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió la tapa y el tapón, se colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más.
2. Se tapó la parte inferior de la columna y se adicionaron 400 uL de solución de acoplamiento, se reemplazó la tapa y se mezcló. Se removió la tapa y el tapón inferior, se

colocó la columna en un tubo de colección, se centrifugó y se descartó el fluido pasante. Se repitió este paso dos veces más.

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

5.11. Determinación de los niveles de autoanticuerpos contra citocinas en las muestras séricas y en algunas preparaciones de autoanticuerpos purificados mediante el ensayo de arreglo de micropartículas en suspensión múltiple Luminex

Las muestras séricas de caninos, equinos y humanos, que resultaron positivas (a la presencia de auto-Ab's) y con valores promedio de intensidad de fluorescencia (MFI, del inglés *Mean of fluorescence intensity*) considerables (≥ 15000) se analizaron utilizando el ensayo de arreglo de citocinas-microesferas en suspensión múltiple (Luminex), empleando cinco diluciones quíntuples iniciando con la de 1/50. De la misma forma se evaluaron algunas de las preparaciones de los auto-Ab's purificados de muestras séricas humanas.

5.12. Bioensayos *in vitro* para la determinación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-citocinas (IFN γ , IL-6 y IL-10) sobre la inhibición de la actividad biológica de la citocina blanco

Para analizar la actividad neutralizante de los auto-Ab's anti-citocinas se emplearon células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) y líneas celulares, las cuales se estimularon de forma exógena con la citocina humana recombinante rHu (IFN γ , IL-6 ó IL-10) pre-incubadas o no con las muestras séricas (positivas o negativas a la presencia de auto-Ab's), de la misma forma se realizó con algunas de las preparaciones de auto-Ab's purificados, incluyéndose las condiciones de estimulación con un mitógeno o con el medio de cultivo.

Después de 12-24 h de incubación (a 37 °C, 5%CO₂ y 100% humedad) se compararon los niveles de los efectos de las citocinas inhibidas por la presencia o ausencia de los auto-Ab's anti-citocinas, con el objetivo de detectar cualquier alteración producida debido a la función neutralizante de los auto-Ab's específicos sobre el IFN γ e inhibiendo su actividad biológica de fosforilación sobre el factor de transcripción STAT-1 (Patel *et al.*, 2005). De igual forma se

evaluó la inhibición por los auto-Abs de la fosforilación de STAT-3 regulada por IL-6 o IL-10 (Puel *et al.*, 2008a). Estos ensayos se describen detalladamente en los puntos 5.12.2, 5.12.3. y 5.12.4.

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

PBMC's: La obtención de estas células 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 (RPMI 1640-C, Ver Apéndice 2, Soluciones), 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%.

Células U937: Se empleó la línea celular promonocítica U-937 comercializada por la American Type Culture Collection ATCC: U937-DC-Sign ATCC® CRL-3253™, (Sundstrom and Nilsson, 1976). Las células se propagaron en medio DMEM-Suplementado (DMEM-S, Ver Apéndice 2, Soluciones) y los cultivos se mantuvieron a 37 °C y atmósfera al 5% de CO₂. La viabilidad de estas células y el conteo celular se determinó por medio del método de exclusión del colorante azul de tripán al 0.4%.

Células Hep3B: Las células Hep3B fueron donadas por el Dr. Matthew Hoare (CRI, Cambridge, UK), provenientes del American Type Culture Collection (ATCC-HB 8064), Rockville, MD®. La suspensión de células Hep3B se preparó a una concentración de 1.6×10^5 , la cual se obtuvo empleando el medio de cultivo DMEM-S y para la colección 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). 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%.

5.12.2. Evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IFN γ sobre la inhibición de la fosforilación de STAT-1 mediada por IFN γ , empleando la técnica de Luminex

Los niveles de fosforilación de STAT-1 se determinaron mediante el uso del kit Bio-Plex Pro *Cell Signaling Assays* (Bio-Rad, Núm. Cat. 10024929) empleando PBMC's purificadas con un gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque), la citocina interferón gamma humano recombinante (rHu-IFN γ IMMUKIN, 2X10⁶ IU 0.1mg, Lote 107661D Boehringer Ingelheim®) con el suero y auto-Ab purificado positivo o negativo a la presencia de auto-Ab's (2h a 37 °C /agitación), cada condición se realizó por duplicado y dicho análisis se desarrolló como se específica en las instrucciones del fabricante y mediante el Lector Luminex™. La metodología aplicada se describirá brevemente a continuación.

5.12.2.1. Pre-incubación del rHu-IFN γ (IMMUKIN®) con las muestras para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT-1 mediada por IFN γ en PBMC's

Las PBMC's fueron preparadas y ajustadas a 7.6X10⁶ cels/mL en medio RPMI 1640-C (Ver **Apéndice 2**, Soluciones). El rHu-IFN γ utilizado fue Immukin que contiene una concentración de 100 ug/0.5 mL. De la citocina de interés se emplearon dos diferentes soluciones a las concentraciones de 2 ug/mL y 10 ug/mL, y en diferentes viales se agregaron 25 ul de cada solución en forma independiente para posteriormente adicionarles 25 ul de la muestra por evaluar. Las muestras analizadas consistieron en suero (positivo o negativo a la presencia de auto-Ab's contra IFN γ), la preparación de los auto-Ab's purificados (diluidos 1/10 en PBS/SFB 2%) o el medio RPMI 1640-C (control negativo) diluido 1/10 en PBS/SFB 2%; así mismo, se incluyó como otro control negativo cada una de las condiciones anteriores sin el estímulo (rHu-IFN γ), volumen que fue sustituido por RPMI 1640-C/SFB 10%. Finalmente todos los viales se incubaron 1 h a 37 °C con agitación (450 rpm en un agitador Thermomixer Confort®), para lograr una activación completa de la fosforilación de STAT-1 los viales con las suspensiones celulares pre-incubadas en las condiciones anteriores se continuaron con una incubación de 30 min a 37 °C.

5.12.2.2. Lisis celular

1. Se obtuvo el botón celular de los viales anteriores centrifugándolos a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró con una micropipeta.
2. Las células se lavaron con 100 uL de buffer de lavado frío, centrifugando a las condiciones anteriores y descartando los sobrenadantes.
3. Para la preparación del coctel inhibidor de proteasas a 10X se reconstituyó el liofilizado (Bio-Rad®. Cat. 171-304006) en 10 mL de buffer de lisis, posteriormente se preparó 1 mL del coctel 1X empleando 100 uL del coctel 10X más 900 uL de agua destilada y finalmente se adicionaron 400 uL de Fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF, Cat. No. PM7626, Sigma Aldrich®). Para uso futuro el coctel de inhibidor de proteasas 10X se conservó en alícuotas a -70 °C.
4. A las células (1.1×10^6 cel/vial) se les adicionó 100 uL del buffer de lisis 1X conteniendo el inhibidor de proteasas recién preparado (1 mL por 1×10^7 células), subsecuentemente, se agitó suavemente el lisado celular durante 10-15 min a 4 °C, incubándose en hielo en un agitador orbital (Roto-Shake Genie, Scientific Industries®) en velocidad 6 y modo rock.
5. Se pre-humedecieron los pozos de una microplaca con filtro (BD® Cat. NM.3426) empleando 50 uL del buffer de lavado, removiendo el líquido por filtración al vacío y secando la parte inferior de la placa con una toalla absorbente para eliminar el exceso de líquido.
6. Posteriormente se transfirieron los lisados celulares de cada vial a la microplaca para continuar con el ensayo de señalización celular (punto 5.12.2.6.) una vez que se consideraron las condiciones descritas en los puntos 5.12.2.3., 5.12.2.4., 5.12.2.5. y 5.12.2.6.

5.12.2.3. Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de trabajo de proteína sugerida para el análisis de señalización fue de 3-200 ug/mL (0.15-10 µg/pozo). Se ajustó la concentración de proteínas a 200 ug/mL empleando el kit Bio-Rad® DC Protein Assay Cat. No. 500#0112, usando el buffer de lisis que contenía el inhibidor de proteasas y el Factor QG (Cat. No.2071, Bio-Rad®).

5.12.2.4. Preparación de las microesferas con el anticuerpo de captura específico para STAT-1 fosforilado, del anticuerpo biotinilado y de la estreptavidina ficoeritrina (SAPE)

1. Las microesferas de captura Bio-Rad® son suministradas como una solución stock 20X y deben protegerse de la luz. Estas microesferas acopladas al anticuerpo de captura (20X) se

agitaron en el vórtex durante 1 minuto y fueron diluidas a 1X combinando 125 uL de éstas con 2275 uL del buffer de resuspensión de microesferas (volumen necesario para 96 pozos, empleando 25 uL/pozo), posteriormente se agitaron en el vórtex por 15 segundos.

2. El anticuerpo de detección biotinilado (10X) se agitó en el vórtex por 10 segundos, este último fue diluido a 1X combinando 240 uL del anticuerpo 10X más 2160 uL del buffer de resuspensión de microesferas (volumen suficiente para los 96 pozos de la placa, añadiendo 25 uL/pozo).

3. Para preparar la solución de SAPE a 1X se diluyeron 100 uL de la SAPE (25X) en 2400 uL de buffer de resuspensión de microesferas.

5.12.2.5. Lisados celulares HeLa tratadas con IFN- α

El lisado de células HeLa (171-YZB021) es suministrado en el kit como un stock preparado a partir de células no estimuladas y tratadas con fosfatasa (este lisado es independiente a la línea celular específica utilizada en los diferentes ensayos) y se usa como control negativo para la mayoría de fosfo-proteínas de interés, adicionalmente se proporciona un control positivo (YZ-0004) para proteínas totales, mientras que para fosfo-proteínas específicas se incluye el Phospho STAT-1 (Tyr701) (control positivo). Todos estos controles se prepararon acorde a las instrucciones del proveedor, los diferentes lisados de células HeLa liofilizados [50ug] (Y-171-YZB021, YZ-0004 y Tyr701) se reconstituyeron en 250 uL de agua ultrapura cada uno, donde la concentración de proteína quedó ajustada finalmente a 200 ug/mL, se agitaron suavemente en el vórtex y se dejaron a 37 °C durante 20 minutos para continuar con el ensayo; posterior a su uso, se hicieron alícuotas de 40 uL cada una y se almacenaron a -70 °C .

5.12.2.6. Ensayo de señalización celular para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT-1 mediada por IFN γ

1. El lisado celular preparado previamente junto con las muestras y los controles internos del ensayo fueron centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos. El rango de concentración de trabajo de proteína utilizado fue de 200 ug/mL de proteína total por pozo y se empleó el buffer de lisis para ajustar el volumen deseado. La metodología se describe brevemente a continuación:

2. La microplaca del kit fue pre-humedecida con 200 uL/pozo del buffer de lavado, removiendo el líquido por filtración al vacío, y secando la parte inferior de la placa con una toalla absorbente para eliminar el exceso de líquido.
3. Se agitó en el vórtex la suspensión de microesferas (1X) por 10 segundos y se agregaron 50 uL a cada pozo.
4. Posteriormente, se agregaron de forma independiente 50 uL/pozo de cada lisado celular correspondiente a cada una de las muestras, incluyéndose los controles (negativos y positivos), el blanco del ensayo (buffer de resuspensión de microesferas) y las muestras problemas a evaluar (sueros y auto-Ab's purificados respectivos). La microplaca se incubó por 18 horas a 37 °C, todas las incubaciones fueron hechas a 550 rpm en un agitador para placa protegiéndola de la luz.
5. Se removió el contenido de los pozos y se agregaron 200 uL/pozo del buffer de lavado y se agitó la placa por un minuto a 550 rpm en un agitador orbital. El buffer fue removido y se secó la parte inferior de la placa, este paso se repitió para un total de 3 lavados.
6. Se adicionaron 25 uL/pozo del anticuerpo de detección 1X (para su preparación se agregaron 240 uL del anticuerpo 10X más 2160 uL de diluyente de anticuerpo de detección).
8. La placa se incubó 30 minutos a 450 rpm, protegida de la luz.
9. El anticuerpo de detección fue removido por filtración al vacío y delicadamente se secó el fondo de la placa sobre una toalla de papel.
10. Se realizó una serie de 3 lavados como en el paso 6.
11. Se agregaron 50 uL de la SA-PE Bio-Rad® diluida 1X (para su preparación se emplearon 100 uL de SA-PE 100X más 2400 uL de diluyente).
12. Se incubó la placa en el agitador orbital durante 10 minutos a 37 °C y protegida de la luz.
13. Se removió el líquido y se realizó una serie de 3 lavados como en el paso 6.
14. Las microesferas fueron resuspendidas en 125 uL de buffer de resuspensión de microesferas y la placa se agitó por 30 segundos (450 rpm).
15. Finalmente, se realizó la lectura de la placa en el lector Luminex 100™, las especificaciones para la programación del Luminex fueron las siguientes: número de eventos, 50 por microesfera; Region 76 de microesfera STAT-1, tamaño de la muestra, 100 µL; gate settings, 5000 – 25000; *reporter gain, default (Low PMT)* y *time out*, 60 segundos.

5.12.3. Evaluación de la función neutralizante de autoanticuerpos anti-IL-6 sobre la inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6, empleando la técnica de Luminex

Para analizar la actividad neutralizante de los auto-Ab's anti-IL-6 se empleó la línea celular Hep3B, las condiciones de estimulación, muestras y metodología fueron similares a los empleados en el ensayo de STAT-1 (punto 5.12.2), sin embargo para la activación de las células se empleó rHu-IL-6 (Sigma Aldrich®, Cat. No. H7416-10 ug). Los niveles de fosforilación de STAT-3 se determinaron empleando el kit Bio-Plex Pro *Cell Signaling Assays* (Bio-Rad®, Núm. Cat.171304006M), siguiendo las instrucciones del proveedor. A partir de las indicaciones descritas en la metodología previa (punto 5.12.2.6.), se realizaron los ensayos de señalización de STAT-3 y las condiciones de pre-incubación descritas en el punto 5.12.2.1., sin embargo, se realizaron algunas modificaciones que se detallaran a continuación.

5.12.3.1. Pre-incubación de la rHu-IL-6 con las muestras para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6 en células Hep3B

Las células Hep3B fueron preparadas y ajustadas a 10×10^6 cel/mL en medio DMEM-S (Ver **Apéndice 2**, Soluciones). La citocina utilizada fue rHu-IL-6 (H7416-10ug, Lote No. MKBV1733V, Sigma-Aldrich®) que contiene una concentración de 10 ug/mL. De la citocina de interés se emplearon dos diferentes concentraciones, las cuales fueron de 10 ug/mL y 10 ng/mL, por consiguiente, para su preparación se inició con un primer paso (Solución 1) donde se agregó 15 uL de rHu-IL-6 (10 ug/mL Stock) más 285 uL de diluyente (DMEM-S), posteriormente se llevó a cabo un segundo paso para la preparación de una solución a una concentración final de 10 ng/mL (Solución 2), donde se adicionaron 100 uL de la Solución 1 más 900 uL de DMEM-S. Subsecuentemente, en diferentes viales se agregaron 70 uL de la Solución 2 en forma independiente para posteriormente adicionarles 40 uL de la muestra por evaluar. Las muestras analizadas consistieron en suero (positivo o negativo a la presencia de auto-Ab's contra IL-6), la preparación de los auto-Ab's purificados (diluidos 1/10 en PBS/SFB 2%) o el medio DMEM-S (control negativo) diluido 1/10 en PBS/SFB 2%; así mismo, se

incluyó como otro control negativo cada una de las condiciones anteriores sin el estímulo (rHu-IL-6), volumen que fue sustituido por DMEM-S/SFB 2%. El control positivo del sistema se preparó a una concentración de 10 ng/mL de rHu-IL-6 con el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 a una concentración de 2 ug/mL, finalmente todos los viales se incubaron 1 h a 37 °C con agitación (450 rpm en un agitador Thermomixer Confort®), para lograr una activación completa de la fosforilación de STAT-3, los viales con las suspensiones celulares pre-incubadas en las condiciones anteriores se continuaron con una incubación de 30 min a 37°C.

5.12.3.2. Lisis celular

1. Se obtuvo el botón celular de los viales anteriores centrifugándolos a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró con una micropipeta.
2. Las células se lavaron con 100 uL de buffer de lavado frío, centrifugando a las condiciones anteriores y descartando los sobrenadantes.
3. Para la preparación del coctel inhibidor de proteasas a 10X (Bio-Rad®. Cat. No. 171-304006), se consideraron las condiciones previamente descritas en el punto 5.12.2.2.
4. A las células, se les adicionó 100 uL del buffer de lisis con el inhibidor de proteasas recién preparado, subsecuentemente, se agitó suavemente el lisado celular durante 10-15 min a 4 °C, incubándose en hielo en un agitador orbital (Roto-Shake Genie, Scientific Industries®) en velocidad 6 y modo rock.]
5. Se pre-humedecieron los pozos de una microplaca con filtro empleando 50 uL del buffer de lavado, removiendo el líquido por filtración al vacío, y secando la parte inferior de la placa con una toalla absorbente para eliminar el exceso de líquido.
6. Posteriormente se transfirieron los lisados celulares de cada vial a la microplaca para continuar con el ensayo de señalización celular previamente descrito (punto 5.12.2.6.), considerando que previamente se realizó el ajuste de la concentración de proteínas y la preparación de los reactivos requeridos, como se especifica en los siguientes puntos.

5.12.3.3. Determinación de la concentración de proteínas totales

La concentración de trabajo de proteína sugerida para el análisis de señalización fue de 3-200 ug/mL (0.15-10 ug/pozo). Se ajustó la concentración de proteínas a 200 ug/mL

empleando el kit Bio-Rad® DC Protein Assay Cat. No. 500#0112, usando el buffer de lisis que contenía el inhibidor de proteasas (Factor QG Cat. No.2071, Bio-Rad®).

5.12.3.4. Preparación de las microesferas con el anticuerpo de captura específico para STAT-3 fosforilado, del anticuerpo biotinilado y de la estreptavidina ficoeritrina (SAPE)

1. Las microesferas de captura Bio-Rad® son suministradas como una solución stock 20X y deben protegerse de la luz. Estas microesferas acopladas al anticuerpo de captura (20X) se agitaron en el vórtex durante 1 minuto y fueron diluidas con el buffer de resuspensión de microesferas, posteriormente se agitaron en el vórtex por 15 segundos.
2. El anticuerpo de detección biotinilado se agitó en el vórtex por 10 segundos, este último fue diluido a 1X (1/10) combinando 240 uL de este anticuerpo más 2160 uL del buffer de resuspensión de microesferas.
3. Se preparó la solución de SAPE a 1X (1/25), diluyendo 100 uL de la SAPE (25X) en 2400 uL de buffer de resuspensión de microesferas.
4. Posteriormente se continuó con la preparación de los diferentes controles internos del kit comercial descritos previamente en el punto 5.12.2.5. para continuar con el ensayo de señalización celular.

5.12.3.5. Ensayo de señalización celular para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6

1. El lisado celular preparado previamente junto con las muestras fue centrifugado a 4000 rpm durante 15 minutos. La concentración de trabajo de proteína utilizada fue de 200 ug/mL de proteína total por pozo, por lo tanto, empleando el buffer de lisis se ajustó el volumen deseado. La metodología se describe brevemente a continuación:
2. La microplaca del kit fue pre-humedecida con 200 uL/pozo del buffer de lavado, removiendo el líquido por filtración al vacío, y secando la parte inferior de la placa con una toalla absorbente para eliminar el exceso de líquido.
3. Se agitó en el vórtex la suspensión de microesferas (1X) por 10 segundos y se agregaron 50 uL a cada pozo.
4. Posteriormente, se agregaron de forma independiente 50 uL/pozo de cada lisado celular correspondiente a cada una de las muestras, incluyéndose los controles (negativo y positivo),

el blanco del ensayo (buffer de resuspensión de microesferas) y las muestras problema a evaluar (sueros y auto-Ab's purificados respectivos). La microplaca se incubó por 18 horas a 37 °C (todas las incubaciones fueron hechas a 550 rpm en un agitador para placa protegiéndola de la luz).

5. Se removió el contenido de los pozos por filtración al vacío.

6. Se agregaron 200 uL/pozo del buffer de lavado y se agitó la placa por un minuto a 550 rpm en un agitador orbital. El buffer fue removido y este paso se repitió para un total de 3 lavados.

7. Se adicionaron 25 uL/pozo del anticuerpo de detección 1X y la placa se incubó 30 minutos a 450 rpm, protegida de la luz.

8. El anticuerpo de detección fue removido y se secó el fondo de la placa sobre una toalla de papel.

9. Se realizó una serie de 3 lavados como en el paso 6.

10. Se agregaron 50 uL de la SA-PE Bio-Rad® 1X y se incubó la placa en el agitador orbital durante 10 minutos a 37 °C y protegida de la luz.

11. Se removió el líquido y se realizó una serie de 3 lavados como en el paso 6.

12. Las microesferas fueron resuspendidas en 125 uL de buffer de resuspensión y la placa se agitó por 30 segundos (450 rpm).

13. Finalmente, la placa fue leída en el Luminex 100™, las especificaciones para la programación del Luminex 100™ fueron las siguientes: número de eventos, 50 por microesfera; Región 89 de microesfera STAT-3, tamaño de la muestra, 100 uL; gate settings, 5000 – 25000; *reporter gain, default (Low PMT)* y *time out*, 60 segundos.

5.12.4. Evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-10 sobre la inhibición de la fosforilación de STAT-3 regulada por IL-10 empleando la técnica de Luminex

Los niveles de fosforilación de STAT-3 se determinaron mediante el uso del kit Bio-Plex Pro *Cell Signaling Assays* (Bio-Rad, Núm. Cat. 10024929) empleando las células U937 y la citocina rHu-IL-10 (Cat. No. 11340105-10ug, Lote No. 352376, ImmunoTools®). Para analizar la actividad neutralizante de los auto-Ab's contra IL-10 se emplearon diferentes sueros humanos positivos a la presencia de auto-Ab's anti-IL-10 y sus respectivos auto-Ab's purificados, simultáneamente se incluyeron diferentes muestras séricas negativas a la

presencia de estos auto-Ab's como controles negativos, así mismo, se consideró el control negativo y positivo del kit comercial (controles internos del ensayo), cada condición se realizó por duplicado y dicho análisis se desarrolló como se especifica en las instrucciones del fabricante y mediante el Lector Luminex. La metodología aplicada se describirá brevemente a continuación.

5.12.4.1. Pre-incubación de la rHu-IL-10 con las muestras para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10 en células U937

Las células U937 fueron preparadas y ajustadas a 20×10^6 cel/mL en medio DMEM-S (Ver **Apéndice 2**, Soluciones). A partir de la solución stock (10 ug/mL) de rHu-IL-10 se tomaron 5 uL de la misma más 995 uL del medio DMEM-S, obteniendo así una concentración final de 50 ng/mL. Para determinar la concentración óptima de trabajo de rHu-IL-10 dentro del ensayo, se evaluaron diferentes concentraciones de la misma (50 ng/mL, 25 ng/mL y 10 ng/mL), y en diferentes viales se agregaron 70 uL de cada solución de forma independiente para posteriormente adicionarles 40 uL de la muestra por evaluar. Las muestras analizadas consistieron en suero (positivo o negativo a la presencia de auto-Ab's contra IL-10), la preparación de los auto-Ab's purificados (diluidos 1/10 en PBS/SFB 5%) o el medio DMEM-S (control negativo) diluido 1/10 en PBS/SFB 5%; así mismo, se incluyó como otro control negativo cada una de las condiciones anteriores sin el estímulo (rHu-IL-10) volumen que fue sustituido por DMEM-S/SFB 5%, el control positivo del sistema se preparó a una concentración de 10 ng/mL de rHu-IL-10 con el mAb anti-IL-10 a una concentración de 1 ug/mL (Rat anti-hu-IL-10, Cat. No. 554704, BD®). Finalmente todos los viales se incubaron 1 h a 37 °C con agitación (450 rpm en un agitador Thermomixer Confort®), para lograr una activación completa de la fosforilación de STAT-3 los viales con las suspensiones celulares pre-incubadas en las condiciones anteriores se continuaron con una incubación de 30 min a 37 °C.

5.12.4.2. Lisis celular

1. Se obtuvo el botón celular de los viales anteriores centrifugándolos a 2000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró con una micropipeta.

2. Las células se lavaron con 100 uL de buffer de lavado frío, centrifugando a las condiciones anteriores y descartando los sobrenadantes.
3. A las células se les adicionó 100 uL del buffer de lisis con el inhibidor de proteasas, subsecuentemente, se agitó el lisado celular durante 10-15 min a 4 °C en hielo empleando un agitador orbital en velocidad 6 y modo rock.
4. Se pre-humedecieron los pozos de una microplaca con 50uL de buffer de lavado, removiendo el líquido por filtración al vacío, y secando la parte inferior de la placa con una toalla absorbente para remover el exceso de líquido.
5. Posteriormente se transfirieron los lisados celulares de cada vial a la microplaca para continuar con el ensayo de señalización celular previamente descrito (punto 5.12.2.6.), considerando que previamente se realizó el ajuste de la concentración de proteínas y la preparación de los reactivos requeridos, como se especificó en los puntos 5.12.

5.12.4.3. Ensayo de señalización celular para evaluar la inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-10

De forma similar a la metodología descrita en el punto 5.12.3.5., se continuó con el ensayo de señalización para los auto-Ab's contra IL-10 como se describe brevemente a continuación. Los lisados celulares fueron centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos. Se ajustó la concentración de trabajo de proteína a 200 ug/mL de proteína total por pozo, la microplaca del kit fue pre-humedecida con 200 uL/pozo del buffer de lavado, removiendo el líquido por filtración al vacío, y secando la parte inferior de la placa, se agregaron 50 uL a cada pozo de la suspensión de microesferas. Posteriormente, se agregaron de forma independiente 50 uL/pozo de cada lisado celular correspondiente a cada una de las muestras a evaluar y la microplaca se incubó por 18 horas a 37 °C (550 rpm en un agitador en oscuridad). Se removió el contenido de los pozos por filtración al vacío y se agregaron 200 uL/pozo del buffer de lavado, agitando la placa por un minuto a 550 rpm, para después eliminar el buffer y secar la parte inferior de la placa (3X). Después, se adicionaron 25 uL/pozo del anticuerpo de detección y la placa se incubó 30 minutos a 450 rpm, transcurrido este tiempo, el anticuerpo de detección fue removido y se secó el fondo de la placa, para continuar con la serie de 3 lavados por filtración al vacío. Se agregaron 50 uL de la SAPE y se incubó la placa durante 10 minutos a 37 °C, se removió el líquido y se secó, se realizó una serie de 3 lavados. Se agregaron 125 uL/pozo de buffer de resuspensión en la microplaca y

se agitó por 30 segundos (450 rpm). Finalmente, la placa fue leída en el Luminex 100™ acorde a las especificaciones mencionadas en el punto 5.12.3.5., para la programación del Luminex en el ensayo de señalización de STAT-3.

5.12.5. Evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6 sobre la inhibición de la producción de CRP mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex

Los niveles de producción de Proteína C Reactiva se determinaron mediante el uso del kit Básico cardíaco humano Kit B (R&D Systems®, Cat. No. LUCB000), dicho ensayo fue llevado a cabo mediante la inducción con rHu-IL-6 (Cat. No. 4716-10ug, Lote No. MKBT2809V, Sigma-Aldrich®) e IL-1β (Cat. No. 11340015-25ug, Lote No. 352219, ImmunoTools®) para la producción de proteína C reactiva. Con la finalidad de analizar la actividad neutralizante de los auto-Ab's anti-IL-6 se emplearon diferentes sueros humanos positivos a la presencia de auto-Ab's contra IL-6 y sus respectivos auto-Ab's purificados, simultáneamente se incluyeron diferentes muestras séricas negativas a la presencia de estos auto-Ab's como controles negativos, así mismo, se incluyeron el control negativo y positivo del kit comercial (controles internos del ensayo) y cada condición se realizó por duplicado. Dicho análisis se desarrolló como se especifica en las instrucciones del fabricante y mediante el Lector Luminex™. La metodología aplicada se describirá brevemente a continuación.

5.12.5.1. Pre-incubación de la rHu-IL-6 en co-estimulación con IL-1β en presencia de las muestras para determinar la inhibición de la producción de Proteína C Reactiva en las células Hep3B

La línea celular Hep3B se expandió y ajusto a 1.6×10^7 cel/mL con medio DMEM-S (Ver **Apéndice 2**, Soluciones), en una microplaca se agregó 1 mL de dichas células a cada pozo (microplaca de 24 pozos, BD®) y se adhirieron durante la noche a 37 °C, 5% CO₂, 10% de humedad relativa. Al día siguiente, las células se colectaron para la preparación de una suspensión ajustada a 1.3×10^7 cel/mL Simultáneamente se realizó la preparación de los diferentes estímulos y condiciones a evaluar, para la preparación de rHu-IL-6 se inició con un primer paso donde se agregó 5 uL de rHu-IL-6 (10 ug/mL Stock) más 1995 uL del medio DMEM-S, obteniendo así una concentración final de 25 ng/mL; mientras que para la rHu-IL1b, se inició con la preparación de la Solución 1 a una concentración de 0.25 ug/mL, para

esto se agregó 10 uL de rHu-IL-1b (25 ug/mL Stock) más 990 uL del medio DMEM-S, posteriormente se llevó a cabo la preparación de la Solución 2 a una concentración final de 0.25 ng/mL, donde se utilizaron 20 uL de la Solución 1 más 1980 uL de DMEM-S. Por otra parte se determinó la concentración óptima de trabajo para el anticuerpo anti-IL-6 comercial (Cat. No. MAB206-100, Lote No. HD4514071, R&D Systems®) que se incluyó como control positivo dentro del ensayo, para esto se evaluaron diferentes concentraciones del mismo (2 ug/mL, 1 ug/mL, 0.5 ug/mL, 0.1 ug/mL y 0.05 ug/mL). Subsecuentemente, en diferentes viales se agregaron 6 uL de cada solución de forma independiente para posteriormente adicionarles 18 uL de la muestra por evaluar. Las muestras analizadas consistieron en suero (positivo o negativo a la presencia de auto-Ab's contra IL-6), la preparación de los auto-Ab's purificados (diluidos 1/100 en diluyente de calibración RD6-56) o el medio DMEM-S (control negativo); así mismo, se incluyó como otro control negativo cada una de las condiciones anteriores en ausencia de la estimulación, co-estimulación o ambas (rHu-IL-6 + rHu-IL1 β) volumen que fue sustituido por DMEM-S. Con respecto al control positivo del sistema éste se preparó a partir de rHu-IL-6 (25 ng/mL) más el anticuerpo comercial anti-IL-6 a una concentración de 1 ug/mL.

Todas las muestras fueron pre-incubadas durante 30 min con rHu-IL-6 (5 ng/mL), rHu-IL-1 β (0.5 ng/mL) o la combinación de ambas, en cada una de las condiciones mencionadas anteriormente. Finalmente, se adicionaron de forma independiente 15 uL de los diferentes estímulos a cada pozo de la microplaca con células, las cuales fueron incubadas a 37°C, 5% CO₂, 10% de humedad por 24h, finalmente los sobrenadantes fueron colectados para la determinación de la producción de CRP.

5.12.5.2. Preparación del coctel estándar para CRP, coctel de detección de microesferas, anticuerpo biotinilado y estreptavidina ficoeritrina

1. El coctel estándar de CRP se reconstituyó en 500 uL de diluyente de calibración RD6-56 incluido en el kit comercial, dicha mezcla se dejó reposando durante 10 minutos para posteriormente agitar suavemente durante 1 minuto en un vórtex.
2. La curva de calibración requerida para el ensayo se elaboró a partir de este stock, para su preparación se consideraron 7 tubos de trabajo con 200 uL del diluyente de calibración cada uno, posteriormente se tomaron 500 uL del stock y se transfirieron al primer tubo estándar 1,

después se tomaron 100 uL del tubo estándar 1 y se transfirieron al tubo estándar 2, subsecuentemente este paso se repitió cinco veces más hasta llegar al tubo estándar 7, mezclando vigorosamente entre cada solución de transferencia.

3. Para el coctel de detección de microesferas, se centrifugó el vial de microesferas concentrado durante 1 minuto a 4500 rpm, mezclando suavemente para resuspender las micropartículas, evitando invertir el tubo.

4. El frasco de microesferas concentrado (Stock) se diluyo (1/100) agregando en un vial independiente 50 uL del stock en 4950 uL de diluyente.

5. Para la preparación del anticuerpo anti-CRP biotinilado se centrifugó el vial durante 1 minuto a 4500 rpm y posteriormente se tomaron 50 uL del anticuerpo biotinilado en 4950 uL de diluyente (1/100) de anticuerpo y se mezcló suavemente.

6. Para la preparación de la SAPE, se centrifugó el vial de la misma durante 1 minuto a 4500 rpm y se colocó en un vial 55 uL de la SAPE adicionando 5445 uL (1/100) del buffer de lavado.

5.12.5.3. Determinación de los niveles de producción de Proteína C Reactiva para evaluar la capacidad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6

Todos los sobrenadantes obtenidos previamente fueron centrifugados a 4500 rpm durante 10 minutos, subsecuentemente fueron incluidos para el procedimiento realizado a continuación:

1. La microplaca del kit fue pre-humedecida con 150 uL/pozo del buffer de lavado, removiendo el líquido por filtración al vacío y secando la parte inferior de la placa con una toalla absorbente.

2. Se agitaron en el vórtex los sobrenadantes y el coctel estándar durante 10 segundos, se agregaron 50 uL por pozo de las microesferas y después se adicionaron de forma independiente 50 uL/pozo de cada una de las diferentes muestras de sobrenadantes, incluyéndose los controles (negativo y positivo), el coctel estándar y el blanco del ensayo (buffer de lavado). La microplaca se incubó por 3 horas a 37 °C (todas las incubaciones fueron hechas a 800 rpm en un agitador para placa protegiéndola de la luz).

3. Se removió el contenido de los pozos por filtración y se agregaron 200 uL/pozo del buffer de lavado y se agitó la placa por un minuto a 450 rpm en un agitador orbital, el buffer fue

removido y se secó la parte inferior de la placa, este paso se repitió para un total de 3 lavados.

4. Se adicionaron 50 uL/pozo del anticuerpo de detección anti-CRP biotinilado y la placa se incubó 1 hora a 37 °C en un agitador a 800 rpm, protegida de la luz.

5. Se realizó una serie de 3 lavados como en el paso 3.

6. Se agregó 50 uL de la SAPE y se incubó la placa en el agitador orbital durante 30 minutos, 800 rpm a 37 °C.

7. Se removió el líquido por filtración al vacío y se secó, se realizó una serie de 3 lavados como en el paso 5.

8. Las microesferas fueron resuspendidas en 100 uL de buffer de lavado y la placa se agitó por 2 minutos (800 rpm).

9. Finalmente, la placa fue leída en el lector de Luminex 100™, las especificaciones para la programación del Luminex 100™ fueron las siguientes: número de eventos, 50 por microesfera; Región 33 de microesfera CRP, tamaño de la muestra, 100 uL; gate settings, 8000 – 23,000; *reporter gain, default (Low PMT)* y *time out*, 60 segundos

10. Para evaluar la capacidad neutralizante de los auto-Ab's contra IL-6 de inhibir la producción de CRP por células Hep3B, se determinaron los niveles de esta proteína en los sobrenadantes celulares empleando el kit comercial. Los niveles de producción de CRP se analizaron a partir de los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos por la técnica de Luminex. Se compararon los valores MFI correspondiente a los sobrenadantes obtenidos de cada una de las condiciones trabajadas, para determinar si los auto-Ab's presentes en las muestras séricas o preparaciones purificadas de éstos tuvieron la capacidad inhibitoria sobre la citocina blanco (IL-6), abrogando o no la producción de CRP por la línea celular.

Nota: El análisis de inhibición también se puede realizar comparando las concentraciones de CRP determinadas en los diferentes sobrenadantes.

5.13. Identificación de epítomos mediante microarreglos de péptidos

Se emplearon microarreglos de péptidos para muestras positivas a auto-Ab's anti-IFN γ e IL-6, donde ambas secuencias humanas se tradujeron en péptidos de 13 aminoácidos (aa) con un solapamiento de péptido-péptido de 12 aa. Los microarreglos resultantes cubrieron 168 péptidos diferentes, todos los péptidos se imprimieron por duplicado. La incubación

subsiguiente de las matrices de péptidos con muestras de suero humano a diversas diluciones fue seguida por tinción con el conjugado secundario (Fab 2') cabra anti-IgG humano (H + L, DyLight680, KPL®); y la lectura emitida fue reportada en base a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia del punto, la anotación del péptido se realizó con el analizador PepSlide®, este método innovador llamado “*síntesis combinatoria de arreglos de péptidos sobre microchips*” cubre la secuencia de aminoácidos de las citocinas a analizar. Dicho servicio se solicitó a la compañía alemana “Pep PerPrint”, la eficiencia y lo práctico de este método radica en la cantidad tan baja de muestra sérica y de péptidos necesarias para el análisis (Maeji *et al.* 1990). El análisis *in silico* utilizó los programas de alineamiento Bioedit® y MEGA 6.0 esto con el objetivo de localizar la secuencia de aa de los epítomos identificados dentro en la secuencia del IFN γ e IL-6, lo que determinó su correlación con las secuencias de aa de ambas citocinas y su comparación con otras especies, adicionalmente se elaboró una matriz de identidad. Así mismo, para el modelaje molecular e interacción se empleó la base de datos Swiss-MODEL® (<https://swissmodel.expasy.org/>) para la búsqueda de la secuencia peptídica con Protein Data Bank (PDB®), se utilizó el programa PyMOL®.

5.14. Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, las gráficas y el análisis estadístico se realizaron empleando el programa informático GraphPad® Prism software, version 7.0 para Windows.

Para realizar un análisis más detallado de los patrones de respuesta de los auto-Ab's anti-citocinas detectados en los pacientes y compararlos con los individuos clínicamente sanos (controles negativos), se emplearon los valores MFI resultantes a partir de los diferentes ensayos donde se utilizó la técnica de Luminex, estos datos fueron analizados aplicando un análisis de varianza no paramétrico (ANDEVA), con la prueba no pareada *Mann-Whitney U*.

Basado en los MFI \pm 4 desviaciones estándar (SD) obtenidos de los controles negativos, se estableció un valor de corte de MFI < 7000 para muestras negativas, mientras que las muestras positivas fueron aquellas cuyo valor MFI fue \geq 7000.

El análisis de la presencia de auto-Ab's anti-citocina en muestras séricas se realizó mediante una agrupación jerárquica entre las citocinas evaluadas y las muestras analizadas empleando el programa MEV 4_9_0 (*Multiple Experiment Viewer program MeV 4_9_0*®), versión para Windows 7 (Saeed *et al.*, 2003), a partir de los valores MFI obtenidos se generó una media de correlación de Pearson y una agrupación de enlaces promedio, estableciendo un nivel de significancia estadística con valor $p \leq 0.005$, lo anterior permitió definir si la respuesta de auto-Ab's anti-citocina y el grupo de enfermedad asociada en estos individuos presentaba un patrón particular entre los cuatro principales grupos de enfermedad.

Adicionalmente, con la finalidad de visualizar las distancias de fusión entre los grupos de pacientes en comparación con el grupo de controles negativos, se obtuvo un dendrograma de grupo diseñado con el programa R commander i386 version 3.5.1 utilizando el método de Ward y una distancia Euclideana (Fox and Bouchet-Valat, 2016).

Un análisis de componentes principales (PCA) fue diseñado empleando el programa XLSTAT software, versión Adinsoft 2018 (Adinsoft, 2010), para poder explorar la relación y asociación entre el amplio repertorio de auto-Ab's anti-citocina detectados en los pacientes de los diferentes grupos de enfermedad y saber si existía una asociación entre la respuesta de los pacientes comparados con los controles sanos. Adicionalmente se determinó el coeficiente de correlación de Pearson, este valor de correlación " r " value puede ser interpretado desde una fuerte correlación (0.8-1) hasta una muy baja correlación (0-0.2).

6. RESULTADOS

6.1. Homología entre citocinas caninas, equinas y humanas

La disponibilidad de citocinas comerciales de caninos y equinos es limitada, donde en ciertos casos ellas no son ofrecidas como reactivos. Por lo anterior, se utilizaron en los ensayos las citocinas recombinantes humanas para el análisis de las muestras séricas caninas y equinas. Un análisis *in silico* realizado en el presente trabajo confirmó una alta homología en la mayoría de las citocinas caninas y equinas con sus respectivas contrapartes humanas, por lo que que las citocinas humanas permitirían analizar las respuestas de auto-Ab's anti-citocinas. La mayoría de las citocinas seleccionadas exhibió homologías mayores a 90% (14 de 20, promedio de homología = 96%) entre las tres diferentes especies analizadas como se muestra en la **Tabla 1** y **2**, del **Apéndice 1**. A partir de una disponibilidad de 45 diferentes analitos (sistemas citocina-microesfera), se encontraron disponibles las secuencias completas de aminoácidos y/o péptidos de 30 citocinas obtenidos a partir de la base de datos GenBank® y de proteínas PDB®. Se seleccionaron 16 citocinas blanco con al menos un 75% de homología (promedio de homología = 93%), y además 4 citocinas blanco con menor homología tales como IL-12 (64%), IL-8 (41%), IFN α (19.3%) e IFN ω (9.7%), estas últimas se han descrito previamente como citocinas blanco en reportes humanos de individuos con patrones establecidos de auto-Ab's anti-citocinas (Rosenberg *et al.*, 2016). Se utilizó el sistema de BSA (albumina sérica bovina) acoplada a las microesferas, como control negativo y como evaluación de fondo (control interno negativo del ensayo).

6.2. Evaluación del acoplamiento proteico, la integridad antigénica y la especificidad de cada sistema citocina-microesfera empleando anticuerpos específicos

El acoplamiento de los diferentes sistemas citocina-microesfera fue realizado previamente en el laboratorio de trabajo, donde fueron evaluados utilizando los anticuerpos biotinilados específicos para cada citocina empleada en los sistemas producidos (Cortes, 2016, 2019). Cada sistema se analizó por triplicado y se obtuvieron los promedios y la desviación estándar de cada uno de ellos. La evaluación realizada por el grupo de trabajo empleó los diferentes sistemas en forma individual (mono) y múltiple (multiplex), reportando que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las lecturas de ambas formas, empleando la *t* student como prueba de hipótesis, $p < 0.05$ [Datos no mostrados] (Cortes, 2019).

6.3. Agrupación y número de muestras séricas para la detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en las diferentes especies (canino, equino y humano)

De acuerdo al tipo de enfermedad que presentaban los pacientes, se elaboró una clasificación grupal específica de las muestras séricas para cada especie. Se analizaron un total de 101 muestras séricas caninas, las cuales estaban representadas por cuatro grupos de enfermedad, aquellas que correspondieron a enfermedades autoinmunes (**AID**, del inglés *Autoimmune disease*, $n = 26$), enfermedades autoinflamatorias (**AUI**, del inglés *Autoinflammatory disease*, $n = 6$) enfermedades infecciosas (**ID**, del inglés *Infectious disease*, $n = 17$) y Cáncer (**Ca**, del inglés *Cancer*, $n = 2$) e individuos clínicamente sanos (**HC**, del inglés *Healthy controls*, $n = 50$, controles negativos) (**Tabla 3**, Ver **Apéndice 1**). Mientras que para los equinos, fue un total de 50 pacientes, donde 20 de ellos pertenecían a individuos con enfermedad autoinmune/autoinflamatoria (**AID/AUI**) y 30 al grupo de enfermedades infecciosas (**ID**), 50 equinos clínicamente sanos (**HC**) se incluyeron en el grupo de estudio (**Tabla 4**, Ver **Apéndice 1**). Finalmente, 301 muestras séricas humanas fueron analizadas considerando las agrupaciones siguientes: 133 a pacientes con enfermedades autoinmunes (**AID**), 126 a pacientes con enfermedades infecciosas (**ID**), 10 a pacientes con enfermedades infecciosas y autoinmunes (**AID/ID**) y 32 pacientes cursaron con otras enfermedades (**OD**, del inglés *Other disease*), todos ellos se compararon con sueros de individuos clínicamente sanos (**HC**, $n = 50$), la edad y sexo de los individuos fue heterogénea (**Tabla 5**, Ver **Apéndice 1**).

6.4. Determinación de la dilución óptima de trabajo para el análisis serológico de autoanticuerpos anti-citocinas mediante el ensayo multiplex

Para la detección de la presencia de auto-Ab's en muestras séricas de las diferentes especies se realizó el ensayo Multiplex empleando 45 diferentes sistemas citocina-microesfera, utilizando una dilución de 1/200 de las muestras séricas analizadas. La dilución seleccionada se obtuvo a partir de un tamizaje previo empleando 20 muestras séricas de cada especie (canino, equino y humano), considerando muestras de pacientes (n = 10) y controles negativos (n = 10), utilizando cinco diluciones seriadas comenzando con la de 1/50, evaluando cada muestra por triplicado. La dilución óptima de trabajo de los sueros se estableció considerando el valor MFI considerable y la diferencia entre los valores MFI del control positivo y del control negativo en forma marcada. Una vez obtenidos y analizados los resultados, se decidió emplear la dilución (1/200) como referencia establecida para las 3 diferentes especies (**Figura 6.1.**, Ver **Apéndice 1**).

6.5. Detección de la presencia de autoanticuerpos contra citocinas en las muestras séricas de diferentes especies

En forma general, para todos los resultados mostrados se emplearon los valores MFI considerando la evaluación de las diferentes muestras en todas las condiciones por duplicado. Los valores MFI de individuos clínicamente sanos de las tres especies se utilizaron para definir el valor de corte específico para todos los auto-Ab anti-citocinas, por lo tanto, el cálculo del valor de corte se hizo en función del $MFI \pm 4 SD$, estableciéndose un valor de corte arbitrario generalizado de $MFI < 7000$, permitiendo definir como muestras negativas a todas aquellas que presentaron éstos valores MFI; mientras que todas aquellas muestras séricas que obtuvieron valores $MFI \geq 7000$ 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 ($MFI < 7000$) para todos ellos.

6.5.1. Análisis serológico en muestras caninas

De acuerdo al tipo de padecimiento que presentaban los pacientes caninos de donde se obtuvieron las muestras séricas, se realizó la clasificación de los principales grupos de enfermedades, aquellos que padecían **AID**, **AUI**, **ID** y **Ca**. Se incluyeron caninos clínicamente sanos de diferentes razas sin enfermedad congénita como controles negativos. Como se mencionó anteriormente las características clínicas de los diferentes grupos de enfermedad en caninos se especifican en la **Tabla 3** del **Apéndice 1**.

Los resultados del análisis de la presencia de auto-Ab's anti-citocinas en sueros de pacientes caninos se muestran en las **Tablas 6, 7, 8 y 9** (Ver **Apéndice 1**), en donde los pacientes señalados en color rojo corresponden a animales positivos con altos niveles de auto-Ab's (≥ 15000) contra más de una citocina, mientras que la **Tabla 10** (Ver **Apéndice 1**) corresponde a los individuos clínicamente sanos.

El análisis de las muestras séricas de pacientes caninos, reveló que 46 de 51 perros (90%) fueron positivos a auto-Ab's IgG contra al menos una citocina dado que mostraron valores MFI considerables (≥ 7000), dichos auto-Ab's contenidos en los sueros fueron dirigidos contra al menos 23 diferentes citocinas ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, $\text{IFN}\lambda$, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-6, IL-21, $\text{IFN}\beta$, IL-20, IL-33, $\text{LT}\alpha$, IL-28, IL-19, IL-4, TRANCE e IL-1 α), mientras que 43 muestras exhibieron valores altos de MFI (≥ 15000) que indicaron niveles elevados de auto-Ab's IgG hacia 12 citocinas diferentes ($\text{IFN}\gamma$, $\text{IFN}\lambda$, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF y G-CSF). Por otra parte, en el grupo de individuos clínicamente sanos, todas las muestras resultaron negativas a auto-Ab's contra los 45 analitos evaluados, dado que mostraron valores MFI < 7000 . Los valores obtenidos a partir del análisis multiplexing de muestras séricas de pacientes y controles sanos se muestran en la **Figura 1**.

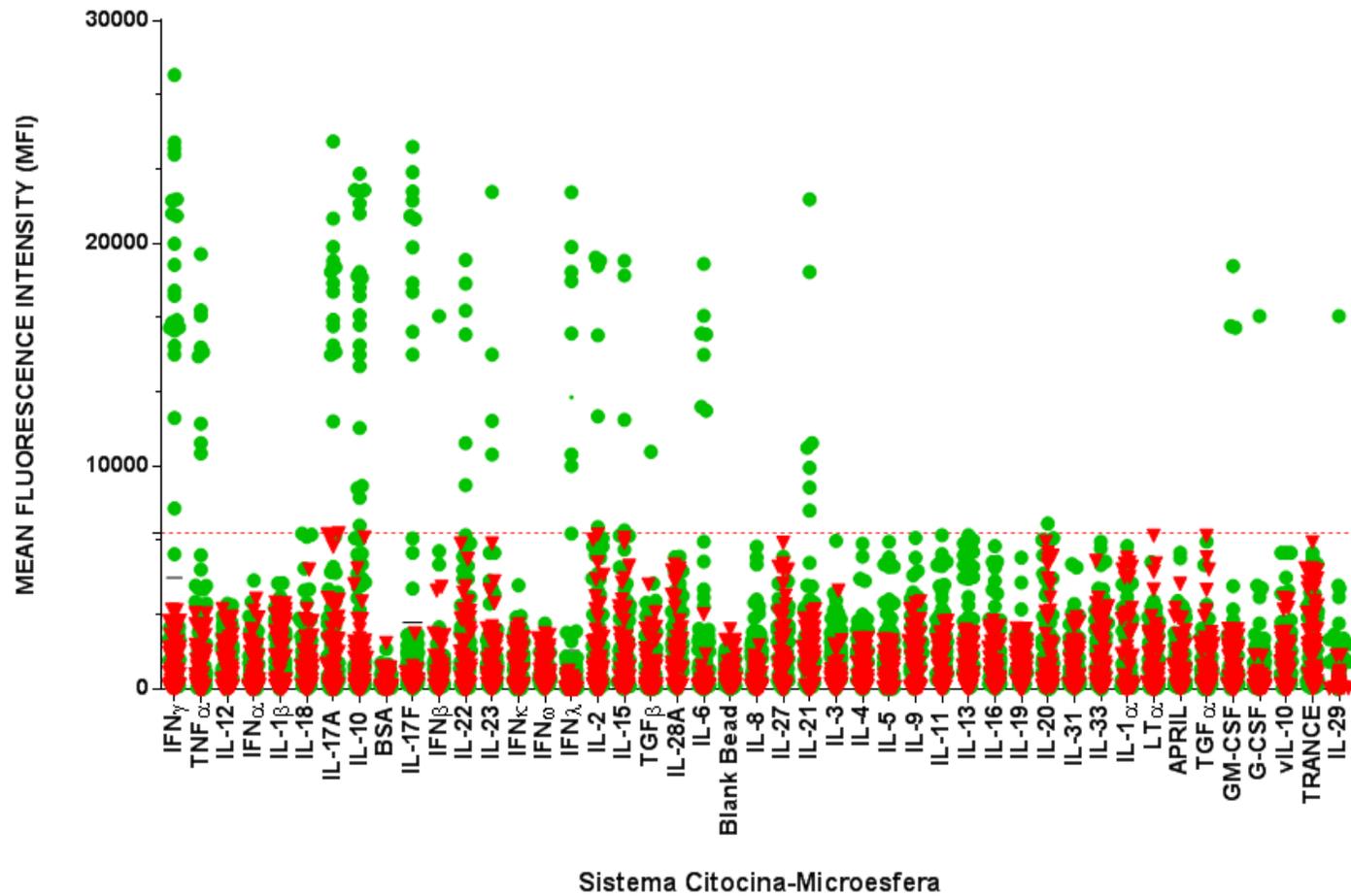


Figura 1. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas caninas mediante el sistema 45-plex citocina-microesfera. Se grafican los valores promedio de intensidad de fluorescencia para los 45 sistemas evaluados, incluyendo el sistema de la BSA como control negativo. La detección consideró 51 muestras séricas de pacientes (●) y 50 de individuos clínicamente sanos (▼), como controles negativos.

6.5.1.1. Respuestas específicas de autoanticuerpos anti-citocinas asociadas a los grupos de enfermedad en caninos

De forma esquemática, la representación de los resultados obtenidos a partir de la población canina de estudio se muestran como mapas de calor (**Figura 2, PANEL A:** controles sanos y **PANEL B:** Pacientes). La presencia de auto-Ab's contra algunas citocinas fue detectada con frecuencias más altas, en particular contra IFN γ (n = 19), IL-10 (n = 16), IL-17A (n = 15), IL-17F (n = 11), IL-22 (n = 4), IL-6 (n = 5) e IFN λ (n = 5) (**Figura 2, PANEL B**). 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 (< 7000), de verde a naranja los valores intermedios (> 7000 y < 15000) y rojo los valores altos (\geq 15000); así mismo dicho programa realiza en forma automática agrupaciones de los datos considerando los valores MFI.

Debido a la diversidad de grupos de enfermedad presentes en la población de pacientes caninos, las muestras séricas exhibieron diferentes respuestas de reconocimiento hacia los auto-Ab's anti-citocinas. La representación esquemática mediante mapas de calor permite visualizar el paciente canino y su enfermedad en conjunto con la asociación de auto-Ab's anti-citocina reconocidos en cada muestra. Por ejemplo, los pacientes con **AID** y **AUI** exhibieron una respuesta compleja y diversa a los auto-Ab's anti-citocinas, mostrando un 27% de alta positividad (MFI \geq 15000) a más de tres citocinas en comparación con solo 6.25% de positividad en el grupo de **ID**. Los pacientes con **AID** dermatológica generalizada (5/7) presentaron una tendencia particular dirigida hacia el desarrollo de auto-Ab's contra citocinas producidas por células Th17, incluidas IL-17A, IL-17F e IL-22. En general, los pacientes con **AID** y **AUI** tuvieron una mayor tendencia a presentar auto-Ab's anti-IL-17 en comparación con los pacientes con **ID** (61% frente a 43%, respectivamente), tal como se muestra en la **Figura 2, PANEL B**.

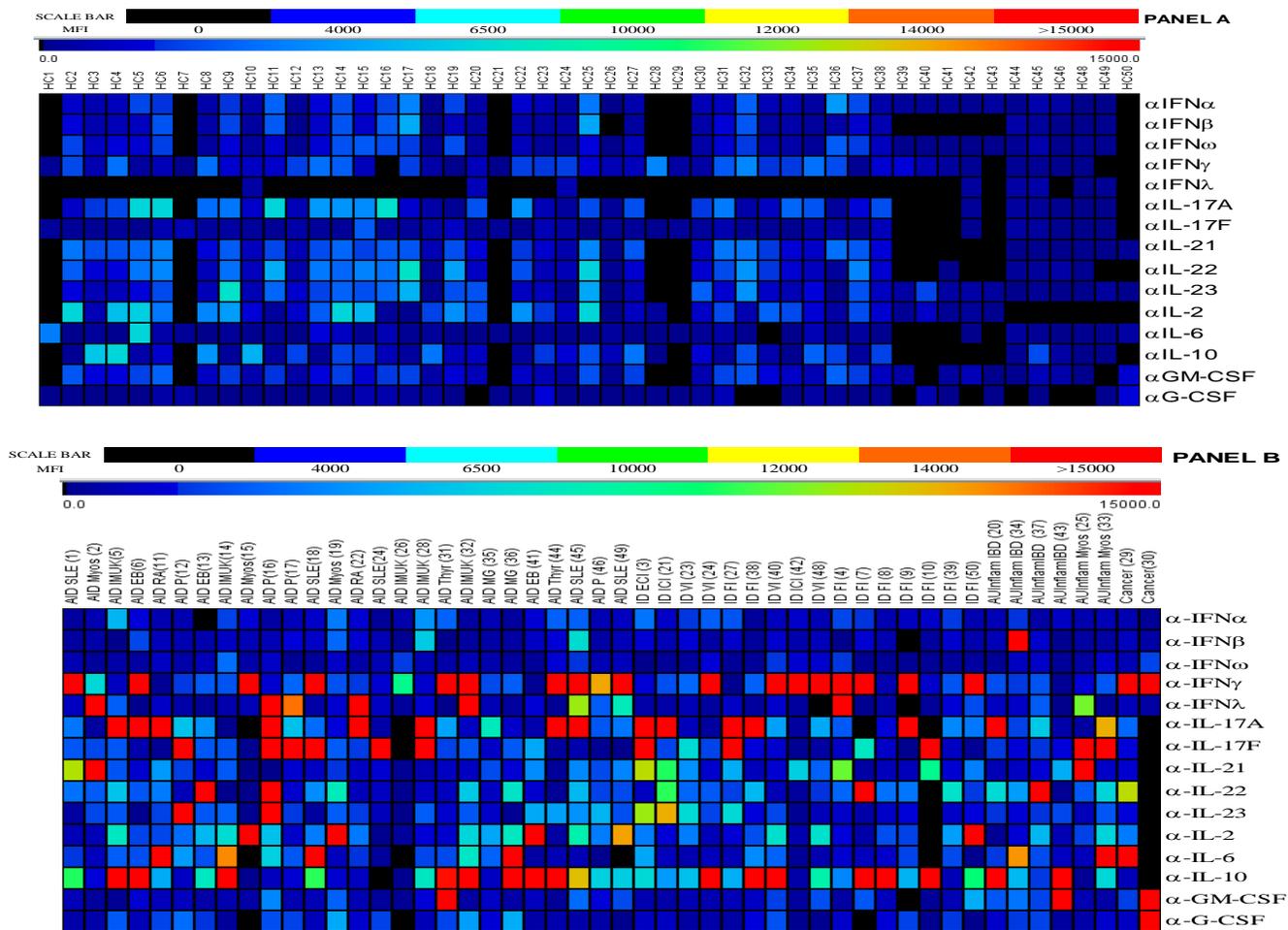


Figura 2. Mapa de calor con valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos anti-citocinas detectados en muestras caninas. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los sistemas de citocinas. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores MFI < 7000, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 7000 pero < 15000 y los rojos representan las muestras con valores MFI ≥ 15000. En el **PANEL A** se observa la escasa reactividad de los controles negativos, en contraste con los pacientes acorde a los cuatro grupos de enfermedad mostrados en el **PANEL B**.

En los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), dos de cuatro mostraron auto-Ab's contra IL-10, seguido de las citocinas producidas por células Th17 (IL-17A e IL-22). Un paciente con IBD mostró auto-Ab's contra GM-CSF y otro tenía anticuerpos contra IFN β , que fue la única vez que se encontró esta actividad en la población de estudio. De los cinco pacientes con queratitis ulcerativa autoinmune (IMUK, del inglés *Immunomediated ulcerative keratitis*), tres mostraron una alta actividad contra IL-10 y dos pacientes contra IL17-A e IL-17F. Los principales auto-Ab's detectados en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE, del inglés *Systemic Lupus erythematosus*) fueron IFN γ (4 de 5) e IL-17A/F (3 de 5), solo un paciente resultó positivo a la presencia de auto-Ab's anti-IL-6. Todos los perros con tiroiditis mostraron auto-Ab's contra IFN γ . Los auto-Ab's predominantes en los pacientes con ID (n = 16) fueron IFN γ (8), IL-10 (6), IL-17A (5) e IL-17F (3). Otros auto-Ab's fueron IL-22 e IFN λ . Algunos pacientes mostraron auto-Ab's hacia algunas citocinas poco comunes, por ejemplo los pacientes con miositis fueron positivos a auto-Ab's contra IL-21, los pacientes con cáncer mostraron patrones relativos únicos de auto-Ab's contra IL-6 e IFN γ , el paciente con leucemia de células B mostró auto-Ab's hacia G-CSF y GM-CSF, mientras que en el segundo caso, el canino con linfoma multicéntrico avanzado de células B mostró auto-Ab's hacia IFN γ (**Figura 2, Panel B**).

6.5.1.2. Análisis estadístico de la relación entre las respuestas de autoanticuerpos anti-citocinas y las enfermedades caninas

A partir de los resultados obtenidos del análisis multiplexing de Luminex, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) comparando a los individuos clínicamente sanos ($n = 50$) con los pacientes ($n = 51$) para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas en sus patrones de respuesta hacia auto-Ab's anti-citocinas.

La clasificación de citocinas empleada para el análisis de muestras séricas considero tres grupos principales: Interferones, citocinas producidas por Th17 y otras citocinas, mostrados en la **Figura 3, Panel A, B y C**, respectivamente. Se identificaron respuestas positivas (estadísticamente significativas) de auto-Ab's anti-citocinas en las muestras séricas del grupo de pacientes en comparación con el grupo control negativo (individuos clínicamente sanos); con los valores más bajos de P identificados para $IFN\gamma$ (**AID**, $p < 0.0001$), $IFN\lambda$ (**AID**, $p < 0.00001$), IL-17A (**ID**, $p < 0.0001$), IL-6 (**AID**, $p < 0.00001$) e IL-10 (**AID**, $p < 0.0001$), (**ID**, $p < 0.00001$).

La presencia de auto-Ab's contra interferones en las muestras séricas de pacientes caninos analizadas, mostró que auto-Ab's contra $IFN\gamma$ e $IFN\lambda$ presentaron los valores más altos MFI (≥ 15000) principalmente en los pacientes con **AID**, **AUI** e **ID** (**Figura 3, PANEL A**). De la misma forma, la presencia de auto-Ab's contra citocinas producidas por Th17, mostró que auto-Ab's contra IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 exhibieron valores considerables de MFI, principalmente en los pacientes con **AID**, **AUI** e **ID** (**Figura 3, PANEL B**). Finalmente, algunas muestras de los cuatro grupos de enfermedad (**AID**, **AUI**, **ID** y **Ca**) presentaron altos niveles de auto-Ab's contra las otras cinco citocinas reportadas, mientras que dos muestras del grupo de pacientes con **Ca** presentaron valores altos MFI (≥ 15000) de auto-Ab's contra cuatro citocinas como $IFN\gamma$, IL-6, G-CSF y GM-CSF (**Figura 3, PANEL A y C**).

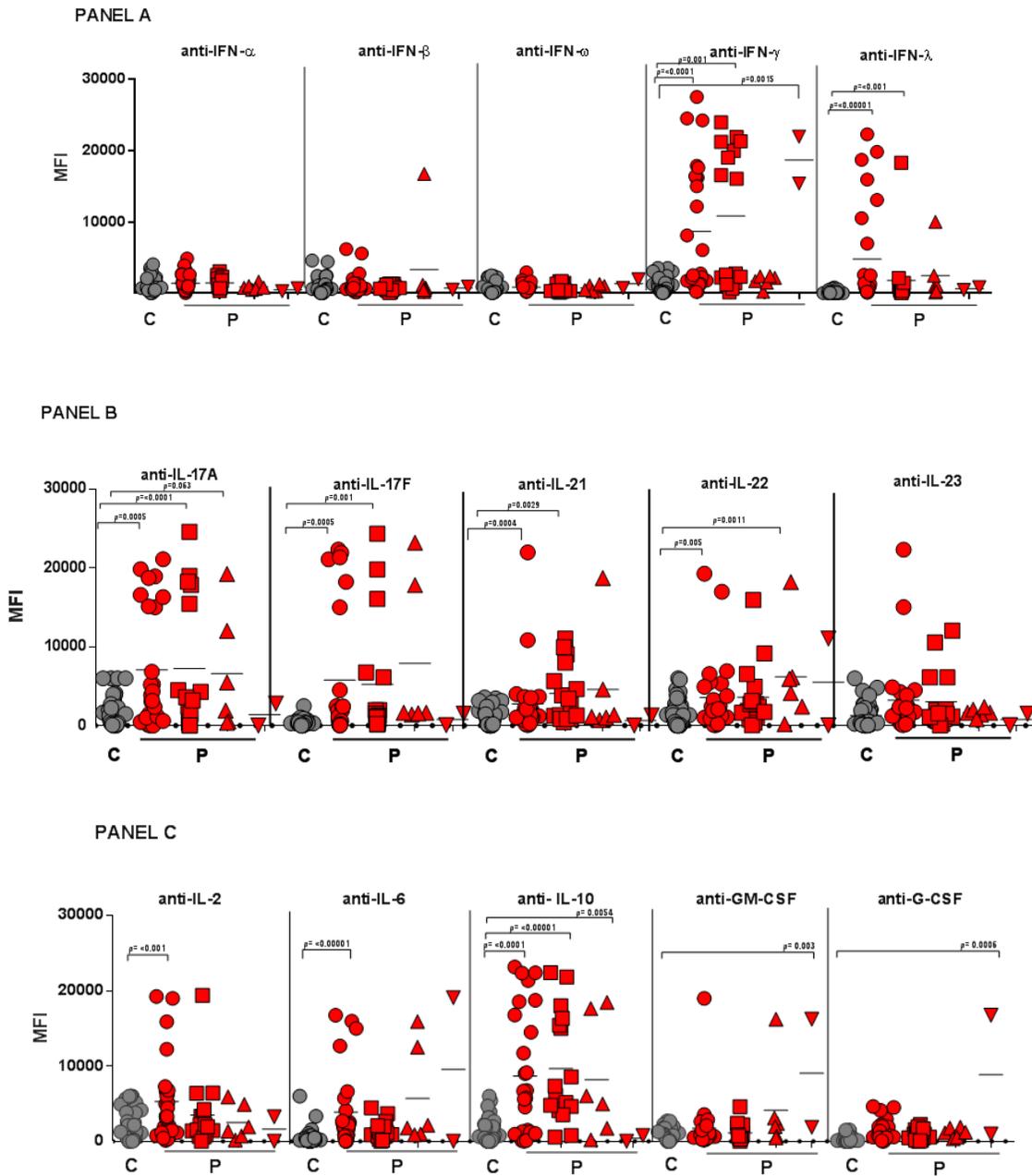


Figura 3. Autoanticuerpos anti-citocina detectados en muestras séricas caninas de pacientes e individuos clínicamente sanos. Los valores MFI se muestran para cada grupo de enfermedad, Controles sanos (●C, n = 50), Pacientes con enfermedad autoinmune (●P-AID, n = 26), pacientes con enfermedad autoinflamatoria (▲P-AUI, n = 6), pacientes con enfermedad infecciosa (■P-ID, n = 17) y pacientes con cáncer (▼P-Ca, n = 2). Los valores MFI se indican como barras horizontales. Los valores P fueron calculados usando una prueba T Mann-Whitney U doble no pareada. **Panel A:** Presencia de auto-Ab's contra Interferones-Tipo I (IFN α , IFN β , IFN ω) Tipo II (IFN γ) y Tipo III (IFN λ); **Panel B:** auto-Ab's hacia citocinas TH17 (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23); **Panel C:** auto-Ab's hacia otras citocinas (IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF, G-CSF).

6.5.1.3. Reactividades específicas de autoanticuerpos anti-citocinas en pacientes caninos

Debido a que la mayor parte de las muestras séricas de pacientes caninos analizadas mostró resultados positivos a la presencia de auto-Ab's contra diferentes citocinas, se realizó un agrupamiento jerárquico no supervisado (MEV 4_9_0®) de las 15 citocinas con mayor reconocimiento por los auto-Ab's (**Figura 4, PANEL A**). En esta figura se esquematiza un mapa de calor con los valores MFI de las muestras séricas correspondientes a los cuatro grupos de enfermedad en caninos (pacientes con **AID**, **AUI**, **ID** y **Ca**).

Aplicando una reducción de los datos mediante un análisis de significancia de dos clases, se lograron identificar siete diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo de pacientes: anti-IFN γ ($p = 0.0001$), anti-IFN λ ($p = 0.002$), anti-IL-17A ($p = 0.00004$), anti-IL-17F ($p = 0.001$), anti-IL-22 ($p = 0.0003$), anti-IL-6 ($p = 0.002$) y anti-IL-10 ($p = 0.00004$) (**Figura 4, PANEL B**). Este análisis permitió establecer una agrupación entre los auto-Ab's anti-citocinas con altos niveles (MFI ≥ 15000) y los grupos de enfermedades analizados. Por lo tanto, se definió una relación entre la presencia de auto-Ab's anti-citocinas y los grupos de enfermedad en caninos, lo que permitió establecer siete subgrupos diferentes: el primer subgrupo **(1)** de muestras séricas presentó auto-Ab's con una alta reactividad a IFN λ principalmente en pacientes con **AID** e **ID**, se observó un segundo subgrupo **(2)** que demostró auto-Ab's con reactividad hacia IL-17 en caninos con **AID** e **ID**. Por otra parte, el tercer subgrupo **(3)** de muestras séricas presentó auto-Ab's con fuerte reactividad hacia IL-17F en caninos con **AID**. El cuarto subgrupo **(4)** correspondió a muestras que presentaron reactividad a IL-22 en los tres grupos de enfermedad, excepto **Ca**; mientras en el quinto subgrupo **(5)** fueron muestras con auto-Ab's contra IL-6 en pacientes con **ID**, las muestras séricas del sexto subgrupo **(6)** exhibieron auto-Ab's hacia IFN γ en pacientes con **AID** e **ID**, y en el último subgrupo **(7)** se detectaron auto-Ab's hacia IL-10 en caninos con **AID** e **ID**.

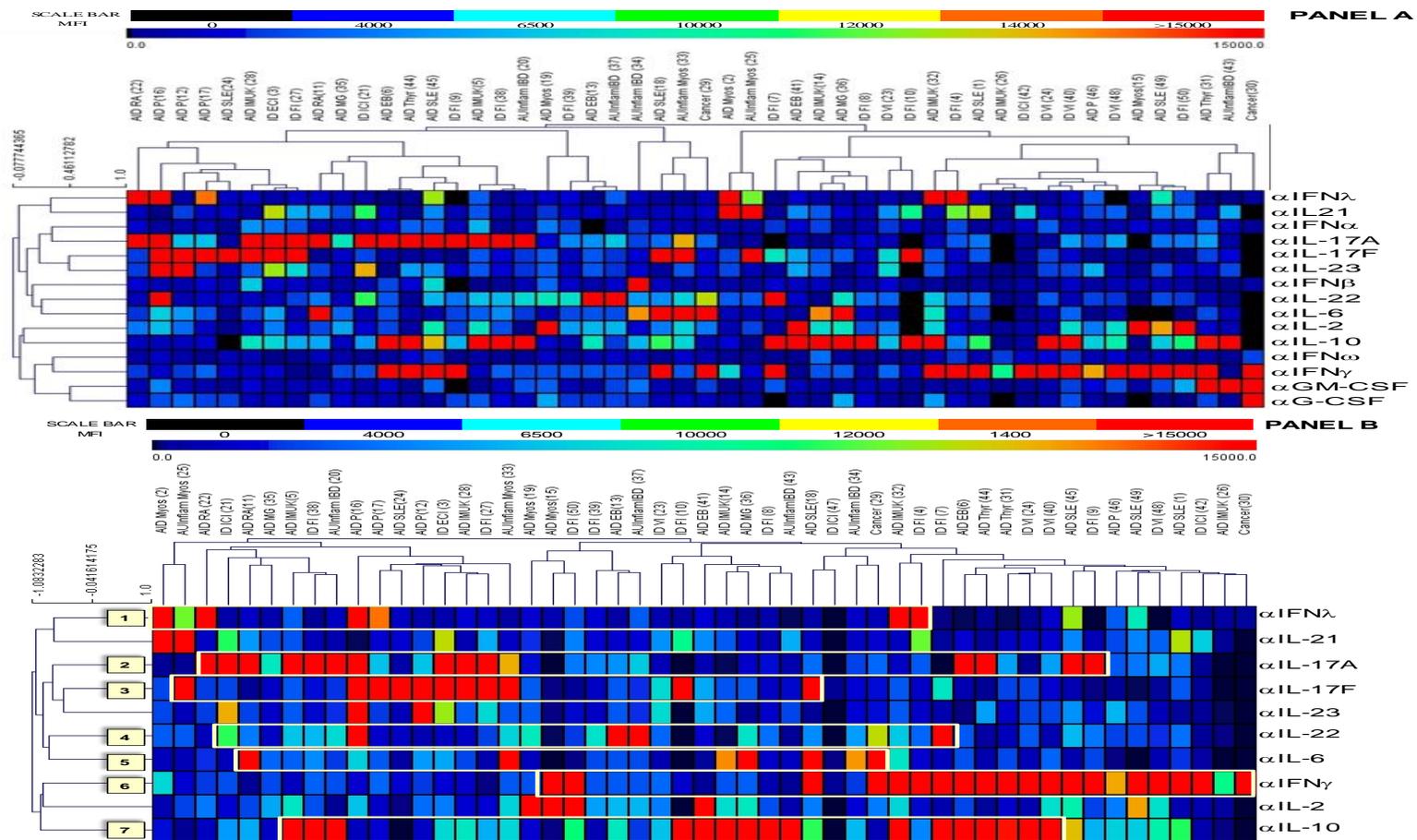


Figura 4. Mapas de calor con valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos anti-citocina detectados en pacientes caninos. Una agrupación jerárquica que utilizó distancia euclidiana, indicó patrones relacionados con mayor proximidad. **PANEL A:** agrupamiento jerárquico que indica los patrones de reactividad frente a 15 citocinas en pacientes con varios tipos de enfermedad (n = 51). El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los sistemas de citocinas. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores MFI < 7000, los colores de verdes a naranjas valores > 7000 pero < 15000 y los rojos representan las muestras con valores MFI ≥ 15000. **PANEL B:** Un análisis de significancia de dos clases identificó siete diferencias estadísticamente significativas en un grupo de 10 citocinas seleccionadas por su alta reactividad en pacientes, diferentes patrones con alta reactividad se observan: **1)** auto-Ab's anti-IFNλ; **2 y 3)** auto-Ab's anti-IL-17A/ F; **4)** auto-Ab's anti-IL-22; **5)** auto-Ab's anti-IL-6; **6)** auto-Ab's anti-IFNγ y **7)** auto-Ab's anti-IL-10. (α): Prefijo anti/contra; (MFI): Valor promedio de intensidad de fluorescencia.

6.5.1.4. Validación de los perfiles de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas caninas de pacientes y controles negativos empleando la plataforma estadística de análisis de componentes principales (PCA)

Se realizó un PCA para analizar más a fondo los perfiles de respuesta de auto-Ab's anti-citocinas entre todos los conjuntos de datos. De forma general las muestras séricas de pacientes (**AID, AUI, ID y Ca**) y controles clínicamente sanos (**HC**) exhibieron dos respuestas notablemente diferentes frente a la presencia de auto-Ab's contra citocinas (**Figura 5, PANEL A**). Adicionalmente se realizó una matriz de correlación que identificó un fuerte valor de correlación ($r = 0.864$) entre el grupo de enfermedad (**AID, AUI, ID y Ca**) y el patrón de respuesta hacia los auto-Ab's anti-citocina detectados en cada una de las muestras. En el caso de la matriz bidireccional dirigida hacia la respuesta de auto-Ab's anti-citocina en los pacientes, se observaron diferencias importantes en los distintos grupos de enfermedad y sus respuestas específicas de auto-Ab's anti-citocina (**Figura 5, PANEL B**).

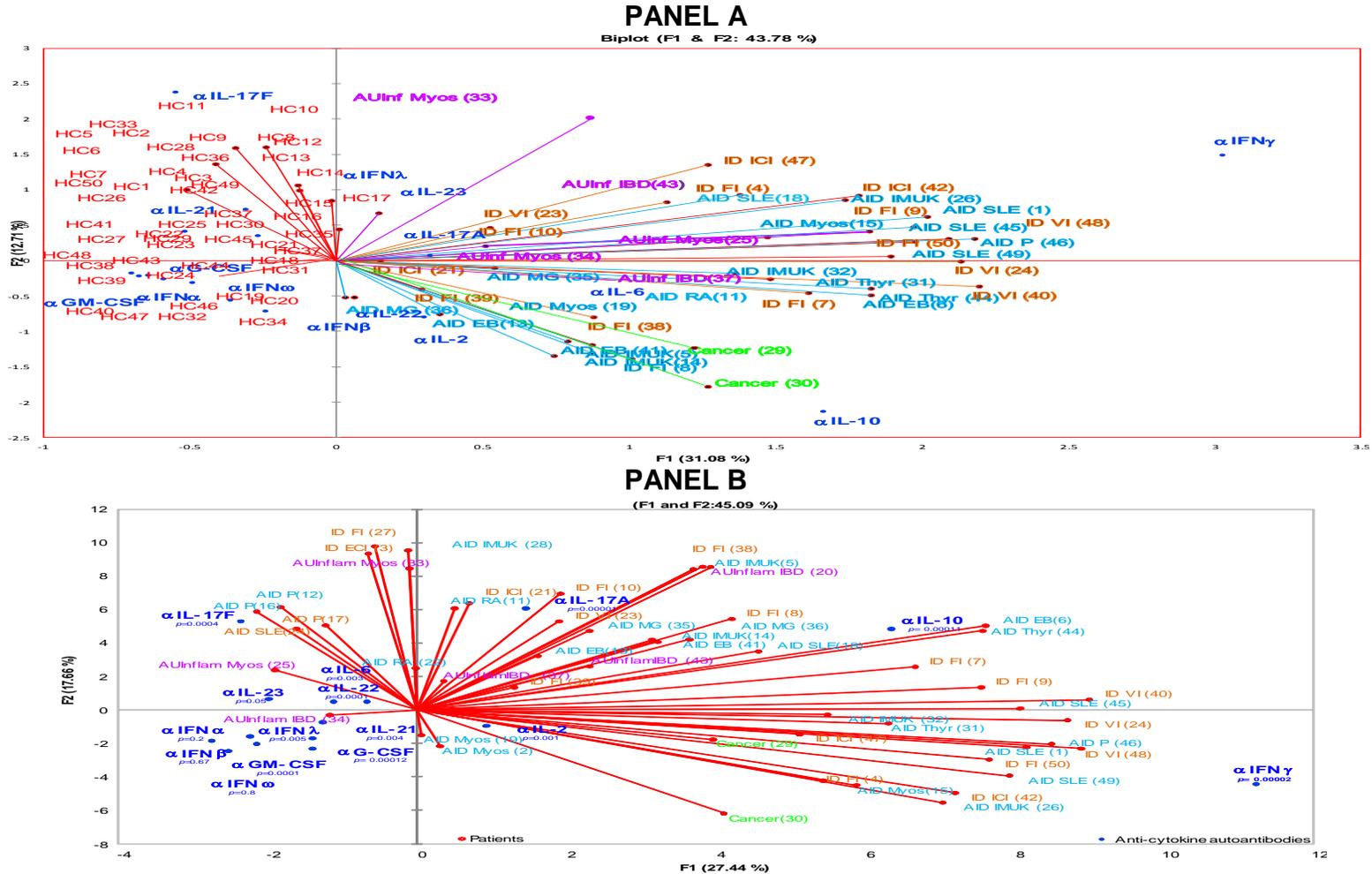


Figura 5. Descripción global de las diferentes respuestas de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas caninas. PANEL A: mapa Biplot que muestra la ubicación de los pacientes (n = 51) con sus cuatro distintos grupos de enfermedad **AID**, **AUI**, **ID** y **Ca**, respecto a los controles negativos **HC** (n = 50) aplicando un PCA mediante una transformación ortogonal para convertir variables no correlacionadas en variables correlacionadas, que se denominan componentes principales (F1: 17.66% y F2: 45.09%). Dichos valores fueron indicativos de la variabilidad de respuesta dentro de cada muestra considerando las diferencias radicales entre ambos grupos. En el **PANEL B** se representa la matriz bidireccional del mapa de correlación de pacientes (n = 51, **AID**, **AUI**, **ID** y **Ca**) analizadas contra los 15 auto-Ab's anti-citocinas, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (r); Los valores $p \leq 0.005$ se consideraron estadísticamente significativos.

6.5.2. Análisis serológico en muestras equinas

Se analizaron un total de 100 muestras séricas de equinos, las cuales fueron clasificadas en dos grupos, de acuerdo al tipo de enfermedad que presentaban los pacientes, aquellos que correspondieron a enfermedades **AID/AUI** (n = 20) e **ID** (n = 30). Se incluyeron equinos clínicamente sanos de diferente raza sin enfermedad congénita (controles negativos, n = 50). Como se mencionó anteriormente las características clínicas de los diferentes grupos de enfermedad en equinos se especifican en la **Tabla 4** del **Apéndice 1**.

Los resultados del análisis de la presencia de auto-Ab's en sueros de pacientes equinos se muestran en las **Tablas 11 y 12** (Ver **Apéndice 1**), en donde los pacientes señalados en color rojo corresponden a animales positivos con altos niveles de auto-Ab's (≥ 15000) contra más de una citocina, mientras que la **Tabla 13** (Ver **Apéndice 1**) corresponde a los controles negativos.

De forma general, en la población equina se encontró que 39 de 50 equinos (78%) fueron positivos a auto-Ab's contra al menos una citocina, dado que mostraron valores de MFI considerables (≥ 7000) correspondientes a auto-Ab's contra siete diferentes citocinas ($IFN\gamma$, $IFN\lambda$, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-10), mientras que 26 muestras séricas exhibieron valores altos de MFI (≥ 15000) indicando niveles elevados de auto-Ab's IgG hacia cinco diferentes citocinas ($IFN\gamma$, IL-6, IL-17F, IL-21 e IL-10). Por otra parte, en el grupo de controles sanos todas las muestras resultaron negativas a la presencia de auto-Ab's contra los 45 analitos evaluados, dado que presentaron valores MFI bajos (< 7000). Los resultados obtenidos a partir del análisis multiplexado se muestran en la **Figura 6**.

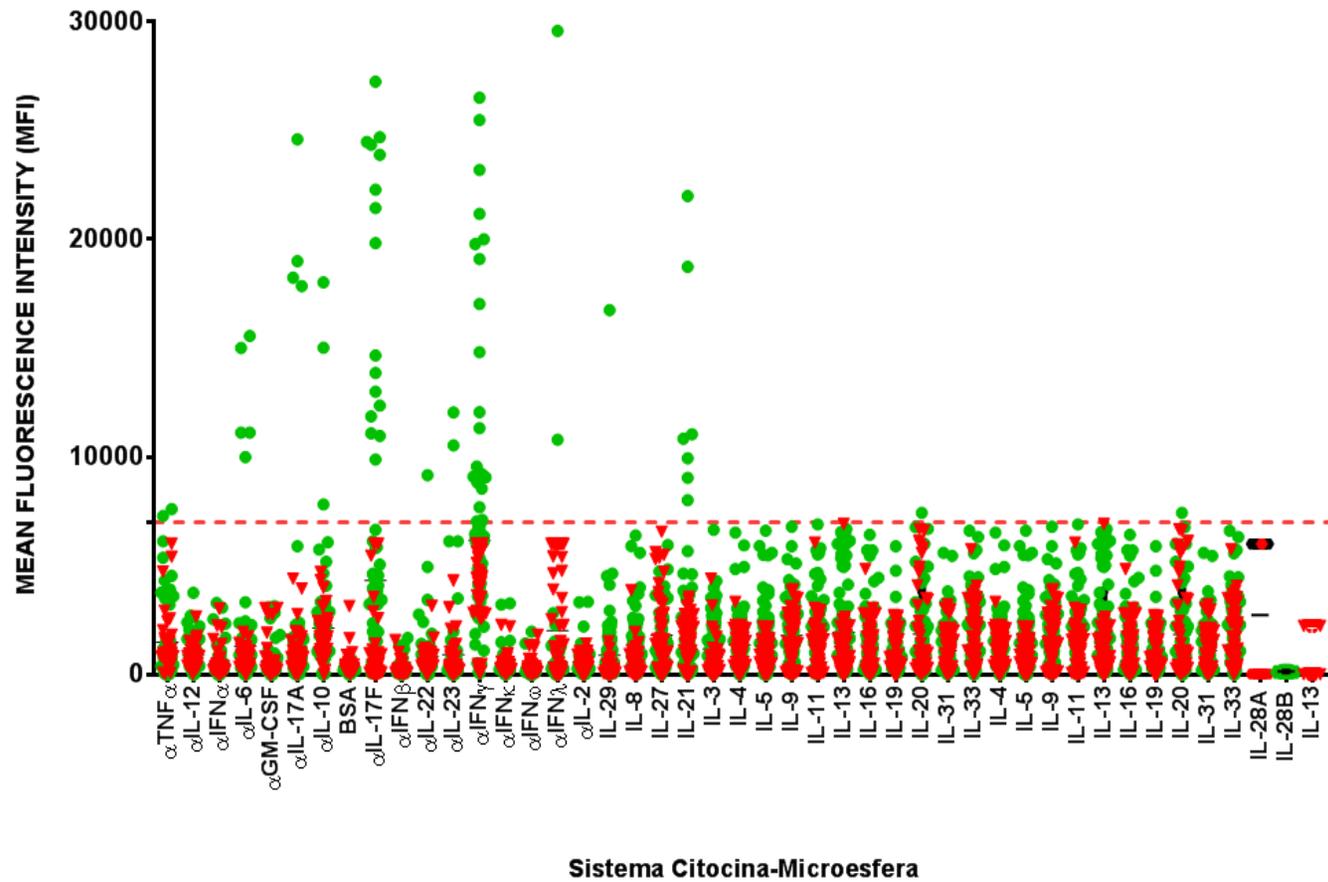


Figura 6. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de equinos mediante el sistema 45-plex citocina-microesfera. Se grafican los valores promedio de intensidad de fluorescencia para los 45 sistemas evaluados, incluyendo el sistema de la BSA como control negativo. La detección de autoanticuerpos consideró 50 muestras séricas de pacientes (●) y 50 de individuos clínicamente sanos (▼), como controles negativos.

6.5.2.1. Respuestas específicas de autoanticuerpos anti-citocinas asociadas a los grupos de enfermedad en equinos

Los resultados obtenidos a partir del análisis multiplexing de Luminex se muestran como mapas de calor en la **Figura 7, PANEL A: Pacientes y PANEL B: controles negativos**. La presencia de auto-Ab's anti-citocinas fueron detectados con frecuencias más altas hacia IL-17F (n = 9), IFN γ (n = 9), IL-6 (n = 4), IL-17A (n = 4), IL-21 (n = 4) e IL-10 (n = 3). Mientras que en los sueros de controles negativos no se detectó la presencia de auto-Ab's contra ninguna de las citocinas analizadas (**Figura 7, PANEL B**).

El programa (MEV 4_9_0®) reporta los valores MFI de las muestras séricas analizadas, esta plataforma emplea una escala de colores donde el gradiente de negro a azul representa los valores bajos (< 7000), de verde a naranja los valores intermedios (> 7000 y < 15000) y rojo los valores altos (\geq 15000); así mismo dicho programa realizó en forma automática agrupaciones considerando los valores MFI de la población, esta representación permite visualizar las diferentes respuestas específicas de auto-Ab's anti-citocinas encontradas en la población equina de este estudio.

Aplicando una reducción de los datos mediante un análisis de significancia de dos clases, se observaron algunos patrones de alta reactividad en las muestras séricas de pacientes frente a siete diferentes auto-Ab's anti-citocinas seleccionados, se identificaron cuatro diferencias estadísticamente significativas dentro del grupo de pacientes: anti-IL-17F ($p = 0.0001$), anti-IFN γ ($p = 0.0003$), anti-IL-6 ($p = 0.000004$) y anti-IL-17A ($p = 0.0000012$) (**Figura 8**).

En el grupo de pacientes con **AID/AUI** (n = 20) había siete equinos con complejo artritis/laminitis y dos de ellos exhibieron auto-Ab's hacia las citocinas TH1 (IFN γ), mientras que de los tres pacientes con fibromialgia (n = 3) todos presentaron auto-Ab's contra IL-17F y dos de ellos además mostraron auto-Ab's hacia IL-6. Particularmente, en los equinos con poliradiculoneuritis (n = 5) solo dos mostraron auto-Ab's hacia IL-10, en los caballos con péufigo (n = 4) dos pacientes exhibieron auto-Ab's hacia IL-21.

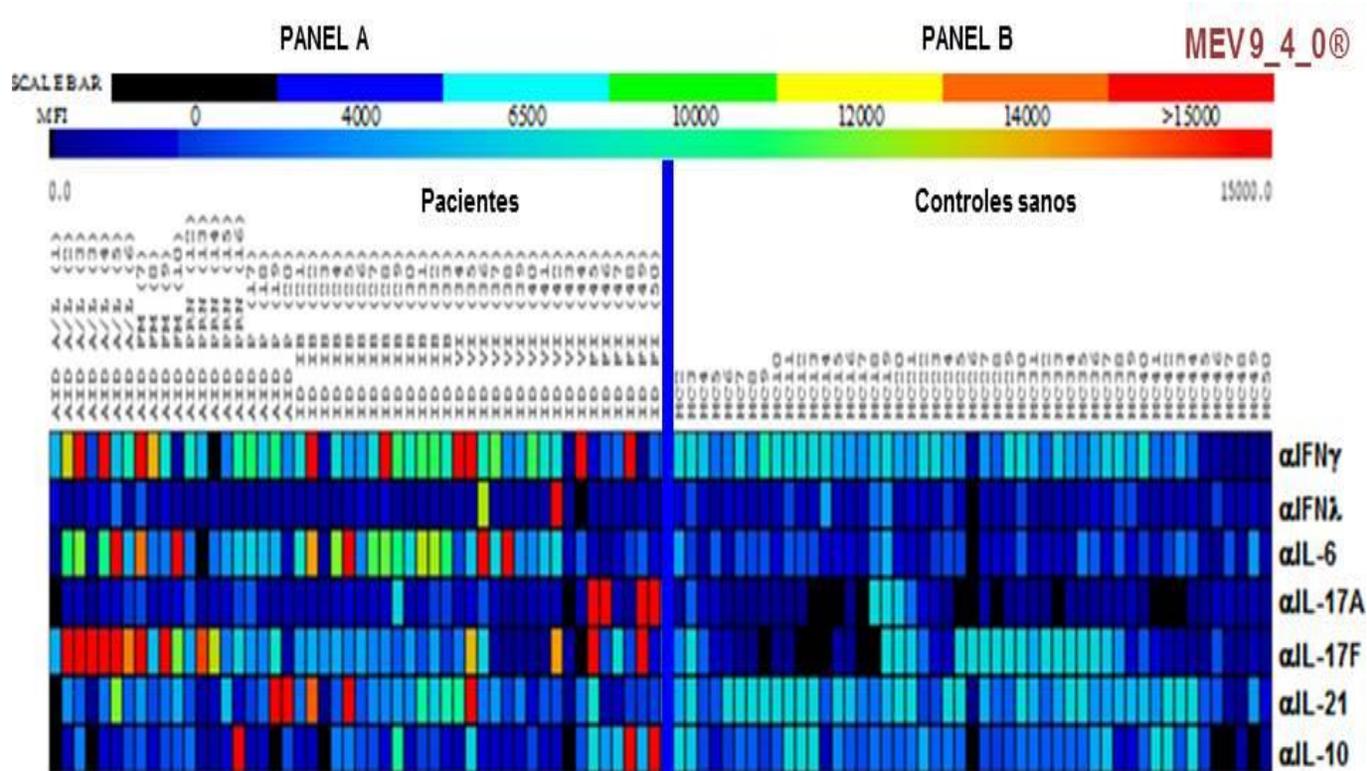


Figura 7. Mapa de calor con valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos anti-citocinas detectados en muestras séricas de equinos. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los sistemas de citocinas. Los colores más oscuros (azules y negros) indican valores MFI < 7000, los colores de verdes a naranjas valores ≥ 7000 pero ≤ 15000 y los rojos representan las muestras con valores MFI ≥ 15000 . **PANEL A**, se observa la alta reactividad en los sueros de los pacientes acorde a los dos grupos de enfermedad (**AID/AUI** e **ID**), en contraste con el **PANEL B** que esquematiza los controles negativos cuyos patrones de reactividad son menores a < 7000.

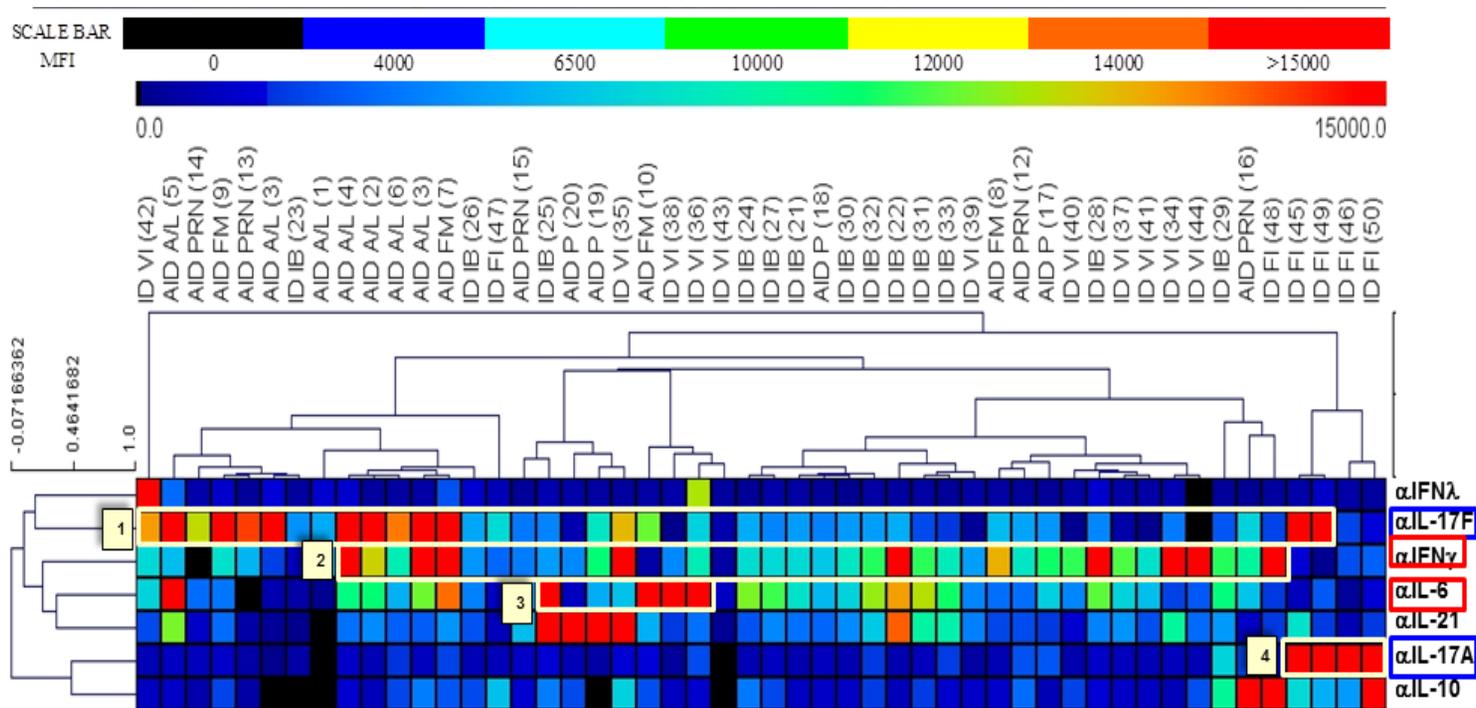


Figura 8. Mapa de calor con valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos detectados en pacientes equinos. Una agrupación jerárquica que utilizó distancia euclidiana indicó los patrones relacionados que se muestran con mayor proximidad, aplicando un análisis de significancia de dos clases se observaron algunos patrones de alta reactividad en pacientes frente a siete diferentes auto-Ab's anti-citocinas seleccionados, identificando cuatro diferencias significativas en el grupo de pacientes, tales como **1)** auto-Ab's anti-IL-17F; **2)** auto-Ab's anti-IFN γ ; **3)** auto-Ab's anti-IL-6 y **4)** auto-Ab's anti-IL-17A. MFI: Valor promedio de intensidad de fluorescencia.

En los pacientes con **ID** (n = 30), dos de 13 caballos que cursaron con infecciones por bacterias intracelulares presentaron auto-Ab's hacia IFN γ y otro paciente más exhibió auto-Ab's contra IL-6.

En los caballos que cursaron con infecciones virales (n = 11), dos pacientes infectados por el virus de Anemia infecciosa equina (n = 4) mostraron auto-Ab's hacia IFN γ y uno de ellos mostró además auto-Ab's hacia IFN λ ; así mismo, otros dos equinos con Anemia infecciosa equina exhibieron auto-Ab's hacia IL-6 en niveles considerables.

En los pacientes con infección fúngica diseminada (n = 6), se identificó en todos los caballos que padecían de Neumonía por *Pneumocystis sp* (n = 4) la presencia de auto-Ab's hacia IL-17A/F, así mismo, dos de ellos presentaron auto-Ab's hacia IL-10. Particularmente un equino con dermatomicosis (n = 2) mostró auto-Ab's hacia IFN γ .

6.5.2.2. Análisis estadístico de la relación entre las respuestas de autoanticuerpos anti-citocinas y las enfermedades en equinos

A partir de los resultados obtenidos del análisis multiplexing de Luminex, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para evaluar las diferencias en los patrones de respuesta de auto-Ab's anti-citocinas de los pacientes (n = 50) con respecto a los controles negativos (n = 50). La clasificación de citocinas para el análisis de muestras séricas en equinos fue la misma que se empleó en la población de caninos (interferones, citocinas producidas por células TH17/citocinas pro-inflamatorias y otras citocinas) y se muestra en la **Figura 9, PANEL A, B y C**, respectivamente.

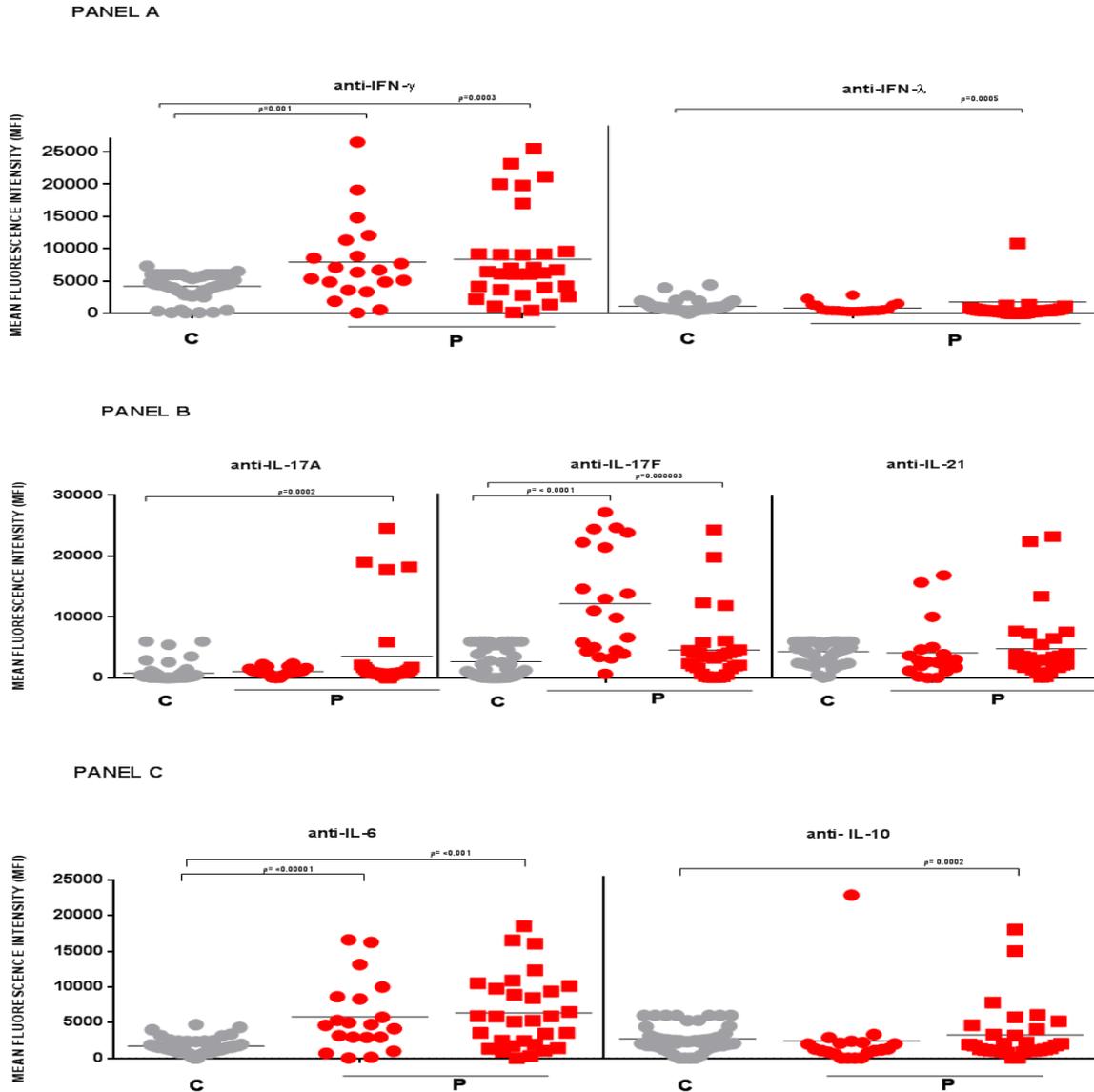


Figura 9. Autoanticuerpos anti-citocina detectados en muestras séricas de pacientes equinos e individuos clínicamente sanos. Los valores MFI se muestran para cada grupo de enfermedad, Controles sanos (● HC, n = 50), Pacientes con enfermedad autoinmune/autoinflamatoria (● P-AID/AUI, n = 20), pacientes con enfermedad infecciosa (■ P-ID, n = 30). Los valores MFI se indican como barras horizontales. Los valores P fueron calculados usando una prueba T Mann-Whitney U doble no pareada. **PANEL A**, presencia de auto-Ab's contra Interferones-Tipo II (IFN γ) y Tipo III (IFN λ); **PANEL B**, auto-Ab's hacia citocinas producidas por Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-21); **PANEL C**: auto-Ab's hacia otras citocinas (IL-6 e IL-10).

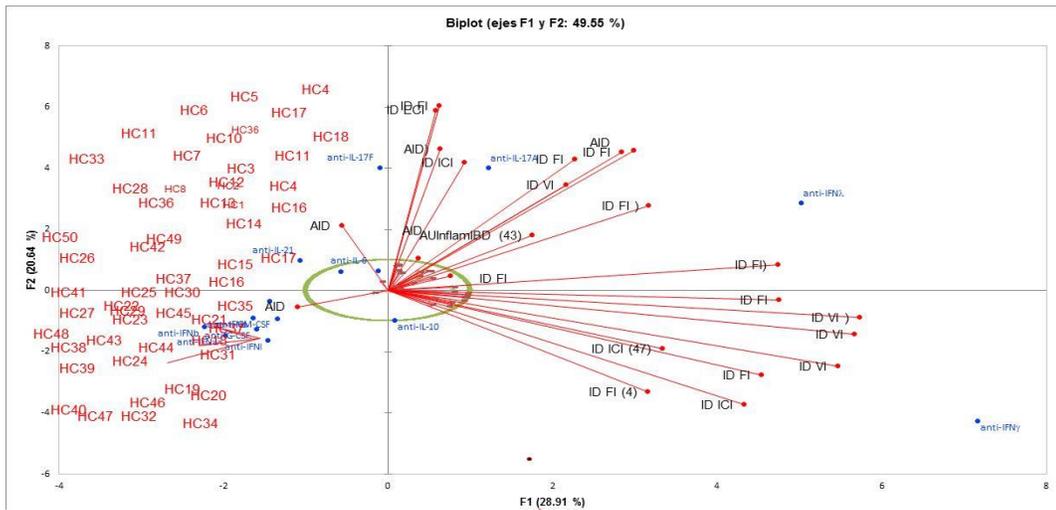
Se identificaron respuestas positivas (estadísticamente significativas) de auto-Ab's anti-citocinas en las muestras séricas del grupo de pacientes equinos en comparación con el grupo control negativo, con los valores más bajos de P identificados para $IFN\gamma$ (**AID**, $p = 0.001$; **ID** $p = 0.0003$), $IFN\lambda$ (**ID**, $p = 0.0005$), IL-17A (**ID**, $p = 0.0002$), IL-17F (**AID** $p = 0.0001$; **ID** $p = 0.000003$), IL-6 (**AID**, $p = 0, 00001$; **ID** $p = 0.001$) e IL-10 (**ID**, $p = 0.0002$).

La presencia de auto-Ab's contra interferones en las muestras séricas de pacientes equinos, mostró que auto-Ab's contra $IFN\gamma$ presentaron los valores MFI más altos (≥ 15000) principalmente en el grupo de pacientes con **AID/AUI**, seguido del grupo de **ID** donde solo un paciente mostró auto-Ab's hacia $IFN\lambda$ (**Figura 9, PANEL A**). De la misma forma, la presencia de auto-Ab's contra citocinas producidas por células Th17, mostró que auto-Ab's contra IL-17F (6 pacientes) e IL-17A (4 pacientes), exhibieron altos valores de MFI (> 15000), principalmente en los pacientes con **AID/AUI** e **ID**; en este grupo los pacientes con **ID** exhibieron auto-Ab's hacia IL-17A (4), IL-17F (2) e IL-21 (2) como se muestra en la **Figura 9, PANEL B**. Finalmente, en la **Figura 9, PANEL C**, se pudo observar que algunas muestras séricas de pacientes con **AID/AUI** presentaron altos niveles de auto-Ab's contra IL-6 (2) e IL-10 (1), mientras que dos muestras séricas de pacientes con **ID** presentaron valores MFI altos (≥ 15000) de auto-Ab's contra IL-6 (3) e IL-10 (2).

6.5.2.3. Validación de perfiles de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas equinas de pacientes y controles negativos mediante el análisis de componentes principales

De la misma forma que en los pacientes caninos, se realizó una matriz de correlación entre los perfiles de respuesta de anticuerpos anti-citocinas en los grupos principales de enfermedad en pacientes equinos (**AID/AUI** e **ID**) comparándolos con los individuos controles negativos (**HC**), ambos grupos exhibieron dos respuestas notablemente diferentes frente a todas las citocinas dirigidas (**Figura 10, PANEL A**). Adicionalmente, se obtuvo un fuerte valor de correlación ($r = 0.961$) entre el grupo de enfermedad y el patrón de respuesta de auto-Ab's anti-citocina detectado en cada una de las muestras de pacientes (**Figura 10, PANEL B**).

PANEL A



PANEL B

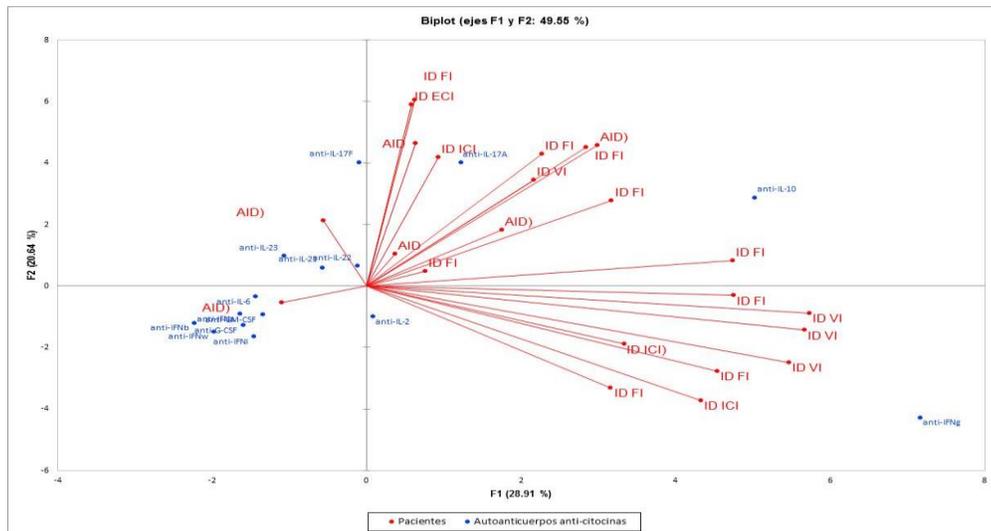


Figura 10. Descripción global de las diferentes respuestas de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas de equinos. PANEL A: Mapa Biplot que muestra los valores MFI de muestras séricas de la población de estudio, se observan las diferencias radicales entre ambos grupos (**HC**, Controles negativos) y pacientes (**AID/ AUI** e **ID**). **PANEL B:** Mapa de correlación de algunas muestras séricas de pacientes equinos ($n = 30$, $MFI \geq 15000$) que fueron analizadas contra 15 auto-Ab's anti-citocinas, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson ($r = 0.92$); Los valores de $p \leq 0.005$ se consideraron estadísticamente significativos.

6.5.3. Análisis serológico en muestras humanas

Se analizaron un total de 301 sueros humanos de pacientes, de los cuales 301 correspondieron a pacientes y acorde al tipo de padecimiento que presentaban fueron clasificados en cuatro grupos principales de enfermedad, aquellos que padecían enfermedades autoinmunes/autoinflamatorias (**AID/AUI**, n = 133), enfermedades infecciosas (**ID**, n = 126), enfermedades autoinmunes e infecciosas (**AID/ID**, n = 10), otras enfermedades (**OD**, n = 32); se emplearon 50 sueros pertenecientes a individuos clínicamente sanos. Como se mencionó anteriormente las características clínicas de los diferentes grupos de enfermedad en humanos se especifican en la **Tabla 5** del **Apéndice 1**.

Los resultados del análisis de la presencia de auto-Ab's en muestras séricas de pacientes humanos se observan en las **Tablas 14, 15, 16 y 17** (Ver **Apéndice 1**), donde los números en color rojo corresponden a muestras de pacientes positivos con altos niveles de auto-Ab's (≥ 15000) contra más de una citocina, mientras que la **Tabla 18** (Ver **Apéndice 1**) corresponde a los individuos clínicamente sanos.

De forma global, los resultados revelaron que 176 de 301 (58%) muestras séricas humanas de pacientes presentaron auto-Ab's IgG contra al menos una citocina, dado que mostraron valores MFI considerables (≥ 7000) correspondientes a anticuerpos contra 16 diferentes citocinas ($IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\omega$, $IFN\gamma$, $IFN\lambda$, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22, TRANCE, IL-28A, IL-12, IL-10, IL-22, G-CSF y GM-CSF), mientras que 92 muestras reflejaron valores altos de MFI (≥ 15000) que indicaban niveles elevados de auto-Ab's IgG hacia 12 citocinas diferentes ($IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\omega$, $IFN\gamma$, $IFN\lambda$, IL-6, IL-17F, TRANCE, IL-22, IL-28A, IL-10 y GM-CSF). Por otra parte en el grupo de individuos clínicamente sanos todas las muestras resultaron negativas a auto-Ab's contra las 45 analitos evaluados. Los resultados obtenidos a partir del análisis serológico multiplex se muestran en la **Figura 11**.

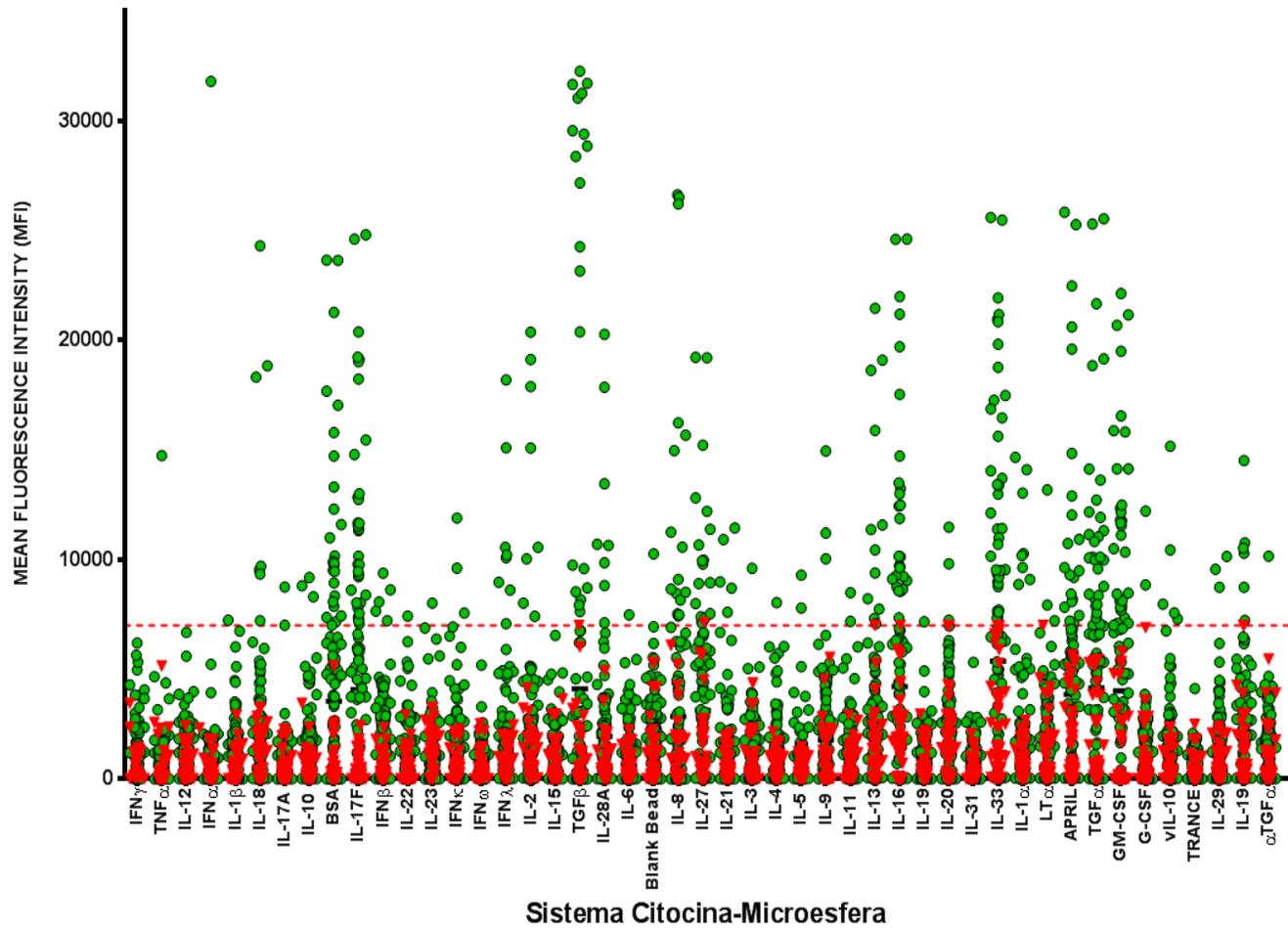


Figura 11. Detección de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas humanas mediante el sistema 45-plex citocina-microesfera. Se grafican los valores MFI para los 45 sistemas evaluados, incluyendo el sistema BSA como control negativo. La detección consideró 301 muestras séricas de pacientes (●) y 50 de individuos clínicamente sanos (▼), como controles negativos.

6.5.3.1. Respuestas específicas de autoanticuerpos anti-citocinas asociadas a los grupos de enfermedad en humanos

Los resultados obtenidos a partir del análisis serológico multiplex se muestran como mapas de calor en la **Figura 12, Panel A:** controles sanos y **Panel B:** Pacientes. La presencia de los auto-Ab's contra algunas citocinas fueron dirigidas con frecuencias más altas, en particular contra IFN α (n = 7), TRANCE (n = 6), IL-28A (n = 8), IL-10 (n = 23), IL-17F (n = 6), IL-6 (n = 5) e IFN λ (n = 5) (**Figura 12, Panel B**). El programa (MEV 4_9_0®) permitió reportar los valores MFI empleando una escala de colores, el gradiente de negro a azul representa los valores bajos (< 7000), de verde a naranja los valores intermedios (> 7000 y < 15000), y rojo los valores altos (\geq 15000); así mismo dicho programa realiza en forma automática agrupaciones considerando los valores MFI de las muestras séricas humanas.

El grupo de pacientes presentó una diversidad de respuesta (alta reactividad) hacia los diferentes auto-Ab's anti-citocina evaluados y se observó que anticuerpos contra IFN α , IFN β , IFN ω , IFN γ , IFN λ e IL-10 presentan los valores más altos de MFI (\geq 15000), principalmente en el grupo de pacientes con **AID**, mientras que la presencia de anticuerpos anti-IL-17F (27), IL-28A (3) fueron más altos en los sueros de pacientes con **ID** (**Figura 12, Panel B**).

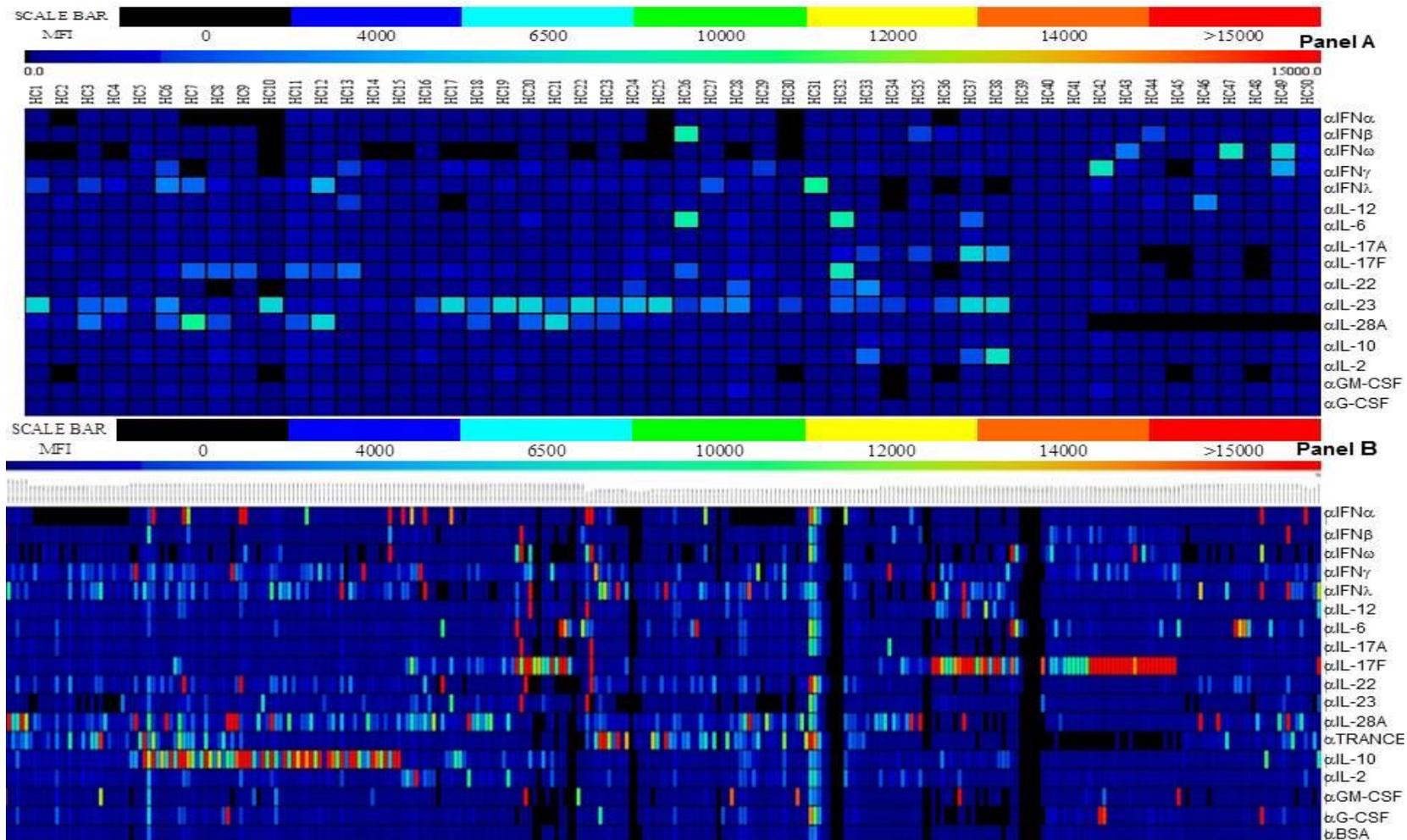


Figura 12. Mapa de calor con valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos anti-citocinas detectados en muestras humanas. El eje X representa las muestras, mientras el eje Y los sistemas de citocinas. Los colores más oscuros (Azules y negros) indican valores MFI < 7000, los colores de verdes a naranjas valores > 7000 pero < 15000, y los rojos representan las muestras con valores MFI \geq 15000. **Panel A:** la detección de auto-Ab's anti-citocinas en controles negativos. **Panel B:** auto-Ab's anti-citocinas detectados en sueros de pacientes con diferentes patrones de reactividad y cuyos valores de MFI fueron mayores a 15000.

6.5.3.2. Reactividades específicas de autoanticuerpos anti-citocinas en pacientes humanos

Se realizó un agrupamiento jerárquico entre los auto-Ab's anti-citocina detectados y las muestras analizadas, dicho análisis incluyó las citocinas con mayor reconocimiento por los auto-Ab's. Debido a la enorme diversidad de respuestas de auto-Ab's anti-citocinas detectadas en las muestras séricas de los pacientes humanos, se muestra en la **Figura 13, Panel A** el mapa de calor que incluye los valores MFI de los pacientes con enfermedad **AID/AUI**, mientras el **Panel B**, esquematiza las muestras de pacientes con **ID**.

Aplicando un análisis de significancia de dos clases, se logró una reducción de los datos y se identificaron siete diferencias estadísticamente significativas dentro de las reactividades de auto-Ab's anti-citocina del grupo de pacientes con **AID/AUI** e **ID**, cuyos valores de p fueron los siguientes: **1)** anti-IFN γ $p = 0.00001$; **2)** anti-IL-28A $p = 0.0003$; **3)** anti-IL-10, $p = 0.0002$; **4)** anti-GM-CSF, $p = 0.0005$; **5)** anti-IL-6, $p = 0.005$; **6)** anti-IFN α , $p = 0.002$; **7)** anti-IL-17A, $p = 0.004$ (**Figura 13, Panel A**). Mientras que en el **Panel B** se observan los pacientes con **ID** cuyos auto-Ab's detectados resultaron estadísticamente significativos solo hacia **1)** anti-IL-17F, $p = 0.0001$ y **2)** anti-IL-6, $p = 0.00004$.

6.5.3.3. Análisis estadístico en la interacción con las respuestas de autoanticuerpos anti-citocinas detectadas en humanos

A partir de los resultados obtenidos previamente mediante el análisis de Luminex, se elaboró un ANDEVA que permitió comparar a los controles negativos ($n = 50$) en contraste con los pacientes ($n = 251$) para evaluar si existían diferencias significativas en los patrones de respuesta hacia auto-Ab's anti-citocinas en ambos grupos.

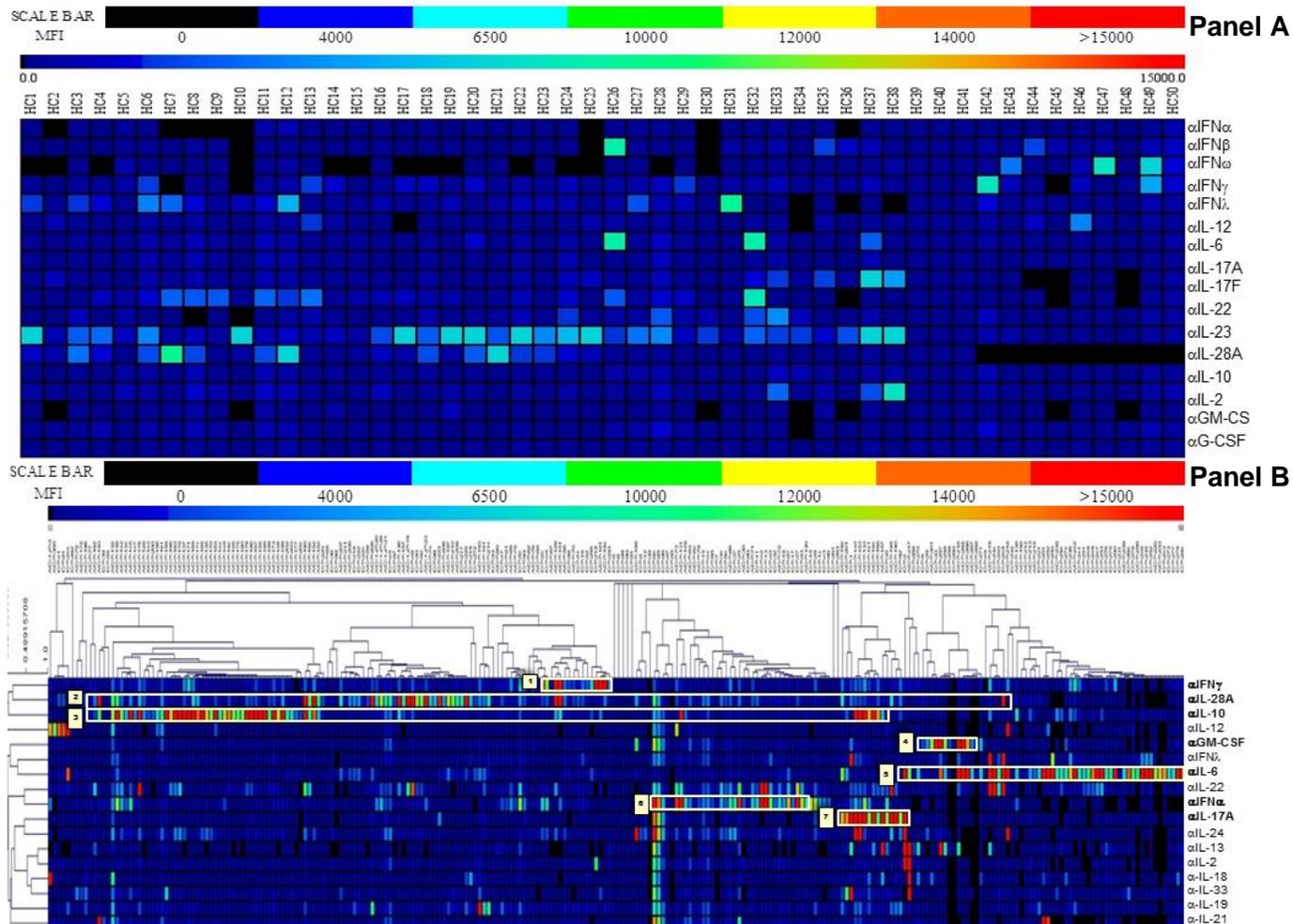


Figura 13. Mapa de calor con los valores promedio de intensidad de fluorescencia de autoanticuerpos contra citocinas detectados en muestras séricas de pacientes humanos. El eje X representa las muestras analizadas, mientras el eje Y los sistemas de citocinas. Un análisis de significancia de dos clases, muestra en recuadros blancos los auto-Ab's anti-citocina con alta significancia. **Panel A:** Pacientes con **AID/AUI** cuyo valor p fue ≤ 0.005 : **1)** anti-IFN γ ; **2)** anti-IL-28A; **3)** anti-IL-10; **4)** anti-GM-CSF; **5)** anti-IL-6; **6)** anti-IFN α ; **7)** anti-IL-17A. **Panel B:** Pacientes con **ID** cuyos auto-Ab's detectados resultaron estadísticamente significativos **1)** anti-IL-17F; **2)** anti-IL-6.

Para poder interpretar dicho análisis se empleó la clasificación de citocinas previa (caninos y equinos) considerando los tres principales grupos de citocinas: Interferones, citocinas producidas por Th17 y otras citocinas, correspondientes a la **Figura 14 A, B y C**, respectivamente.

Se identificaron respuestas positivas (estadísticamente significativas) de auto-Ab's anti-citocinas en los sueros de pacientes en comparación con el grupo control negativo, con los valores más bajos de *P* identificados para IFN α (**AID/AUI**, $p = 0.001$), (**AID/ID** $p = 0.00001$); IFN β (**AID/AUI**, $p = 0.002$); IFN ω (**AID/AUI**, $p = 0.001$); IFN γ (**AID/AUI**, $p = 0.00004$), (**AID/ID** $p = 0.00001$); IFN λ (**AID/AUI**, $p = 0.001$), (**ID**, $p = 0.00002$); IL-17A (**AID/ID**, $p = 0.00004$); IL-17F (**ID** $p = 0.00002$); IL-22 (**AID/AUI**, $p = 0.00003$); IL-6 (**AID**, $p = 0.001$), (**ID**, $p = 0.00001$); IL-28 (**ID**, $p = 0.00005$), IL-12 (**ID**, $p = 0.0001$); IL-10 (**AID/AUI**, $p = 0.0001$) y GM-CSF (**AID/AUI**, $p = 0.00001$).

En la **Figura 14, PANEL A** se muestran los resultados de la presencia de auto-Ab's contra interferones, en los sueros humanos analizados, en esta figura se mostró que auto-Ab's contra IFN γ presentan los valores más altos de MFI (≥ 15000), principalmente en el grupo de pacientes con enfermedades **AID/AUI**, seguido del grupo de **ID**. De un total de 133 pacientes con enfermedades **AID/AUI** solo 12 exhibieron auto-Ab's hacia IFN α y dos pacientes con **ID** mostraron auto-Ab's hacia IFN α , dos pacientes con **AID/AUI** exhibieron anticuerpos hacia IFN β ; un paciente con **AID/AUI** mostró auto-Ab's hacia IFN ω ; tres pacientes con **AID/AUI** y uno con **AID/ID** mostraron auto-Ab's hacia IFN λ .

Por otra parte, la presencia de auto-Ab's contra citocinas producidas por células Th17, mostró que los pacientes con **AID/AUI** ($n = 133$) exhibieron auto-Ab's contra IL-17F (6), IL-17A (1), IL-22 (4); en 29 pacientes con **ID** ($n = 126$) se detectaron auto-Ab's solamente hacia IL-17F (27) como se muestra en la **Figura 14, PANEL B**, en este mismo bloque de auto-Ab's anti-citocinas solo un paciente con **AID/ID** exhibió auto-Ab's hacia IL-17A/F e IL-22; mientras que solo un paciente del grupo **OD** presentó auto-Ab's hacia IL-17F.

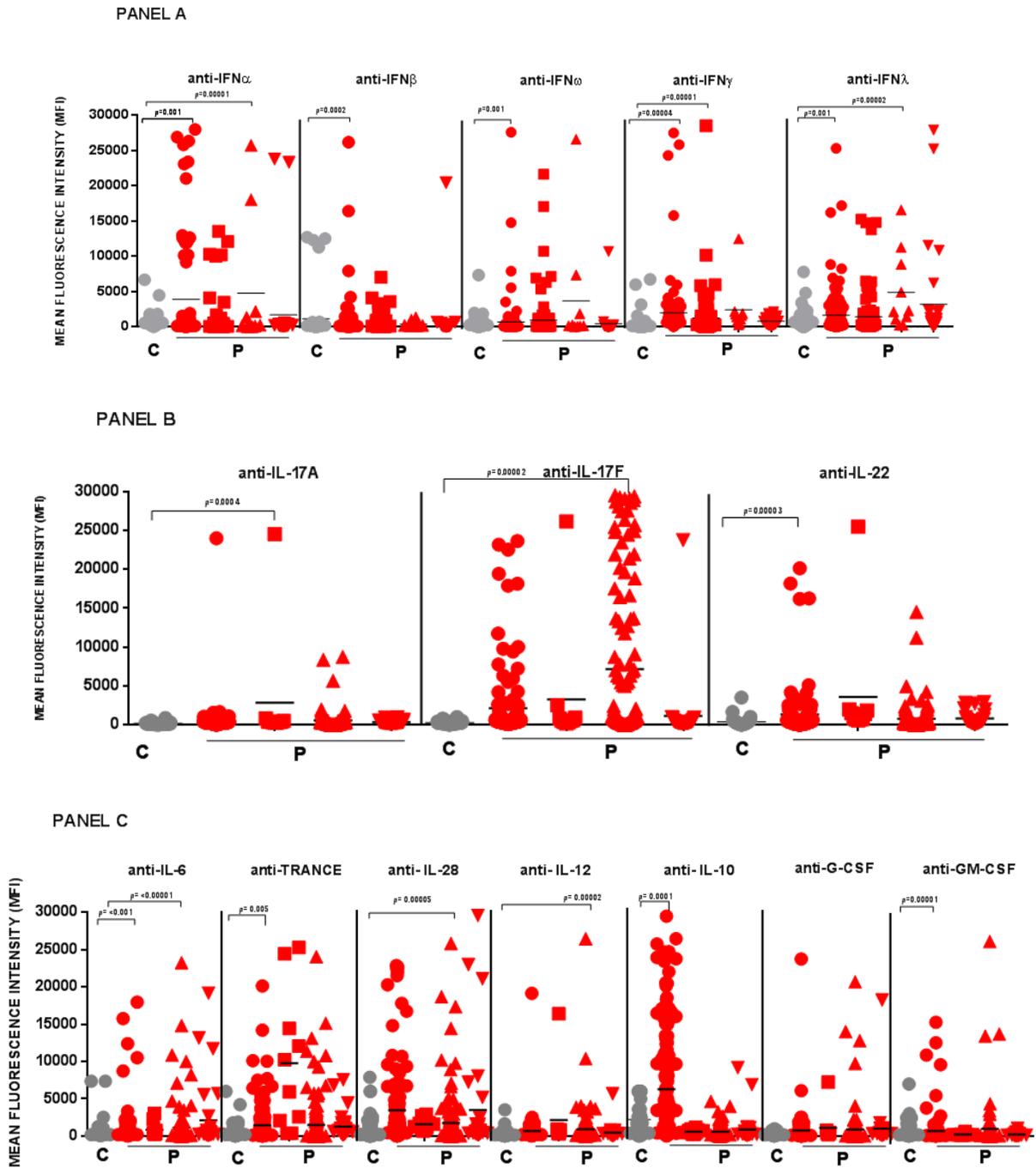


Figura 14. Autoanticuerpos anti-citocina detectados en muestras séricas de pacientes equinos e individuos clínicamente sanos. Los valores MFI se muestran para cada grupo de enfermedad, Controles sanos (●C, n = 50), Pacientes con enfermedad autoinmune/autoinflamatoria (●P-AID/AUI (n = 20), pacientes con enfermedad infecciosa (■P-ID, n = 30). Los valores MFI se indican como barras horizontales. Los valores *P* fueron calculados usando una prueba T Mann-Whitney U doble no pareada. **PANEL A:** Presencia de auto-Ab's contra Interferones-Tipo II (IFN γ) y Tipo III (IFN λ); **PANEL B:** auto-Ab's hacia citocinas TH17 (IL-17A, IL-17F, IL-21); **PANEL C:** auto-Ab's hacia otras citocinas (IL-6, IL-10).

Por otra parte, en la **Figura 14, PANEL C**, se pudo observar que los sueros de pacientes con **AID/AUI** presentaron altos niveles de auto-Ab's contra IL-6 (2) e IL-10 (1), mientras que dos muestras séricas de pacientes con **ID** presentaron auto-Ab's contra IL-6 (2), IL-28 (8) e IL-10 (23). En el grupo de pacientes con **AID/AUI**, dos sueros exhibieron niveles importantes de auto-Ab's hacia IL-6, seguido de los pacientes con **ID** (1); dos pacientes con **AID/AUI** mostraron auto-Ab's significativos hacia TRANCE; tres pacientes con **ID** mostraron auto-Ab's contra IL-28; solo un paciente con **ID** exhibió auto-Ab's contra IL-12; interesantemente, en 23 muestras séricas de pacientes con **AID/AUI** se detectaron auto-Ab's hacia IL-10.

6.5.3.4. Patrones complejos de autoanticuerpos anti-citocinas en humanos asociados a grupos de enfermedad específicos

El diverso repertorio de auto-Ab's detectados en sueros humanos de pacientes con diversos grupos de enfermedad sugiere una respuesta compleja no exclusiva de su enfermedad. Por lo que un análisis más detallado del conjunto de respuestas identificadas por auto-Ab's anti-citocinas encontrados en los pacientes es necesario. Por lo anterior, se pudieron identificar algunas especificidades en el patrón de respuesta de los cinco grupos de enfermedades en la población de estudio.

En el grupo de pacientes con **AID/AUI**, los pacientes fueron positivos a auto-Ab's significativos (> 15000 , $p = < 0.005$) hacia las citocinas producidas por células Th17: IL-22 (4), IL-17A (1) e IL-17F (6). Adicionalmente, los sueros de estos pacientes mostraron auto-Ab's hacia los interferones como IFN α (7), IFN β (2), IFN ω (1), IFN γ (4), IFN λ (3), hacia IL-6 (2) e IL-28 (8). Particularmente los pacientes con IBD mostraron auto-Ab's hacia IL-10 (23), mientras que solo tres de cinco sueros de pacientes con proteínosis alveolar pulmonar (PAP) exhibieron auto-Ab's hacia GM-CSF.

En el grupo de pacientes con **ID** ($n = 126$) que presentaron infecciones diseminadas con micobacterias tuberculosas ($n = 15$), ocho sueros exhibieron auto-Ab's hacia IFN γ ; mientras diferentes pacientes con **ID** por micobacterias no tuberculosas ($n = 20$) mostraron auto-Ab's hacia IFN β (1), IFN ω (2) e IFN λ (1). En humanos que cursaron con infección viral ($n = 20$) por Citomegalovirus y Herpes Zoster Virus ($n = 4$), dos pacientes mostraron auto-Ab's hacia IFN γ .

Los sueros de pacientes con **ID** que cursaron con infecciones bacterianas diseminadas por *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. Coli* y *Salmonella* (n = 40), mostraron que 15 individuos exhibieron auto-Ab's significativos hacia IL-6. Las muestras séricas de pacientes con infecciones fúngicas recurrentes presentaron valores considerables de auto-Ab's hacia IL-17F. Solo un paciente con tuberculosis (n = 15) exhibió auto-Ab's hacia IL-12. Uno de tres pacientes con PAP e infección fúngica mostró auto-Ab's hacia GM-CSF. En todos los pacientes con fibrosis quística se presentaron auto-Ab's hacia IL-17F, mientras que un paciente con enfermedad celiaca e infección fúngica (n = 3) mostró auto-Ab's hacia IFN ω e IFN λ .

Las muestras séricas de pacientes con **OD**, como endocrinopatía autoinmune, diabetes mellitus I y lupus eritematoso sistémico (n = 32), exhibieron una diversa respuesta de auto-Ab's contra IFN α , IFN ω , IFN λ e IL-28A. Los pacientes que cursaron con mutaciones genéticas e infecciones virales mostraron auto-Ab's diversos contra IFN α , IFN β , IFN ω e IL-17F. En algunas muestras séricas de pacientes con candidiasis mucocutánea crónica, enfermedad multiorgánica y timoma se encontraron auto-Ab's significativos hacia IL-17F e IL-12.

6.5.3.5. Validación de los perfiles de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas humanas de pacientes y controles negativos empleando el análisis de componentes principales

Debido a la complejidad de respuestas de auto-Ab's anti-citocina identificados en sueros humanos, se aplicó un PCA en las muestras séricas de pacientes y controles negativos que permitió observar dos respuestas notablemente diferentes frente a auto-Ab's anti-citocinas en ambos grupos. Se obtuvo un valor positivo de correlación ($r = 0.764$) entre el grupo de pacientes y el patrón de respuesta de auto-Ab's anti-citocinas detectado en las muestras séricas, confirmando una asociación importante entre los grupos de enfermedad y la respuesta específica de los auto-Ab's anti-citocina identificados (**Figura 15**).

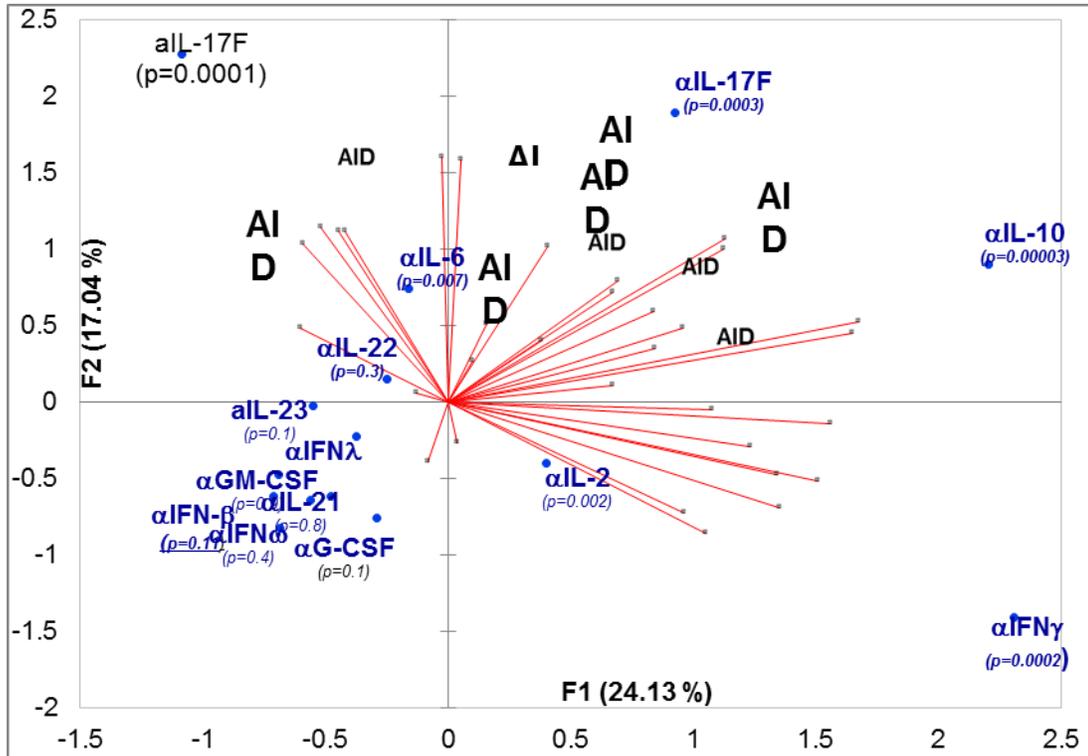
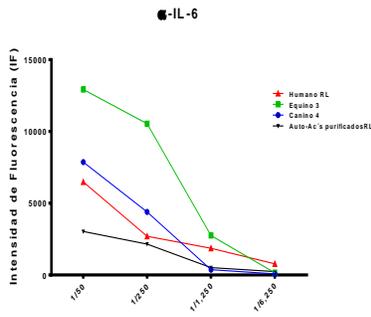


Figura 15. Descripción global de las respuestas de autoanticuerpos anti-citocinas en muestras séricas humanas de pacientes. Correlación de algunas de las muestras séricas de pacientes con altos niveles (MFI \geq 15000, n = 50) de auto-Ab's contra 15 citocinas, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (r); Los valores de $p \leq$ a 0.005 se consideraron estadísticamente significativos. Se representan dos grupos de enfermedad de la población de estudio: **AID y OD**.

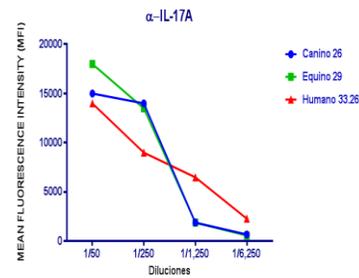
6.6. Determinación de los títulos de autoanticuerpos anti-citocinas en las muestras séricas de caninos, equinos y humanos mediante el ensayo de Luminex

A las muestras séricas de las diferentes especies que resultaron positivas a la presencia de auto-Ab's anti-citocina con un valor considerable de MFI (≥ 15000) se les determinó el título de éstos, empleando 6 diferentes sistemas citocina-microesfera (IL-6, IFN γ , IL-17A, IL-17F, IFN λ e IL-10) y cuatro diferentes diluciones quíntuples iniciando con la de 1/50 para cada una de las muestras séricas. Los valores MFI de cada dilución de sueros de pacientes se representan en la **Figura 16**, mientras que el valor del título determinado para las muestras séricas evaluadas se reportan en la **Tabla 19** del **Apéndice 1** (Datos totales no mostrados).

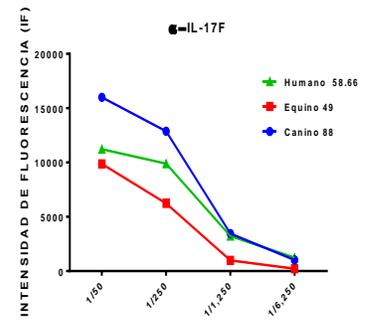
PANEL A



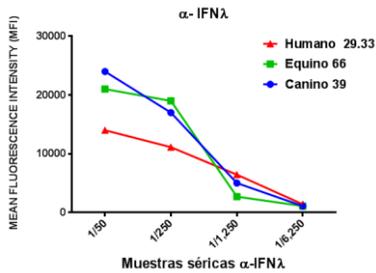
PANEL B



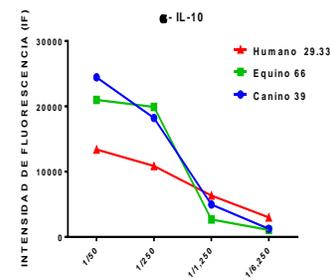
PANEL C



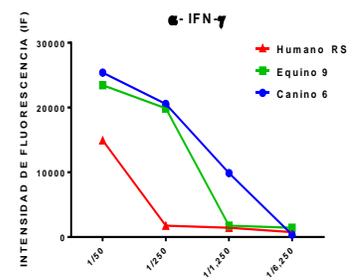
PANEL D



PANEL E



PANEL F



PANEL G

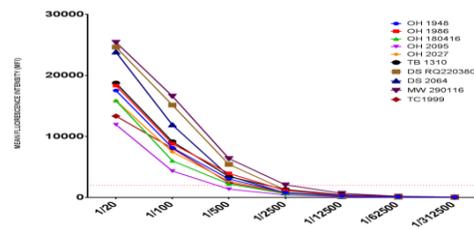


Figura 16. Valores promedio de intensidad de fluorescencia de algunas muestras séricas de pacientes en las tres diferentes especies. A partir de los sueros obtenidos en caninos, equinos y humanos, se realizaron cuatro diluciones quintuplas en la muestra sérica de cada individuo, se emplearon los seis diferentes sistemas citocina-microesfera. **PANEL A: auto-Ab's hacia IL-6; **PANEL B:** auto-Ab's anti-IL.17A; **PANEL C:** auto-Ab's anti-IL-17F; **PANEL D:** auto-Ab's hacia IFNλ; **PANEL E:** auto-Ab's anti-IL-10; **PANEL F:** auto-Ab's hacia IFNγ y **PANEL G:** diferentes muestras séricas humanas con auto-Ab's anti-IL-10.**

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

Se obtuvo la purificación de ocho muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ab's contra IL-6, seis muestras contra IFN γ y cuatro muestras contra IL-10 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 auto-Ab's anti-IFN γ , anti-IL-6 y anti-IL-10, empleando el ensayo de Luminex e incluyendo el sistema de BSA-microesfera como control negativo.

En la **Figura 17** se observan los resultados de la purificación de auto-Ab's contra IL-6 a partir de las muestras séricas RW261273 (**PANEL A**), RL250167 (**PANEL B**), NJ130978 (**PANEL C**) y HP180166 (**PANEL D**), las cuales fueron positivas a la presencia de auto-Ab's anti-IL-6, dichas muestras exhibieron valores altos e intermedios de MFI; el lado izquierdo de los paneles de esta **Figura 17** corresponde a la columna IL-6; las primeras dos barras muestran cada uno de los sueros originales ([S]) y las mismas muestras séricas pre-columna diluidas (S 1/2) positivos con valores de MFI considerables. En la fracción E (suero post-columna) de esta misma columna IL-6 se observa una disminución de los valores de MFI, lo que indica un bajo nivel de auto-Ab's contra IL-6 y de esta forma se demuestra que la mayoría de los auto-Ab's específicos para IL-6 se unieron a esta citocina acoplada a la columna IL-6. 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 auto-Ab's anti-IL-6 no se están uniendo de forma inespecífica a una proteína ajena como es la BSA. Los lavados de las dos columnas previos a la elución, corresponden a las fracciones de la F a la K, por lo que el valor MFI va disminuyendo para ambas.

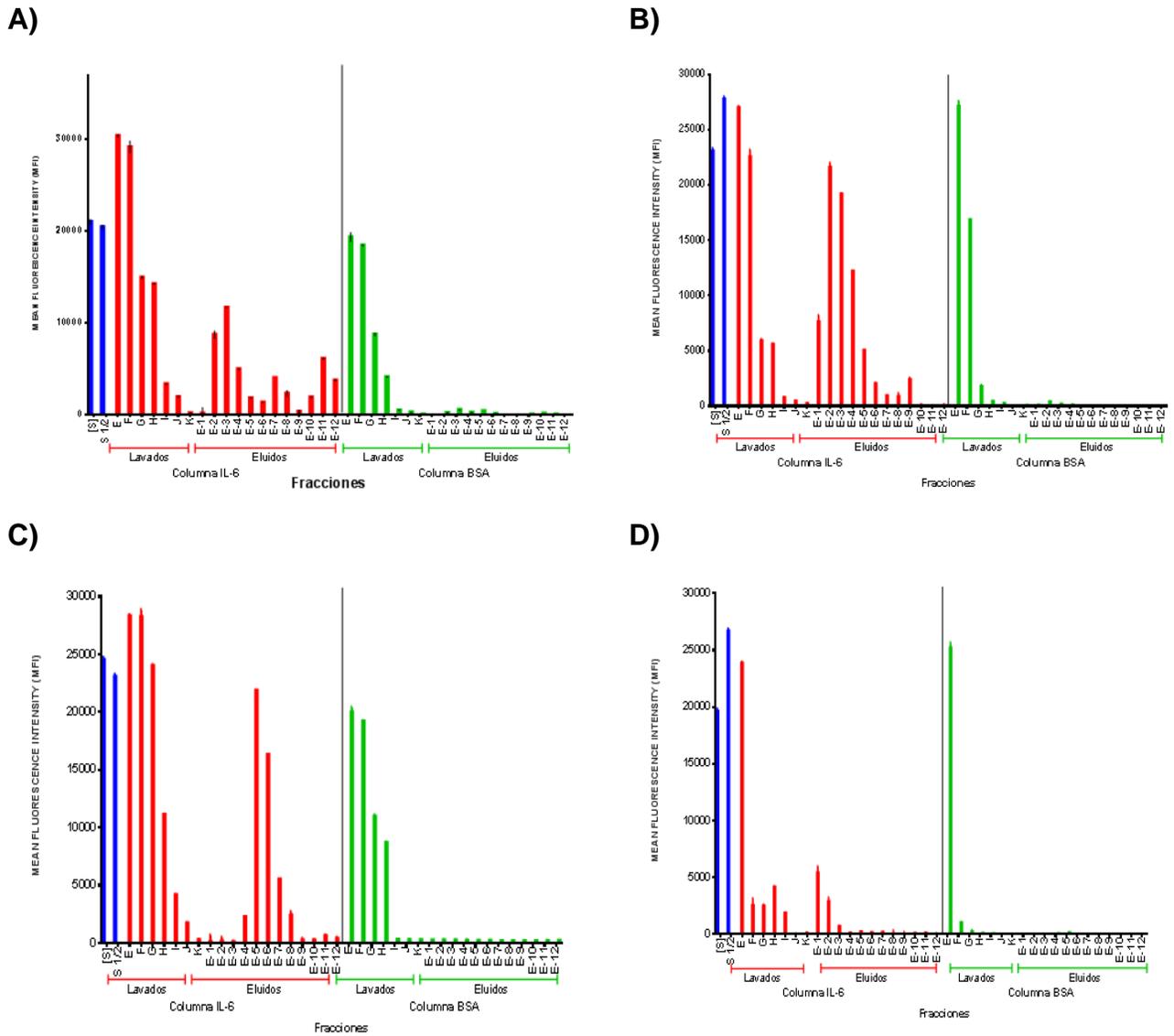


Figura 17. Purificación de autoanticuerpos anti-IL-6 de cuatro muestras séricas humanas mediante la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Valores MFI para las diferentes muestras séricas, fracciones de lavado y de elución, obtenidos por el ensayo de Luminex. **PANEL A:** Fracciones correspondientes al suero RW261273. **PANEL B:** Fracciones correspondientes al suero RL250167. **PANEL C:** suero NJ130978; **PANEL D:** Suero HP180166. Todas las fracciones se trabajaron por duplicado empleando una dilución de 1/100.

En los eluidos de E-1 a E-7 el enlace antígeno-anticuerpo se rompe con el empleo del buffer de elución (pH 2.8), por lo tanto, el primer eluido de la columna-IL-6 dió un valor alto de MFI (indicando el desprendimiento de los auto-Ab's de la 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-anticuerpo y por lo tanto en los eluidos E-8, E-9 y E-10 es donde sucedió un incremento en los valores de MFI comparado con E-7, observándose este efecto únicamente en la muestra sérica (RW261293, **PANEL A**); en cambio los valores MFI para todos los eluidos de la columna de BSA fueron negativos debido a que nunca ocurrió la unión antígeno-anticuerpo anti-IL-6. En el caso de la purificación de auto-Ab's anti-IL-6 para las otras cuatro muestras séricas humanas, todas tuvieron un comportamiento similar (resultados no mostrados).

La **Figura 18** corresponde a la purificación de auto-Ab's contra IFN γ a partir de dos diferentes sueros positivos a la presencia de éstos, W.V.120884 (**PANEL A**) y W.A.110665 (**PANEL B**) donde se observó un comportamiento similar a lo descrito en el párrafo anterior. En forma particular, durante el proceso de elución a partir del cambio de pH en la fracción E-8 se observó que se obtuvo más cantidad de auto-Ab's anti-IFN γ empleando un pH más ácido (pH 2.0), este hallazgo solo se observó en las dos muestras séricas mencionadas, mientras que las cuatro muestras restantes purificadas no presentaron este último comportamiento (resultados no mostrados).

De la misma forma, se graficaron los resultados obtenidos en las muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ab's hacia IL-10. La primer muestra con código AM220456 (**Figura 18, PANEL C**) y otra muestra DS291272 (**Figura 18, PANEL D**). Dichos sueros exhibieron moderados niveles de auto-Ab's hacia IL-10, obteniendo las fracciones con valores MFI considerables de los auto-Ab's purificados en los eluidos E-3, E-4, E-5 y E-6. No presentando diferencias cuando se redujo aún más el pH del buffer de elución. Mientras en la **Figura 19, PANEL A** el suero SW180981 y **PANEL B**, el suero TB21075 correspondiente a muestras con auto-Ab's hacia IL-10, donde de forma importante se obtienen valores MFI considerables en los eluidos E-1 y E-2. Así mismo, en la columna de BSA no se presentaron valores considerables MFI, por lo que se confirma la especificidad de la unión de los auto-Ab's hacia su citocina acoplada, más no a una proteína ajena como la BSA.

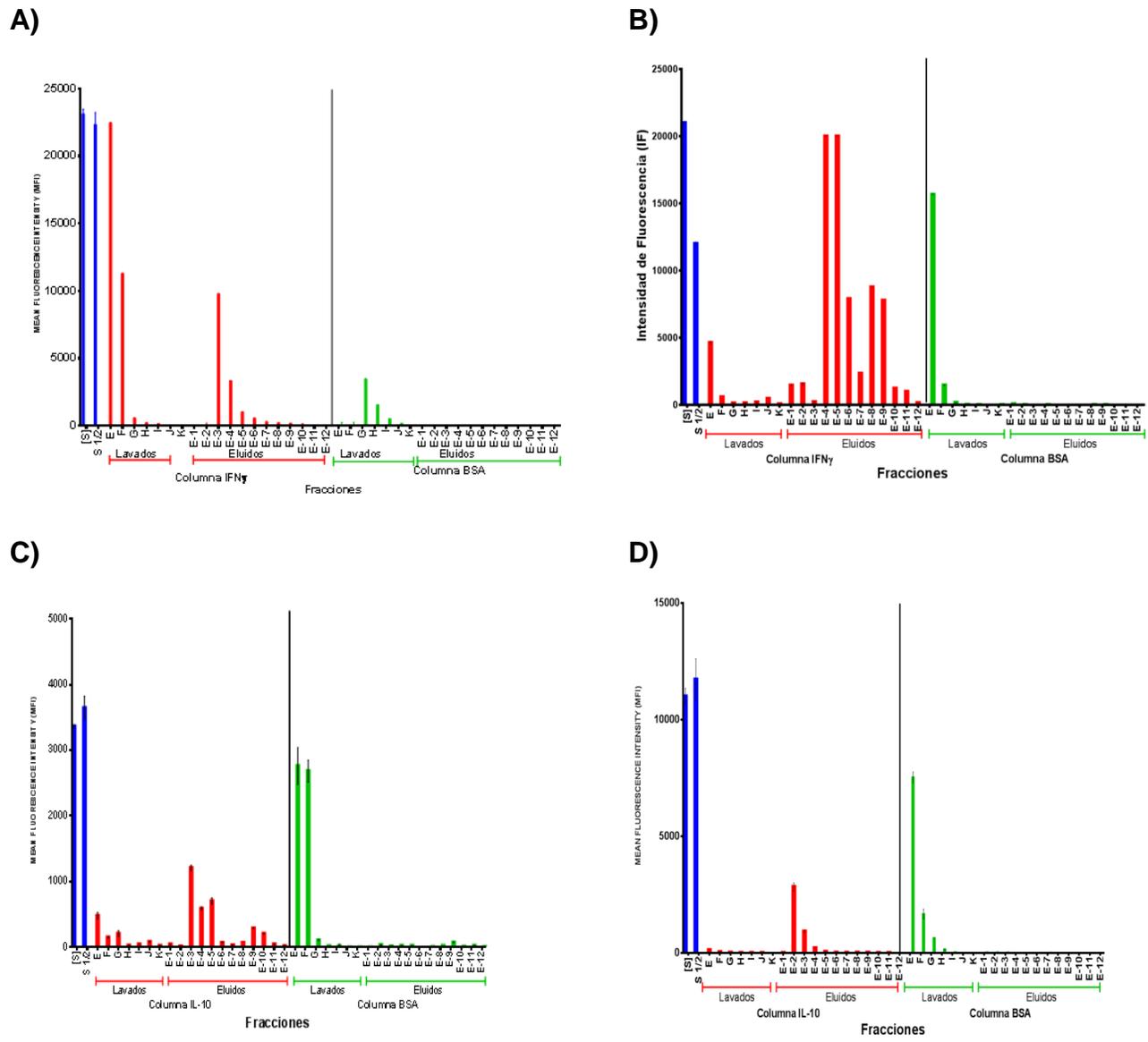
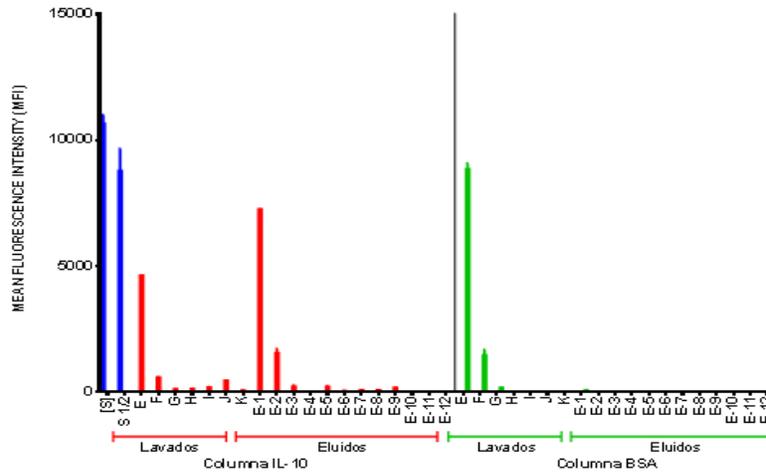


Figura 18. Purificación de autoanticuerpos anti-IFN γ e IL-10 de cuatro muestras séricas humanas. Valores MFI para las diferentes muestras séricas, fracciones de lavado y de elución, obtenidos por el ensayo Luminex. **PANEL A:** Fracciones correspondientes de la purificación de auto-Ab's hacia IFN γ del Suero W.V.120884 y W.A.110665 (**PANEL B**). Mientras que los sueros de pacientes con anticuerpos hacia IL-10 se representan en el **PANEL C** (AM220456) y **PANEL D** (DS291272). Todas las fracciones se trabajaron por duplicado empleando una dilución de 1/100.

A)



B)

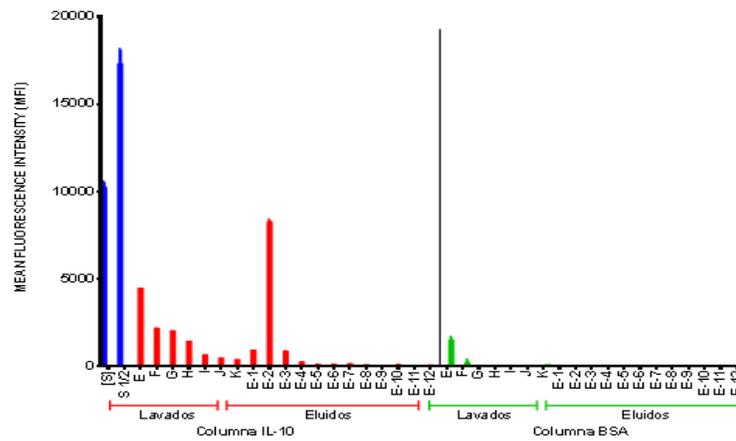


Figura 19. Purificación de autoanticuerpos anti-IL-10 en dos muestras séricas humanas empleando la técnica de cromatografía de afinidad por columna. Se purificaron muestras séricas y se representaron los valores MFI de las fracciones de lavado y de elución obtenidos por el ensayo Luminex. **PANEL A:** Fracciones correspondientes a la purificación de auto-Ab's hacia IL-10 en el suero SW180981 y. **PANEL B:** Suero TB210759. Todas las fracciones se trabajaron por duplicado empleando una dilución de 1/100.

6.8. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-IFN γ en la función biológica de la fosforilación de STAT-1 mediada por IFN γ en muestras humanas

Para los ensayos de inhibición de la fosforilación de STAT-1 regulada por IFN γ , se evaluaron seis muestras séricas humanas y sus respectivos purificados. Los resultados del ensayo de inhibición correspondientes a la muestra (R.S.54.46.47) y su respectiva fracción (Pool E1-E4) de auto-Ab's purificados se presentan en la **Figura 20**. Los valores MFI indican los niveles de fosforilación de STAT-1, mostrando que en las células estimuladas con rHu-IFN γ en ausencia del auto-Ab, empleando un suero negativo (**HC**) a la presencia de auto-Ab's anti-IFN γ (barra color azul) o el medio de cultivo RPMI-C (barra verde) efectivamente se induce la fosforilación de STAT-1, observando también que el nivel de fosforilación de este factor de transcripción es proporcional a la concentración de citocina utilizada para la estimulación. En caso contrario, los valores MFI reportados para el Ab comercial (barra café) demuestran un efecto de inhibición de la fosforilación de STAT-1; así mismo se puede observar dicha neutralización al preincubar con la muestra sérica positiva a auto-Ab's contra IFN γ (barra roja) y su purificado (barra amarilla), apreciando la disminución de los niveles de fosforilación en las dos concentraciones de rHu-IFN γ empleadas, principalmente en la concentración de 2 ug/mL. En dos muestras más (W.V.120884 y W.A.110665) se observó un efecto similar de inhibición de la fosforilación de STAT-1 empleando tanto la muestra sérica como el auto-Ab purificado, mientras que las tres muestras restantes purificadas no presentaron este último comportamiento (resultados no mostrados).

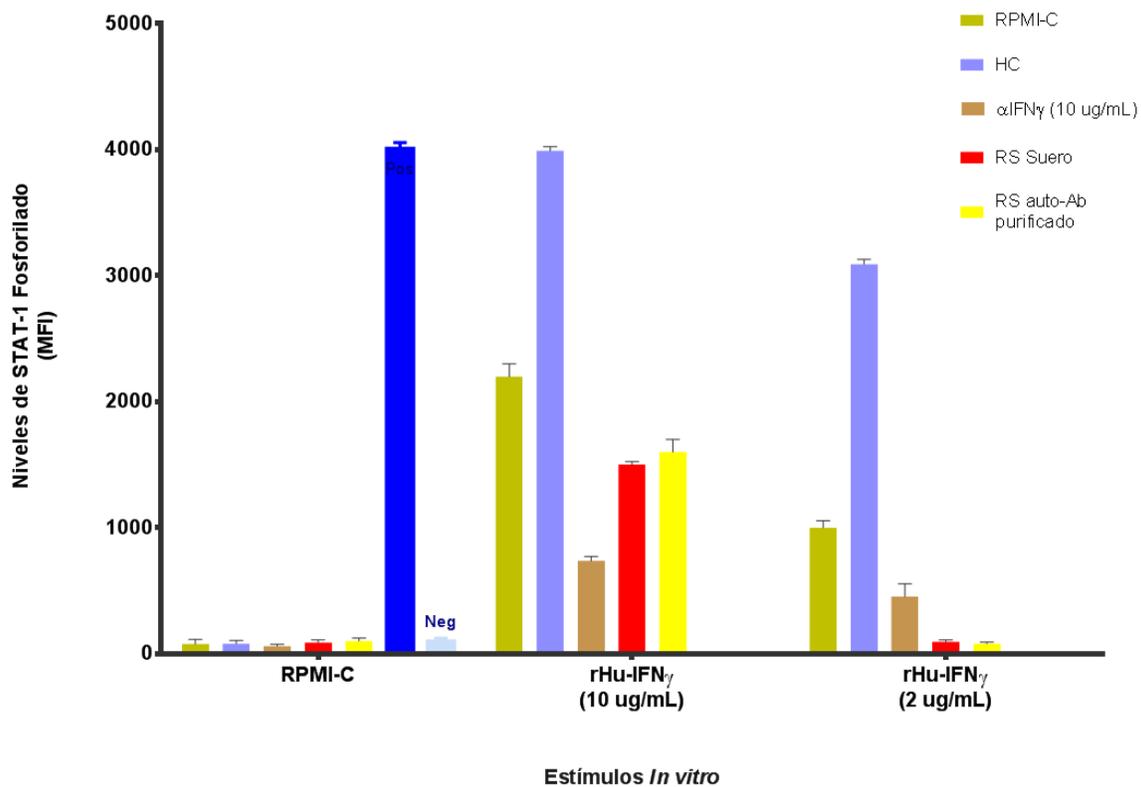


Figura 20. Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-1 inducida por IFN γ . Los niveles de fosforilación de STAT-1 fueron determinados en lisados celulares de PBMC's estimuladas con rHu-IFN γ en dos concentraciones preincubadas con ■ medio (RPMI-C); ■ Suero negativo a auto-Ab's anti-IFN γ (control negativo), ■ anticuerpo comercial anti-IFN γ ; ■ suero positivo a la presencia de auto-Ab's anti-IFN γ ; ■ auto-Ab purificado positivo a la presencia de auto-Ab's anti-IFN γ ; ■ control positivo del kit comercial; ■ control negativo del kit comercial.

6.9. Actividad neutralizante de autoanticuerpos anti-IL-6 en la función biológica de la fosforilación de STAT-3 mediada por IL-6

Para los ensayos de inhibición de la fosforilación de STAT-3 regulada por IL-6, se evaluaron ocho muestras séricas humanas y sus respectivos purificados. Los resultados del ensayo de inhibición correspondientes a las muestras RL250167 y RW120693 con sus respectivas fracciones de auto-Ab's purificados se presentan en la **Figura 21, PANEL A**. Los valores MFI indican los niveles de fosforilación de STAT-3, mostrando que en las células estimuladas con rHu-IL-6 en ausencia del auto-Ab, empleando un suero negativo a la presencia de auto-Ab's anti-IL-6 (barra color azul) o el medio de cultivo DMEM-S (barra verde) efectivamente se induce la fosforilación de STAT-3, observando también que el nivel de fosforilación de este factor de transcripción es proporcional a la concentración de citocina utilizada para la estimulación. En contraste, los valores MFI reportados para el Ab comercial (barra café) demuestran un efecto de inhibición de la fosforilación de STAT-3; así mismo se puede observar dicha neutralización al preincubar con las muestras séricas positivas a la presencia de auto-Ab's contra IL-6 (barra roja), apreciando la disminución de los niveles de fosforilación de STAT-3 principalmente en la concentración de 10 ng/mL de rHu-IL-6. Por otra parte, tres diferentes muestras séricas y sus auto-Ab's purificados se evaluaron empleando rHu-IL-6 a una concentración óptima (10 ng/mL), observando un considerable porcentaje de inhibición de la fosforilación de STAT-3 en comparación con el control positivo y los controles negativos; es importante mencionar que los sueros y sus auto-Ab's purificados exhibieron diferentes grados de inhibición de la fosforilación de STAT-3 y se representan gráficamente en la **Figura 21, PANEL B**. En tres muestras restantes (NJ13087, DM090549, SJ210509) se observó un efecto similar de inhibición de la fosforilación de STAT-3 empleando tanto el suero como el auto-Ab purificado (resultados no mostrados).

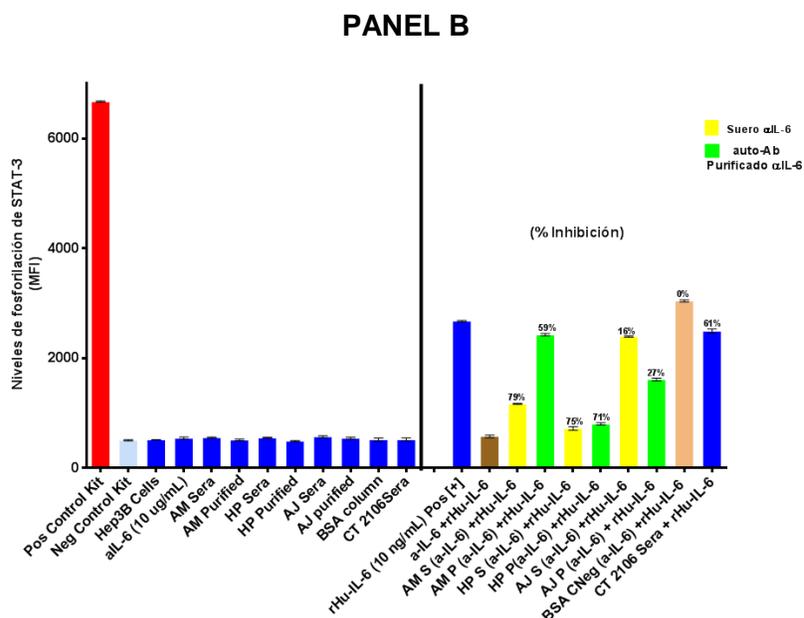
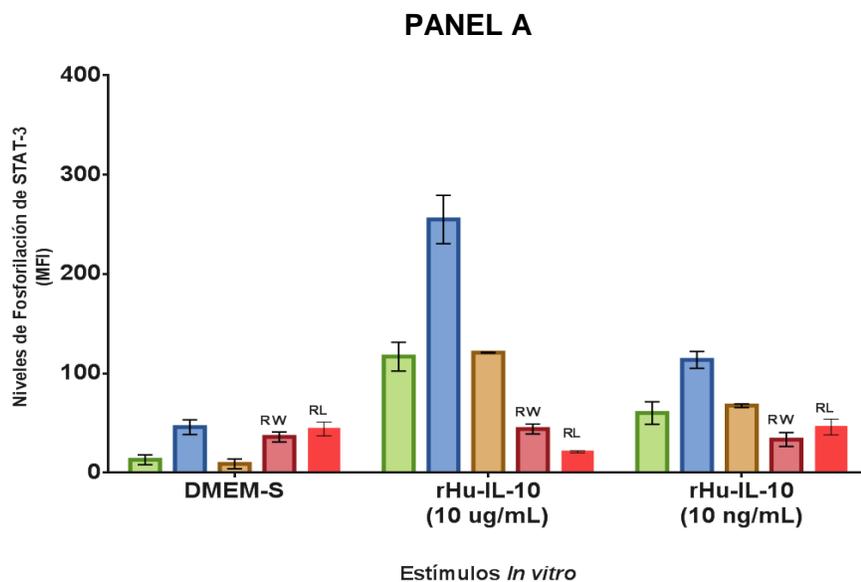


Figura 21. Ensayo de inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-6. PANEL A, los niveles de fosforilación de STAT-3 fueron determinados en lisados de células Hep3B estimuladas con rHu-IL-6 en las dos concentraciones (10ug y 10 ng/mL) preincubadas con medio (DMEM-S); Suero negativo a anti-IL-6 (control negativo), anti-IL-6 (control positivo, Sueros positivos a la presencia de auto-Ab's anti-IL-6). **PANEL B,** Ensayo optimizado de inhibición de la fosforilación de STAT-3 empleando la citocina rHu-IL-6 a una concentración de 10 ng/mL; también se representan muestras séricas (n = 3) y sus auto-Ab's purificados (n = 3).

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

Para los ensayos de inhibición de la fosforilación de STAT-3 regulada por IL-10, se evaluaron cuatro muestras séricas humanas y sus respectivos auto-Ab's purificados. Los resultados del ensayo de inhibición de la fosforilación correspondientes a la muestra sérica (DS230286) y su respectiva fracción de auto-Ab's purificados se presentan en la **Figura 22, PANEL A**. Se grafican los valores MFI que indican los niveles de fosforilación de STAT-3, mostrando que en las células estimuladas con rHu-IL-10 en ausencia del auto-Ab, empleando un suero negativo a la presencia de auto-Ab's anti-IL-10 (barra color azul) o el medio de cultivo DMEM-S (barra verde), efectivamente se induce la fosforilación de STAT-3, observando también que el nivel de fosforilación de este factor de transcripción es proporcional a la concentración de citocina utilizada para la estimulación. Por otra parte, se puede observar que los auto-Ab's contra IL-10 contenidos en las muestras séricas (barra roja) ocasionaron un efecto de inhibición en las diferentes concentraciones de rHu-IL-10 que se emplearon, dicha neutralización en la mayoría de las muestras es inclusive mayor que la causada por el anticuerpo comercial (barra café). Adicionalmente, todas las muestras séricas y sus auto-Ab's purificados se evaluaron empleando la citocina rHu-IL-10 a una concentración óptima (10 ng/mL). Los diferentes grados de inhibición de la fosforilación de STAT-3 se compararon con el control positivo y los sueros de pacientes con ausencia de auto-Ab's hacia IL-10 (**PANEL B**).

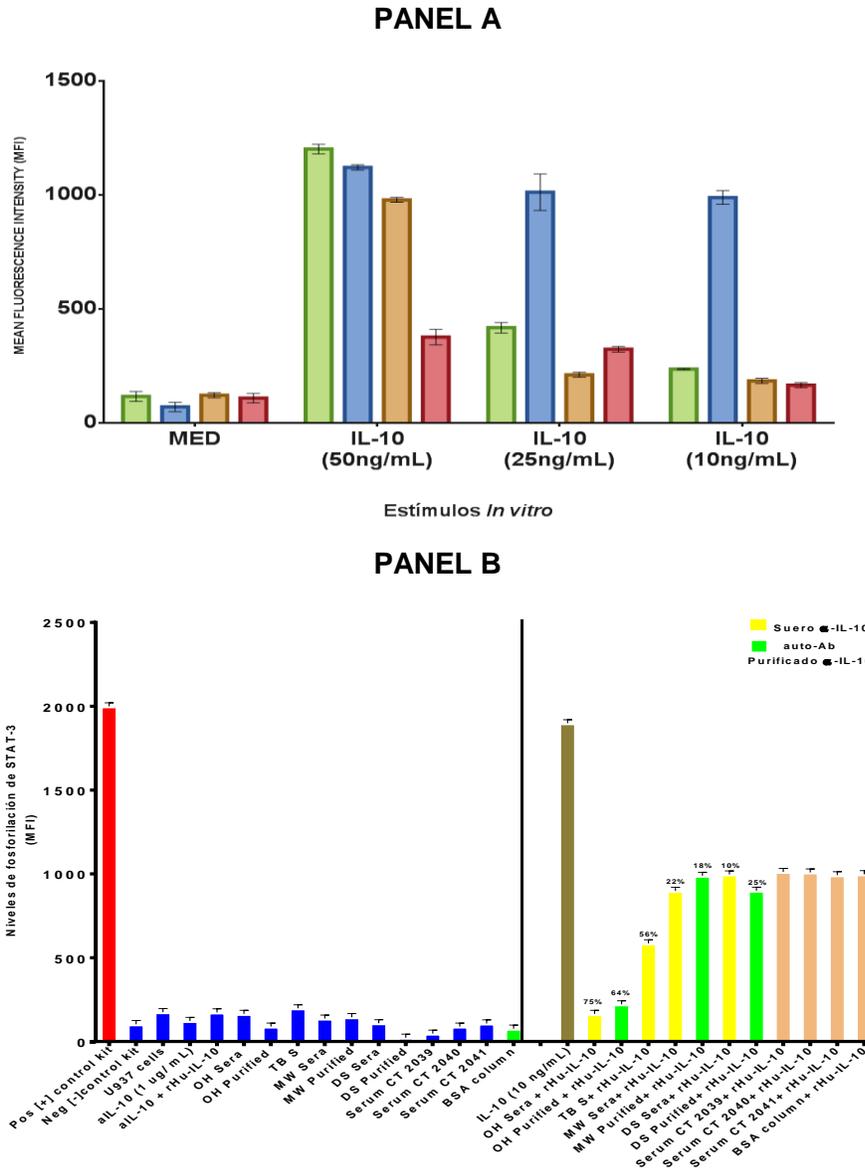


Figura 22. Ensayo inhibición de la fosforilación de STAT-3 inducida por IL-10. PANEL A: Los niveles de fosforilación de STAT-3 fueron determinados en lisados de células U937 estimuladas con rHu-IL-10 en las tres concentraciones y preincubadas con medio ■ DMEM-S; ■ suero negativo a anti-IL-10 (control negativo), ■ rHu-IL-10 y control positivo, ■ Suero D.S.291272 positivo a la presencia de auto-Ab's anti-IL-10. **PANEL B:** Se representan las cuatro muestras séricas con los porcentajes de inhibición de la fosforilación de STAT-3, donde los valores MFI de cuatro ■ sueros positivos a auto-Ab's anti-IL-10 y sus respectivos ■ auto-Ab's purificados, se compararon con ■ controles negativos y el ■ control positivo del ensayo. Todas las muestras se trabajaron por duplicado.

6.11. Evaluación de la función neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6 sobre la inhibición de la producción de Proteína C Reactiva mediada por IL-6 empleando la técnica de Luminex

Para los ensayos de inhibición de la producción de CRP se emplearon seis muestras séricas humanas y sus respectivos purificados. Dicha evaluación permitió estudiar la habilidad de los auto-Ab's anti-IL-6, contenidos en las muestras de pacientes, para bloquear la producción de esta proteína. A pesar de que se realizó la determinación de las concentraciones de CRP utilizando una curva patrón (resultados no mostrados), para este análisis se emplearon los valores MFI obtenidos. Los resultados del ensayo de inhibición se muestran en la Figura 23, donde de forma general se pudo apreciar que los auto-Ab's anti-IL-6 contenidos en el suero y purificado del paciente RL250167 no bloquearon la producción de CRP, mientras que las otras cinco muestras evaluadas abrogaron su producción, empleando tanto el suero completo como los auto-Ab's purificados. Por lo tanto, los auto-Ab's anti-IL-6 contenidos en las muestras evaluadas poseen una función neutralizante e inhiben la producción de CRP. Adicionalmente, los bioensayos *in vitro* reportados previamente mostraron que algunas muestras tenían la capacidad de neutralizar la función de IL-6 a través de la inhibición de la fosforilación de STAT-3 mediada por esta citocina y de forma dependiente bloquear la producción de CRP. Los resultados mostraron un aumento en la producción de CRP cuando la línea celular Hep3B se estimuló con rHu-IL-6, esta producción se anuló mediante la adición de sueros y auto-Ab's purificados de pacientes que contenían auto-Ab's anti-IL-6, por lo tanto, si el anticuerpo abroga la producción de CRP comparada con el control, entonces este auto-Ab es neutralizante, estos resultados sugieren que los auto-Ab's de algunas muestras se unen y bloquean a la IL-6, lo que conduce a una falta de señalización y, por lo tanto, reduce la producción de CRP en las células. Este hallazgo apoya los resultados anteriores, donde se observó un efecto neutralizante por parte de los auto-Ab's anti-IL-6 en la inhibición de la fosforilación de STAT-3.

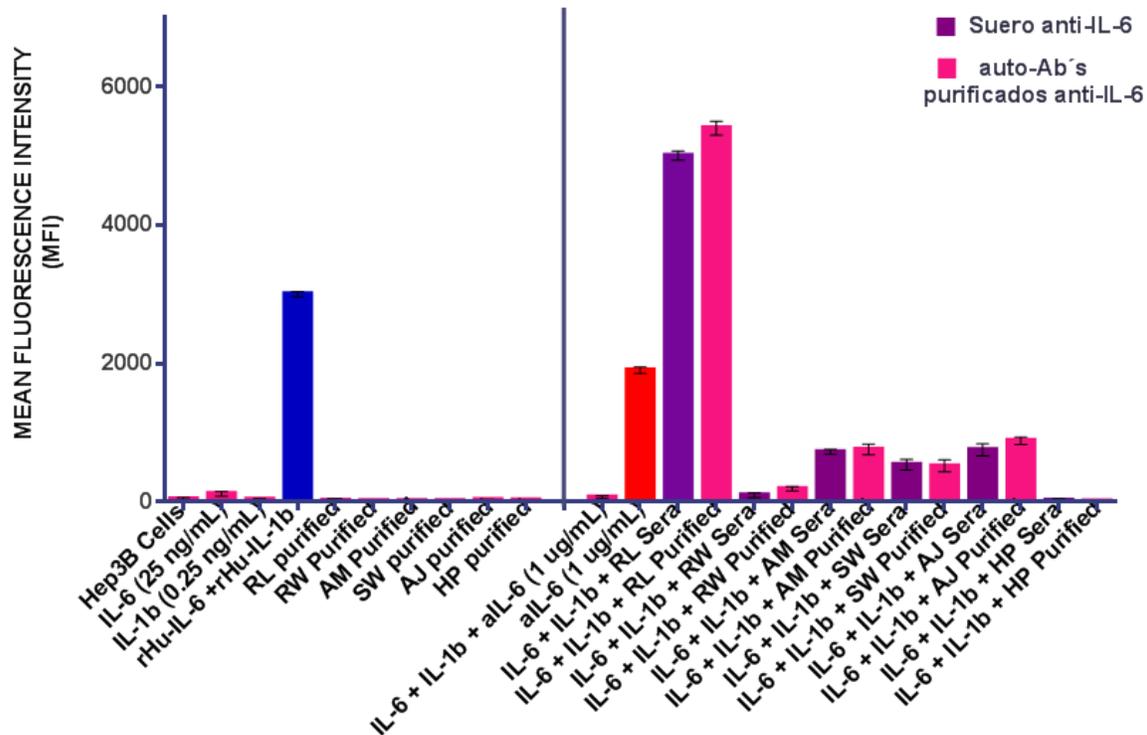


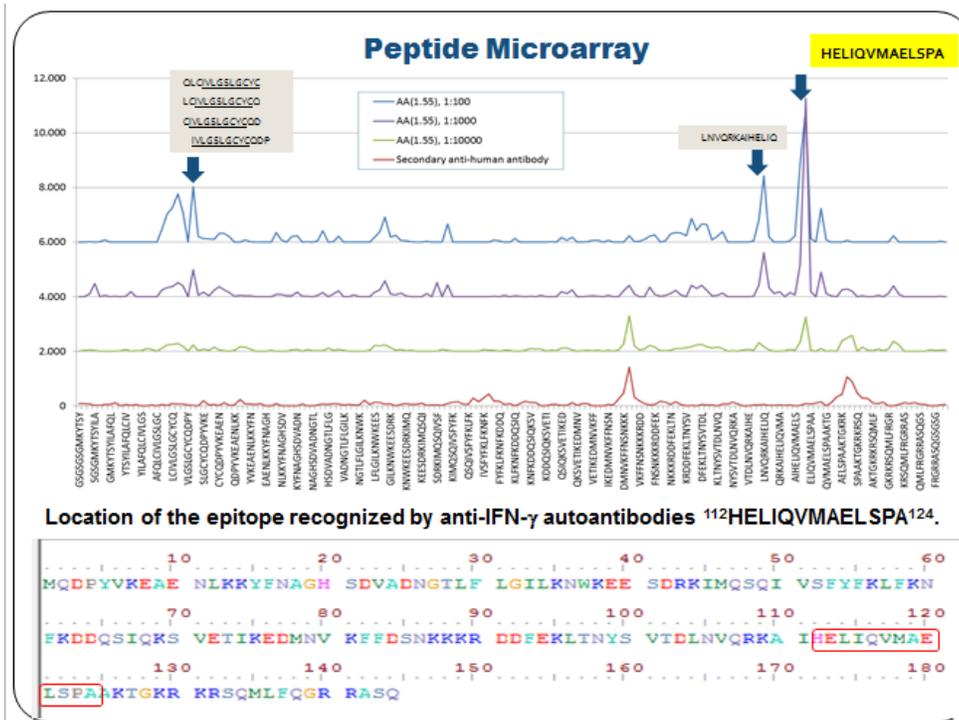
Figura 23. Producción de CRP en diferentes muestras positivas a la presencia de autoanticuerpos anti-IL-6. Se presentan los valores MFI, que indican los niveles de producción de CRP determinados en lisados de células Hep3B (7.5×10^7 cel/mL) estimuladas con rHu-IL-6 (25 ng/mL) y rHu-IL-1 β (0.25 ng/mL), donde se emplearon sueros positivos a auto-Ab's anti-IL-6 y sus auto-Ab's purificados respectivos, además del anticuerpo comercial IL-6 (barra roja), las barras rosas corresponden a diferentes muestras séricas (n = 6) y las moradas a los auto-Ab's purificados (n = 6).

6.12. Análisis de los epítomos reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ

Para identificar el epítomo reconocido por los auto-Ab's anti-IFN γ presentes en el suero del paciente humano AA (1.55), se realizó un escaneo de péptidos utilizando microarreglos de proteínas que cubrían 168 aminoácidos (aa) diferentes de la secuencia completa de IFN γ humano. Los resultados mostraron que el auto-Ab de esta muestra reaccionó con dos péptidos distintivos, el primero 112 HELIQVMAELSPA 124 con una intensidad de señal elevada, mientras que con el segundo 104 LNVQRKAIHELIQ 116 , la señal fue de menor intensidad. El análisis *in silico* utilizó la base de datos GenBank y el Programa Bioedit®, para analizar, reconocer y comparar la secuencia (112 HELIQVMAELSPA 124) identificada en el microarreglo peptídico; la alineación de secuencias de proteínas confirmó que el epítomo reconocido por los auto-Ab's anti-IFN γ en el suero del paciente, se localizó entre los aa 112 y 124 (**Figura 24, PANEL A**). Este análisis confirmó que el epítomo de interés está situado dentro de la secuencia del IFN γ humano, así como en otras cinco especies diferentes que fueron comparadas, donde estos aa están relativamente conservados entre diferentes especies (**Figura 24, PANEL B**).

En el presente estudio, (**Figura 25, PANEL A**). Por otra parte, se construyó el modelaje molecular de interacción entre la estructura de IFN γ y el epítomo de interés utilizando la base de datos de <https://swissmodel.expasy.org/> y el programa PyMOL®, este modelo mostró la interacción del receptor 1 del IFN γ (IFNGR1) formando una estructura intermedia bivalente estable del complejo 1: 1: 2, en conjunto con un ligando de unión con el segundo receptor a la cadena del receptor 2 del IFN γ (IFNGR2), produciendo el complejo de señalización activo 1: 2: 2 (Esquema no mostrado). Por lo tanto, dicha interacción permite sugerir una función biológica neutralizante de los auto-Ab's anti-IFN γ contenidos en la muestra sérica sobre la actividad biológica de dicha citocina, donde la interacción de los auto-Ab's con el epítomo 112 HELIQVMAELSPA 124 parece neutralizar la función biológica del IFN γ humano.

PANEL A



PANEL B

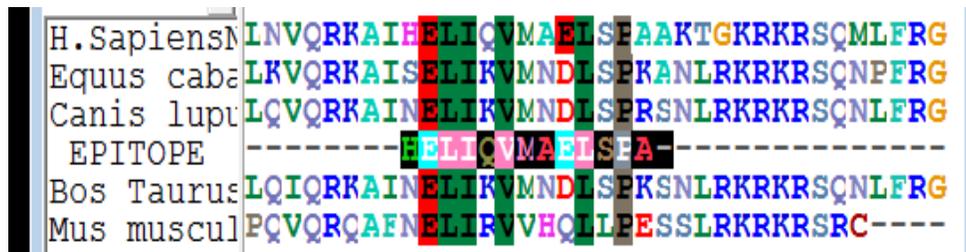
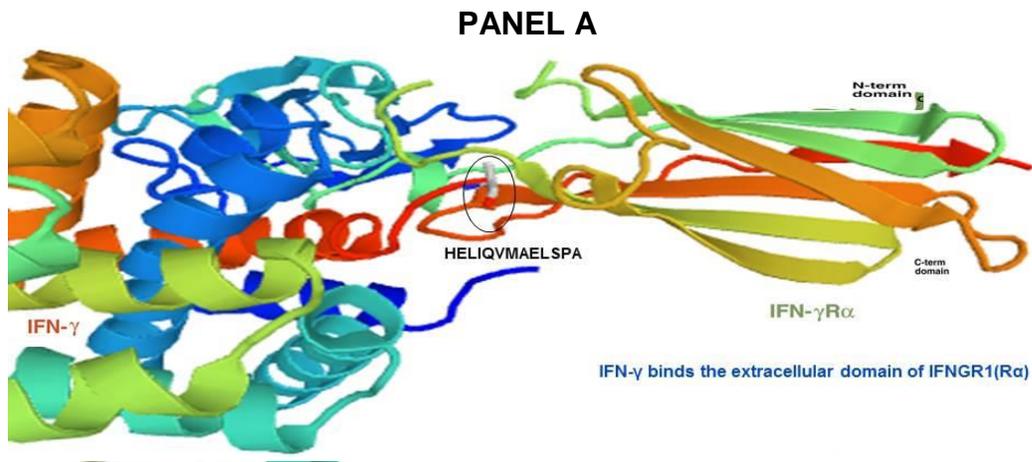


Figura 24. Mapeo de epítomos sintetizados a partir de microarreglos peptídicos comerciales. **PANEL A:** Microarreglos de péptidos, el empleo de programas bioinformáticos identificó y comparó la secuencia peptídica (112 HELIQVMAELSPA 124) encontrada en el microarreglo con la secuencia completa del IFN γ incluida entre los aa 112 y 124. **PANEL B:** Alineación múltiple de la secuencia de aa del IFN γ en cinco diferentes especies y el epítipo principal (112 HELIQVMAELSPA 124) reconocido por los auto-Ab's anti-IFN γ contenidos en la muestra sérica humana. Los residuos conservados en otras especies están representados en cajas de colores. La secuencia del epítipo se resalta y el aa 113 ELI-V- - EL-P 124 está subrayado y se considera de tipo aromático (C).

Por otra parte, empleando el programa MEGA 6.0® se realizó la comparación de secuencias peptídicas entre el epítipo de interés (112 HELIQVMAELSPA 124) para identificar si este epítipo era compartido con otros microorganismos, dicho análisis mostró una homología de 69% con la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) RefSeq: PDB 3S9I_A (YDFVVAELSTPQ), esta región mantiene sitios conservados de aa de tipo aromáticos en sitios cruciales que le confieren funcionalidad sobre su estructura conformacional (**Figura 25, PANEL B**).

Adicionalmente, se realizó una comparación con el epítipo EE-IFN- γ (123 SPAAKTGKRK 131) identificado en un paciente que presentó auto-Ab's anti-IFN γ y una enfermedad micobacteriana asociada (Lin *et al.*, 2014), dicho epítipo se localizó cerca del sitio del epítipo identificado en el presente trabajo (112 HELIQVMAELSPA 124), a pesar de que los aa no son iguales, ambos epítopos están situados dentro de la región de aa 121 a 145 cuya posición representa una superficie altamente inmunogénica por la naturaleza química de los aa (**Figura 26**).



Representación modelo IFN- γ -IFNGR1 SWISS MODEL®



PANEL B

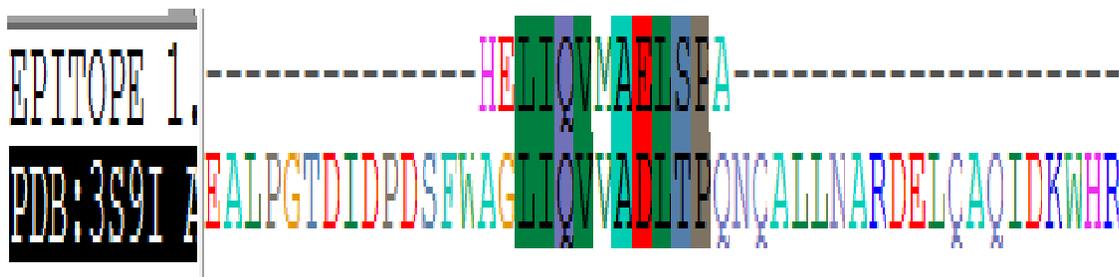


Figura 25. Representación gráfica obtenida mediante PDB® del epítipo principal con la estructura del IFN γ . En el **PANEL A** se muestra la unión del IFN γ a su receptor a través de la herramienta de Modelaje Molecular Swiss Model®. Estructura gráfica del complejo IFN γ -IFNGR1 mediante la proyección 3D generada por SWISS-MODEL® (<http://swissmodel.expasy.org>) **AwZ2QB** y construida en PyMOL®, donde el acoplamiento molecular permitió evaluar la interacción del epítipo de interés ¹¹²HELIQVMSPA¹²⁴ con el complejo de IFN γ -IFNGR1, dicha proyección confirmó la unión entre el IFNGR1 (aa 303 a 313) y el epítipo identificado ¹¹²HELIQVMSMS¹²⁴. El **PANEL B** corresponde a un análisis adicional entre el epítipo principal (¹¹²HELIQVMAELSPA¹²⁴) y la secuencia de IFN γ , esto se realizó utilizando MEGA 6.0®, la simulación identificó que dicho epítipo posee una homología de 69% con la secuencia de *Mycobacterium tuberculosis* (MtB) Cadena A RefSeq. PDB 3S9I_A (⁹⁸AGLIQVVADLTPQ), a pesar de mostrar cambios en algunos aa.

6.13. Mapeo de epítomos reconocidos por autoanticuerpos anti-IL-6

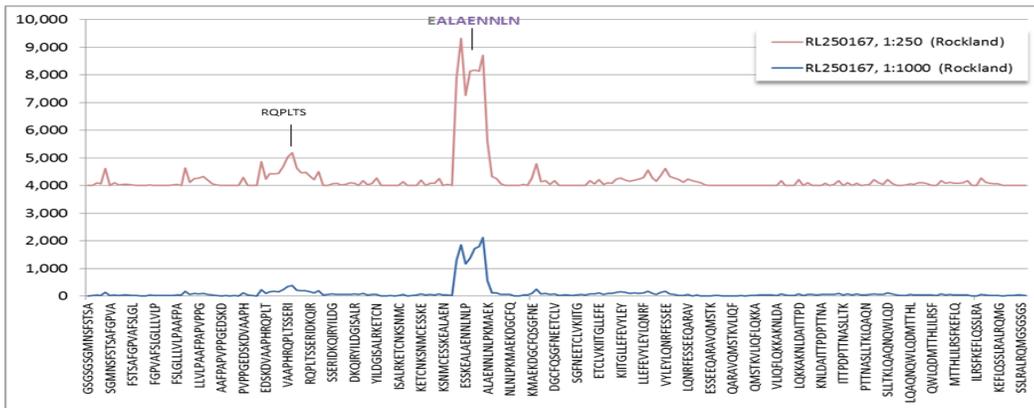
El suero humano RL250167 con auto-Ab's anti-IL-6 reaccionó con dos péptidos distintivos, el primero ⁵⁵EALAENNLN⁶³ con una elevada intensidad de señal, mientras que con el segundo ¹⁶RQPLTS²⁰, la señal fue de menor intensidad. La construcción del modelo de IL-6 para analizar la ubicación del epítomo reconocido por los auto-Ab's anti-IL-6 presentes en el suero del paciente, utilizó la secuencia completa de IL-6 (NP_000591.1, 212 aa) y se consideraron los aa conservados (55 a 70).

El mapeo de epítomos mostró un pico definido de alta intensidad cuya secuencia fue ⁵⁵EALAENNLN⁶³ como muestra la **Figura 27, PANEL A**; dicha secuencia posee una conformación lineal localizada entre el aminoácido 55 a 63, antes de la hélice alfa que se superpone en el extremo N (**Figura 27, PANEL B**). El modelo de fusión aplicado sobre la plataforma PyMOL®, utilizó el epítomo ⁵⁵EALAENNLN⁶³ cuya secuencia está involucrada en la unión de la IL-6 con IL-6R alfa (subunidad gp130), dicho complejo es el primer evento en la activación de la vía de señalización de IL-6 y se representa mediante modelaje molecular en Swiss-Model ® (**Figura 28**).

PANEL A

RL250167, Intensity Plots

ID RL250167 1:250



PANEL B

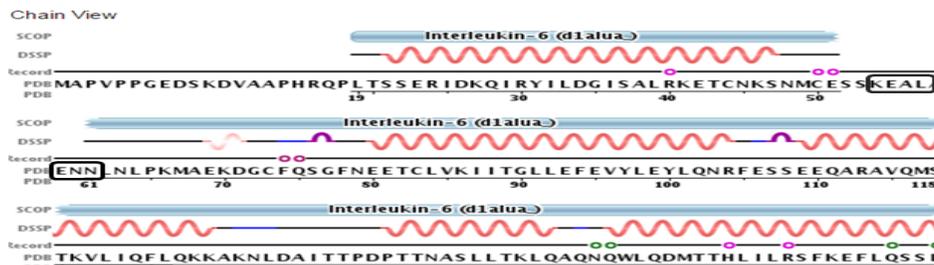
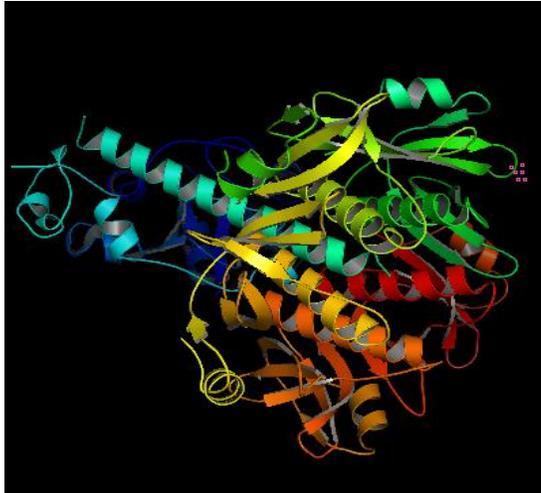
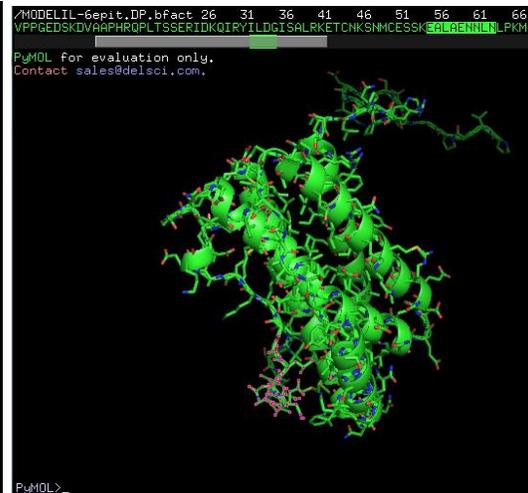


Figura 27. Mapeo de epítomos sintetizados a partir de microarreglos peptídicos comerciales. PANEL A: Microarreglos de péptidos de la muestra sérica RL250167 con auto-Ab's anti-IL-6. **PANEL B:** Alineación múltiple de la secuencia de aa de IL-6 que incluye el epítipo inmunodominante (⁵⁵EALAENNLN⁶³) reconocido por los auto-Ab's anti-IL-6 de la muestra sérica, en una caja se resaltan los residuos del aa ⁵⁵EA-----LN⁶³.

PANEL A



PANEL B



2il6.1.A.pdb

Figura 28. Representación gráfica obtenida mediante Pymol® de IL-6. PANEL A: Se muestra la unión de la IL-6 a su subunidad gp130 a través del receptor transmembrana, empleando modelaje molecular en Swiss Model®. **PANEL B:** Estructura gráfica del complejo IL-6-IL-6R-gp130 para determinar la proyección 3D generada (<http://swissmodel.expasy.org>) y construida en PyMOL®, el modelo permitió visualizar el epítipo principal (⁵⁵EALAENNLN⁶³) con el complejo de señalización para la IL-6 (aa del 55 al 63) y la subunidad gp130 (dominio 1, aa del 131 al 137).

7. DISCUSIÓN

En la actualidad los auto-Ab's contra citocinas se han estudiado principalmente en humanos, se reconoce cada vez más en asociación a la inmunodeficiencia adquirida y la susceptibilidad a infecciones por diversos microorganismos (Barcenas-Morales *et al.*; Barcenas-Morales *et al.*, 2016; Browne, 2014^a; Browne and Holland, 2014b; Knight *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2015). También se ha reportado que niveles moderados de auto-Ab's anti-citocinas se encuentran comúnmente en individuos sanos y que pueden jugar un papel en la homeostasis normal de las citocinas (Lutz *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2010). En este trabajo, se reporta el primer estudio en el área veterinaria de la presencia de auto-Ab's anti-citocinas en muestras séricas caninas y equinas.

7.1. Autoanticuerpos anti-citocinas en caninos

Analizando desde un panorama general la diversidad encontrada en el desarrollo de auto-Ab's en caninos del presente estudio, se podría considerar que tanto los auto-Ab's inhibidores como los potenciadores desempeñan un papel crucial en la exacerbación o regulación de la enfermedad; la respuesta obtenida a partir de esta población sugiere un patrón de auto-Ab's anti-citocina a veces específico de cada enfermedad, lo cual concuerda con los datos publicados previamente en humanos (Rosenberg *et al.*, 2016), pero en ciertas ocasiones los patrones de auto-Ab's resultaron ser más complejos.

7.1.1. Respuestas de autoanticuerpos anti-citocinas detectados en caninos y su asociación con grupos de enfermedad

Se demostró una diferencia significativa en el nivel de auto-Ab's anti-citocina detectados en los sueros de caninos enfermos comparados con animales clínicamente sanos, presentándose patrones específicos de reactividad de los auto-Ab's principalmente hacia citocinas producidas por Th17, Interferones tipo II y III, así como citocinas proinflamatorias que se asociaron a las enfermedades de algunos pacientes. Una parte de los auto-Ab's principales identificados en las muestras séricas caninas analizadas en este estudio se equiparan con auto-Ab's identificados previamente en enfermedades humanas.

Se identificaron auto-Ab's hacia citocinas producidas por células Th17 en siete de 16 perros con **ID**, cinco de ellos cursaron con infecciones fúngicas y solo dos con infecciones bacterianas. Las citocinas producidas por Th17 tienen un papel importante en la regulación de **AID** como citocinas proinflamatorias (Biet *et al.*, 2002), existiendo reportes en humanos en los que se menciona que altos niveles de estas citocinas podrían desencadenar procesos de autoinmunidad y generar susceptibilidad a infecciones recurrentes; por lo que se podría especular que los auto-Ab's anti-IL-17A e IL-17F contenidos en las muestras séricas de caninos estuvieran regulando la función biológica de las citocinas producidas por Th17 (Dinarello, 2007; Volin and Koch, 2018). Existen reportes realizados en humanos donde los auto-Ab's dirigidos hacia IL-17, IL-22 e IFN λ se identificaron como objetivos "comunes" en pacientes con distrofia ectodérmica, candidiasis-poliendocrinopatía autoinmune de tipo 1 (APECED) y timoma, mientras que auto-Ab's contra únicamente IL-17A/F e IL-22 se han asociado en particular con susceptibilidad a candidiasis (Kisand *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2010); sin embargo, cabe mencionar que la candidiasis no es una manifestación frecuente en perros (Krohne, 2000).

Se detectaron auto-Ab's contra IFN γ , en caninos con **ID** y **AID**. Todos los pacientes que cursaron con **ID** exhibieron anticuerpos anti-IFN γ , los cuales presentaron una infección por patógenos intracelulares obligatorios o facultativos que incluyó hongos, virus y *Salmonella*. Los auto-Ab's anti-IFN γ se han asociado en pacientes humanos con susceptibilidad a patógenos intracelulares, como micobacterias, *Salmonella*, infecciones por CMV, HZV y ciertos hongos filamentosos en algunas poblaciones étnicas humanas (Browne, 2014a; Doffinger *et al.*, 2004; Doffinger *et al.*, 2000; Ivashkiv, 2017; Knight *et al.*, 2016) .

Resulta importante mencionar que también se encontraron auto-Ab's anti-IFN γ en algunos pacientes caninos con lupus sistémico, existen varios estudios que sugieren un papel del IFN γ en la inducción de la autoinmunidad y en particular en la etiología del lupus eritematoso sistémico en humanos (Domeier *et al.*, 2016; Green *et al.*, 2017).

Adicionalmente, se detectó la presencia de auto-Ab's anti-IFN λ en caninos con **AID** e **ID**. La familia IFN λ es el grupo de interferones identificado y descrito más recientemente, esta

citocina participa principalmente en la respuesta a diversas infecciones virales, tiene una función inmunoreguladora potente e induce la secreción de diferentes mediadores químicos (Egli *et al.*, 2014; Liu *et al.*; Sheppard *et al.*, 2003; Strange *et al.*; Wang *et al.*). Un estudio en humanos reporta que polimorfismos de nucleótidos únicos están relacionados a individuos con una predisposición a autoinmunidad (Egli *et al.*, 2014). Por lo tanto, la detección de auto-Ab's contra IFN λ podría estar implicada y ser relevante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes en caninos.

Por otra parte, no se encontraron auto-Ab's contra los IFN tipo I, IFN α e IFN ω en la población analizada, sin embargo, existen reportes de la presencia de estos auto-Ab's en muestras séricas humanas de pacientes con síndrome autoinmune glandular tipo 1 (APS-1), lupus y diabetes mellitus tipo I (Barcenas-Morales *et al.*, 2016; Browne and Holland, 2010; Knight *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2015). Esto permite especular que la ausencia de auto-Ab's contra IFN tipo I puede ser secundaria, debido a que estas citocinas exhibían homologías muy bajas entre los caninos y humanos.

La IL-6 desempeña un papel clave en la autoinflamación al activar la respuesta de fase aguda y potencialmente causar hiperreactividad de las células B (Knight *et al.*, 2016; Narazaki *et al.*, 2017; Wallace *et al.*, 2017); así mismo, se ha demostrado que la IL-6 está involucrada en la patogenia de diversas **AID** en humanos, como la artritis reumatoide (Narazaki *et al.*, 2017) y el lupus sistémico (Tackey *et al.*, 2004). Se han descrito auto-Ab's neutralizantes contra IL-6 en pacientes humanos con infecciones bacterianas graves (Nanki *et al.*, 2013; Puel, 2013; Puel *et al.*, 2008a). Un informe reciente mostró que el tratamiento con el antagonista de IL-6R Tocilizumab fue beneficioso en un paciente con miastenia gravis (Jonsson *et al.*, 2017). Niveles altos de auto-Ab's anti-IL-6 se han observado previamente en pacientes con **AID** y se sugirió un papel exacerbante de esta etiología (Takemura *et al.*, 1992). Considerando los reportes anteriores se sugiere un posible papel neutralizante de la IL-6 o incluso potencializador de la inflamación. Sin embargo, en la población de caninos, no se identificaron auto-Ab's anti-IL-6 significativos en los pacientes con **ID**, pero si en tres perros con **AID** que cursaron con SLE, AR y MG, por lo que su implicación con la **AID** puede jugar un papel importante en el desarrollo de autoinmunidad e inflamación.

7.1.2. Respuestas múltiples hacia autoanticuerpos anti-citocinas en caninos con enfermedad autoinmune y autoinflamatoria

Los pacientes con **AID** y **AUI** mostraron una diversa complejidad de respuesta hacia auto-Ab's anti-citocinas, donde un porcentaje importante de caninos con **AID** mostró una alta positividad a más de tres citocinas en comparación con el grupo de pacientes con **ID**. Los principales auto-Ab's detectados fueron dirigidos hacia las citocinas producidas por células Th17, el IFN γ y la citocina reguladora IL-10. Se cree que el equilibrio entre las células/citocinas Th17 y las células Treg con la IL-10, desempeña un papel importante en la inducción de enfermedades autoinmunes (Noack and Miossec, 2014). La alta incidencia de auto-Ab's anti-citocinas complejos en pacientes con **AID** puede reflejar la respuesta de sus citocinas blanco y por lo tanto, ser considerada como una respuesta reguladora o puede desempeñar un papel más directo en la etiología de la condición **AID**, ya sea exacerbando las citocinas proinflamatorias (p. ej., Th17 y Th1) o atenuando el efecto de los factores reguladores (p. ej., IL-10). En este contexto, es importante destacar que algunos pacientes con **AUI**, específicamente con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) exhibieron auto-Ab's contra IL-10 y contra las citocinas producidas por Th17. Se ha demostrado que los defectos genéticos en la vía de señalización de IL-10 causan IBD en humanos (Glocker *et al.*, 2011).

Por otra parte, el bloqueo terapéutico de la IL-17A se ha asociado recientemente con varias formas de inflamación gastrointestinal, incluida la IBD en varios reportes (Vernero and Ribaldone, 2018; Wang *et al.*, 2018).

En el grupo de caninos con **AID** los pacientes con queratitis ulcerativa inmunomediada (IMUK) y epidermólisis bullosa adquirida (EBA) presentaron auto-Ab's contra IL-17 y/o IL-10. Reportes recientes en humanos encontraron que las respuestas de citocinas producidas por células Th17 desempeñan papeles clave tanto en queratitis inmunomediada como en epidermólisis bullosa. Así mismo, se ha demostrado en pacientes humanos que el bloqueo terapéutico de las citocinas producidas por Th17 (IL-17A) se considera como una posible opción de tratamiento para queratitis ulcerativa (Cao *et al.*, 2017; Castela *et al.*, 2018).

7.1.3. Las citocinas producidas por Th1/Th17 y la IL-10 son citocinas blanco principales en caninos con enfermedades infecciosas

En el grupo de pacientes con **ID** causadas por patógenos intracelulares obligatorios o facultativos todos los pacientes presentaron auto-Ab's anti-IFN γ ; en este sentido, en los pacientes con infecciones fúngicas y bacterianas se identificaron auto-Ab's contra citocinas producidas por Th17. Ambos hallazgos coinciden con las susceptibilidades desarrolladas por la presencia de auto-Ab's anti-citocinas reportadas previamente en humanos (Barcenas-Morales *et al.*, 2016; Browne, 2014a).

La IL-10 regula la respuesta inmunitaria hacia microorganismos y ayuda a encontrar el equilibrio correcto entre la eficiencia antimicrobiana y la lesión del huésped (Couper *et al.*, 2008). Se identificaron auto-Ab's anti-IL-10 en algunos perros con ID; recientemente en humanos se ha reportado que los niveles altos de esta citocina favorecen la eliminación de patógenos fúngicos (Cyktor and Turner, 2018), además existen estudios donde mencionan que la deficiencia de la IL-10 puede ser perjudicial para el organismo ya que incrementa la susceptibilidad a la infección por provocarse una exacerbación de la inflamación (Chaudhry *et al.*, 2014; Iyer and Cheng, 2012); por lo que los auto-Ab's anti-IL-10 podrían estar neutralizando su cascada de señalización, favoreciendo así el desarrollo de infecciones por microorganismos.

7.1.4. Patrones únicos de autoanticuerpos anti-citocinas en caninos

En el grupo de **AUI** los dos únicos pacientes con auto-Ab's contra IL-21 presentaban miositis, sugiriendo un posible papel de estos auto-Ab's en la exacerbación de esta enfermedad. Un informe reciente en humanos sugirió un vínculo entre la miositis autoinmune y los altos niveles de IL-21 (Kageyama *et al.*, 2018). Por otra parte, los auto-Ab's contra IFN β solo se identificaron en un paciente que presentaba enfermedad inflamatoria intestinal. Se ha demostrado que la administración de IFN β condujo a la remisión clínica en pacientes humanos con colitis ulcerosa severa (Mannon *et al.*, 2011).

En el grupo de individuos con **Ca** un paciente con linfoma mostró un patrón inusual de respuesta de auto-Ab's hacia GM-CSF y G-CSF, sin embargo, no existen reportes en humanos con cáncer que sugieran la posible función de estos auto-Ab's.

7.2. Autoanticuerpos anti-citocinas en equinos

Se decidió realizar el análisis de las respuestas de auto-Ab's anti-citocina detectadas en esta población de estudio, considerando los patrones de auto-Ab's encontrados en caninos. Por lo tanto, se encontró que un 55% de los pacientes con **AID/AUI** presentaron niveles considerables de auto-Ab's anti-citocinas específicos (IL-17F, IL-21 e IFN γ), mientras que los equinos con **ID** solo en el 47 % se detectaron auto-Ab's contra IFN γ , IL-17A/F e IL-21.

7.2.1. Patrones específicos de autoanticuerpos anti-citocinas en equinos con enfermedad autoinmune/autoinflamatoria

Los principales auto-Ab's detectados en pacientes con **AID/AUI** fueron dirigidos hacia citocinas producidas por Th17 (IL-17F e IL-21), la citocina IFN γ , IL-6 y la citocina reguladora IL-10; previamente se había mencionado una serie de reportes en humanos que mostraron patrones de auto-Ab's característicos de una respuesta contra citocinas producidas por células Th17 y contra la IL-10 producida por las células Treg, donde ambas citosinas están involucradas principalmente en la inducción de autoinmunidad (Noack and Miossec, 2014); por lo tanto, la presencia de auto-Ab's contra citocinas producidas por Th17 y Th1, y contra IL-10 podría tener un posible efecto protector o regulador, es decir, exacerbando a las citocinas proinflamatorias (p. ej., producidas por Th17 y Th1) o atenuando el efecto de las citocinas reguladoras (IL-10), respectivamente.

El grupo de pacientes con **AID/AUI** que cursaron con complejo artritis/laminitis exhibieron auto-Ab's contra IL-17 e IFN γ , se ha demostrado la existencia de auto-Ab's potenciadores de la inflamación en humanos con artritis reumatoide que son causantes de inflamación severa crónica (Glocker *et al.*, 2011). Por lo anterior, se puede sugerir que estos auto-Ab's (anti-IL-17 y anti-IFN γ) poseen una función exacerbante de la inflamación provocando un una desregulación de la respuesta inmunitaria. Así mismo, de un total de siete caballos con artritis/laminitis, tres mostraron altos niveles de auto-Ab's anti-IL-6 que pueden sugerir un papel exacerbante de la AUI crónica.

7.2.2. Patrones específicos de autoanticuerpos anti-citocinas en equinos con enfermedades infecciosas

En los pacientes con **ID** que cursaron con infecciones por bacterias intracelulares se identificaron auto-Ab's anti-IFN γ , este hallazgo corresponde a lo previamente reportado en humanos que presentaron auto-Ab's neutralizantes hacia IFN γ e infecciones diseminadas por micobacterias (Browne, 2014a). En un paciente con infección por *Streptococcus equi* se detectaron auto-Ab's anti-IL-6, esto concuerda con los reportes en humanos, donde pacientes con infecciones diseminadas por bacterias presentaron auto-Ab's neutralizantes hacia IL-6 (Nanki *et al.*, 2013; Puel, 2013; Puel *et al.*, 2008a). Por lo tanto, en ambos casos los auto-Ab's hacia IFN γ e IL-6 detectados pueden tener un papel inhibidor de la función biológica de dichas citocinas que puede predisponer a **ID**.

Los equinos con infecciones virales exhibieron auto-Ab's hacia los interferones tipo II y III, en particular, donde aquellos caballos con Anemia infecciosa exhibieron auto-Ab's anti-IFN γ y anti-IFN λ . Considerando este aspecto, es importante mencionar que la citocina IFN γ es crucial en la respuesta inmune contra microorganismos intracelulares, y que el IFN λ tiene una potente función sobre la respuesta inmune anti-viral, especulándose una capacidad neutralizante de estos auto-Ab's.

Los equinos con infecciones fúngicas mostraron auto-Ab's hacia IL-17A e IL-17F, estos hallazgos se han reportado en humanos con infecciones diseminadas como candidiasis mucocutánea crónica (Puel *et al.*, 2008a), por lo que estos auto-Ab's pueden estar neutralizando la función de la citocina IL-17 y su eficacia contra agentes fúngicos.

7.3. Autoanticuerpos anti-citocinas en humanos

Los diferentes patrones de reactividad de auto-Ab's encontrados en las muestras séricas de pacientes con diversos grupos de enfermedad, confirman la alta complejidad y especificidad en la respuesta de cada individuo, estos resultados están en concordancia con los perfiles de auto-Ab's anti-citocinas descritos por una serie de reportes en humanos y el impacto de la importancia biológica y funcional de éstos en la patogénesis de las enfermedades infecciosas y/o autoinmunes (Barcenás-Morales *et al.*, 2016; Browne, 2014a; Knight *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2007).

7.3.1. Autoanticuerpos contra citocinas producidas por Th17

Se encontraron auto-Ab's contra IL-17A/F, IL-22 e IFN γ en pacientes que cursaron con APECED y enfermedad multiorgánica, mientras que auto-Ab's exclusivamente contra citocinas producidas por células Th17 fueron identificados en pacientes con infecciones fúngicas diseminadas y en dos pacientes con APS-1. Existen reportes realizados en humanos donde los auto-Ab's dirigidos hacia IL-17A/F, IL-22 e IFN λ se identificaron como objetivos "comunes" en pacientes con APECED y timoma, mientras que auto-Ab's contra IL-17A/F e IL-22 se han asociado en particular con susceptibilidad a candidiasis (Kisand *et al.*, 2010; Puel *et al.*, 2010). Los pacientes que desarrollaron autoinmunidad multiorgánica, timoma e infecciones virales mostraron auto-Ab's anti-IL-17; en este sentido, se han identificado pacientes con susceptibilidad a ID por hongos, se han encontrado respuestas múltiples de auto-Ab's contra IL-17 e IL-22 en el suero de estos individuos, indicando todos estos reportes una función neutralizante de los auto-Ab's sobre la actividad biológica de las citocinas producidas por Th17 (Cappellano *et al.*; Doffinger *et al.*, 2004; Dubin and Kolls, 2008; Karner *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2005).

7.3.2. Autoanticuerpos anti-IFN γ

Los pacientes con tuberculosis y otras complicaciones, infecciones por NTM e infecciones virales presentaron niveles considerables de auto-Ab's anti-IFN γ , este hallazgo se ha reportado previamente en pacientes con ID diseminadas con NTM por auto-Ab's anti-IFN γ , y en pacientes con miastenia gravis y timoma, donde se identificó la prevalencia de auto-Ab's contra IL-12 e IFN- γ ; así mismo, los pacientes con susceptibilidad a ID recurrentes producidas por bacterias intracelulares pueden presentar altos niveles de auto-Ab's hacia IFN γ , citocina de crucial importancia para la eliminación de patógenos tales como *Mycobacterium* y *Salmonella* (Barcenás-Morales, Jandus, & Döffinger, 2016; Browne, 2014; Browne & Holland, 2010a; Meager *et al.*, 2003), por lo que se puede especular una actividad neutralizante de los auto-Ab's hacia el IFN γ .

La presencia de auto-Ab's anti-IFN's (IFN α e IFN β) se encontró en dos de seis pacientes que presentaron poliendocrinopatía autoinmune, DM y SLE; la presencia de auto-Ab's hacia IFN Tipo I y II se han encontrado en individuos que manifiestan artritis reumatoide, timoma y ciertos tipos de cáncer (Meager *et al.*, 2003).

7.3.3. Autoanticuerpos anti-IL-6

Se identificaron auto-Abs contra IL-6 en pacientes con **ID** diseminadas severas por bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* y *E. Coli*). Esto coincide con reportes previos en pacientes humanos con abscesos subcutáneos y celulitis estafilococal recurrente, donde se confirmó la presencia de auto-Ab's neutralizantes contra IL-6 (Nanki *et al.*, 2013; Puel, 2013; Puel *et al.*, 2008a).

7.3.4. Autoanticuerpos anti-GM-CSF

En un total de cinco pacientes con PAP e infección fúngica, así como en dos de tres pacientes con infecciones pulmonares recurrentes por NTM se presentaron auto-Ab's anti-GM-CSF. Este hallazgo se ha reportado en pacientes humanos con PAP, donde se evaluó la actividad neutralizante que presentan los auto-Ab's contra GM-CSF en estos pacientes; Rosen y colaboradores reportaron una posible asociación entre pacientes que presentaban meningitis criptocócica y auto-Ab's contra GM-CSF, los autores confirmaron que estos auto-Ab's eran biológicamente activos y causantes de una susceptibilidad a criptococosis (Rosen *et al.*; Watanabe *et al.*, 2007).

7.4. Análisis y caracterización de la actividad biológica neutralizante de autoanticuerpos anti-citocina en humanos

La evaluación de la actividad neutralizante de auto-Ab's anti-citocina en la función biológica de la fosforilación de STAT-1 y STAT-3 mediada por IFN γ , IL-6 e IL-10, se pudo confirmar en cuatro de seis muestras positivas a la presencia de auto-Ab's anti-IFN γ que inhibieron la fosforilación de STAT-1, los auto-Ab's anti-IL-6 contenidos en siete de ocho muestras inhibieron considerablemente la fosforilación de STAT-3, mientras que dos de cuatro muestras (auto-Ab's anti-IL-10) tuvieron un marcado efecto de inhibición de la fosforilación de STAT-3. Indicando que efectivamente los auto-Ab's dirigidos contra IFN γ , IL-6 e IL-10, presentes en ciertas muestras séricas, poseen la capacidad de inhibir las vías de señalización activadas por estas citocinas; sugiriéndose que cuando el auto-Ab reconoce a la citocina, este impide que dicha citocina se una a su receptor, y de esta forma no se lleve a cabo la activación y fosforilación de los factores de transcripción STAT-1 y STAT-3, por lo tanto, su consecuente translocación al núcleo celular y la activación de los genes inducidos

por las citocinas. Mientras que los auto-Ab's que no presentaron una capacidad inhibitoria podrían estar protegiendo a la citocina, sin embargo, su función actualmente es desconocida.

Así mismo, el ensayo de producción de CRP permitió investigar la funcionalidad de los auto-Ab's anti-IL-6, evaluando su habilidad en la inhibición de la producción de CRP, sin embargo, el principal obstáculo es en la cuantificación de esta proteína, ya que el rango normal de CRP en sueros de individuos clínicamente sanos (0.1-0.5 ug/ml) es más alto que los niveles de CRP producidos por la línea celular Hep3B. Sin embargo, considerando los valores de MFI se pudo observar claramente que los auto-Ab's anti-IL-6 contenidos en las muestras de los pacientes abrogaban la producción de CRP, a excepción de la muestra que con el ensayo anterior tuvo el mismo comportamiento (Fosforilación de STAT-3).

7.5. Epítomos reconocidos por los autoanticuerpos contra IFN γ e IL-6

Los auto-Ab's anti-IFN γ contenidos en una muestra sérica reconocieron al epítipo principal ¹¹²HELIQVMAELSPA¹²⁴, esta secuencia de aa se localizó en un sitio crucial para la activación del complejo bivalente de dicha citocina; el reconocimiento de este epítipo por los auto-Ab's anti-IFN γ inhibe la interacción de esta citocina con el IFNGR1, neutralizando la actividad biológica de esta citocina.

Existe un reporte que demostró la presencia del epítipo EE-IFN- γ (¹²³SPAAKTGKRK¹³¹) en pacientes con auto-Ab's anti-IFN γ y enfermedad micobacteriana asociada, por lo que se realizó una comparación entre ambos epítomos mostrando una homología menor a 49%, a pesar de esta moderada homología, es importante mencionar que la región donde se encuentran ubicados ambos epítomos es una zona altamente inmunogénica (Lin *et al.*, 2014).

Por otra parte, la secuencia del epítipo principal presentó una homología alta con una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) defectuosa en la cadena A, esta cadena ha demostrado ser una molécula crítica en el ciclo de vigilancia de MTb (Domeier *et al.*, 2016; Huang *et al.*; Krieger *et al.*, 2012);

Con respecto al epítipo ⁵⁵EALAENLN⁶³ reconocido por los auto-Ab's anti-IL-6 en la muestra sérica, tiene una secuencia de aa que presenta una similitud del 89 % con la secuencia de IL-6, esta secuencia interacciona con una región de la subunidad gp130 del receptor de IL-6, sugiriendo que el reconocimiento de este epítipo por los auto-Ab's anti-IL-6

afectan la unión de esta citocina con su receptor (IL-6R), específicamente con la subunidad gp130; afectando la actividad biológica de IL-6 y su vía de señalización (Zhang *et al.*,2014).

Por otro lado, la comparación de la secuencia del epítipo principal mostró una homología considerable con la proteína Sintasa B de *Aspergillus parasiticus*. Se ha descrito en reportes previos que esta biomolécula favorece el desarrollo de Aspergilosis en algunos individuos, y un mecanismo de mimetismo molecular por parte de este microorganismos puede sugerirse, sin embargo no existen reportes más detallados al respecto (McGuire *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 1996).

8. CONCLUSIONES

1. Los diferentes sistemas citocina-microesfera humanas recombinantes establecidos permitieron detectar la presencia de autoanticuerpos anti-citocina en las diferentes especies (caninos, equinos y humanos) empleando la técnica de Luminex.
2. Se identificaron niveles significativos de diversos autoanticuerpos anti-citocina en pacientes caninos, equinos y humanos, pero no en la población de individuos clínicamente sanos.
3. En caninos con enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias se identificaron respuestas complejas de autoanticuerpos contra citocinas IL-17, IFN γ e IL-6, mientras que los pacientes con enfermedades infecciosas exhibieron respuestas de autoanticuerpos dirigidas principalmente hacia Interferones tipo I y II, IL-17 e IL-10, los caninos con infecciones virales mostraron autoanticuerpos anti-IFN λ , mientras que en pacientes con cáncer se observaron respuestas únicas de autoanticuerpos contra GM-CSF y G-CSF, y en el caso de individuos con miositis contra IL-21.
4. En equinos con enfermedades infecciosas se identificaron autoanticuerpos dirigidos hacia las citocinas IFN γ , IL-17 e IL-6, mientras que autoanticuerpos contra IL-17 e IL-10 se asociaron principalmente a enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias.
5. Los humanos mostraron patrones específicos de autoanticuerpos contra IFN γ en pacientes con infecciones por micobacterias, autoanticuerpos contra citocinas producidas por Th17 en infecciones fúngicas, autoanticuerpos anti-IL-6 en infecciones bacterianas, autoanticuerpos contra IL-10 en enfermedad autoinflamatoria y autoanticuerpos contra GM-CSF en proteinosis alveolar pulmonar, mientras que los pacientes con enfermedades multiorgánicas y otras enfermedades exhibieron respuestas complejas de autoanticuerpos contra interferones tipo I y II.

6. La purificación de autoanticuerpos anti-IFN γ , anti-IL-6 y anti-IL-10 a partir de muestras séricas humanas, permitió un mejor análisis de la función neutralizante *in vitro* de estos autoanticuerpos.
7. Los ensayos de inhibición *in vitro* permitieron evaluar la capacidad neutralizante de autoanticuerpos anti-IFN γ , anti-IL-6 y anti-IL-10, demostrando así la función biológica neutralizante de la mayoría de ellos, permaneciendo desconocida la función de los autoanticuerpos no neutralizantes.
8. El ensayo de inhibición de la producción de CRP permitió analizar la habilidad neutralizante de los autoanticuerpos anti-IL-6 contenidos en algunas muestras séricas.
9. Se identificaron los epítomos principales reconocidos por autoanticuerpos anti-IFN γ y anti-IL-6, permitiendo sugerir la función neutralizante de estos autoanticuerpos sobre la actividad biológica de la citocina blanco.

9. PERSPECTIVAS

En este estudio, se demostró la presencia de autoanticuerpos anti-citocinas en sueros de tres diferentes especies que cursaron con diversas enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, incluyendo infecciones recurrentes, enfermedades autoinmunes/autoinflamatorias, cáncer y otras enfermedades; encontrándose distintas asociaciones en el desarrollo de autoanticuerpos anti-citocinas con los padecimientos presentados por los individuos, siendo estos resultados relevantes para el campo de la inmunología de los mamíferos.

La identificación de autoanticuerpos anti-citocina sugiere que estos poseen funciones inmunorreguladoras, reflejando la inducción de distintas redes de citocinas principalmente en la infección y la inflamación. Sin embargo, se puede considerar una función más directa en las diversas patologías de la enfermedad, pero se necesitan estudios funcionales detallados en cada especie.

La investigación de autoanticuerpos anti-citocinas puede dar nuevos conocimientos sobre los mecanismos de la enfermedad autoinmune y los estados de desregulación de la respuesta inmunitaria, permitiendo el desarrollo de herramientas novedosas y útiles para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad en un mediano plazo. Realizando estudios adicionales específicos a cada enfermedad, analizando un mayor número de pacientes y ampliando estos hacia las diferentes especies (caninos y equinos), para determinar la asociación de los autoanticuerpos anti-citocina con los diversos tipos de autoinmunidad y susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

10. REFERENCIAS

1. Adinsoft, S., 2010, XLSTAT-software, version 10. Addinsoft, Paris, France.
2. Agmon-Levin, N., Paz, Z., Israeli, E., Shoenfeld, Y., 2009. Vaccines and autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 5, 648-652.
3. Akasaka, K., Tanaka, T., Kitamura, N., Ohkouchi, S., Tazawa, R., Takada, T., Ichihata, T., Yamaguchi, E., Hirose, M., Arai, T., Nakano, K., Nei, T., Ishii, H., Handa, T., Inoue, Y., Nakata, K., 2009. Outcome of corticosteroid administration in autoimmune pulmonary alveolar proteinosis: a retrospective cohort study. *BMC Pulm Med* 15, 88.
4. Altare, F., Jouanguy, E., Lamhamedi, S., Doffinger, R., Fischer, A., Casanova, J.L., 1998. Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Curr Opin Immunol* 10, 413-417.
5. Altare, F., Lammas, D., Revy, P., Jouanguy, E., Doffinger, R., Lamhamedi, S., Drysdale, P., Scheel-Toellner, D., Girdlestone, J., Darbyshire, P., Wadhwa, M., Dockrell, H., Salmon, M., Fischer, A., Durandy, A., Casanova, J.L., Kumararatne, D.S., 1998. Inherited interleukin 12 deficiency in a child with bacille Calmette-Guerin and Salmonella enteritidis disseminated infection. *J Clin Invest* 102, 2035-2040.
6. Baerlecken, N., Jacobs, R., Stoll, M., Schmidt, R.E., Witte, T., 2009. Recurrent, multifocal Mycobacterium avium-intercellulare infection in a patient with interferon-gamma autoantibody. *Clin Infect Dis* 49, e76-78.
7. Baharav, E., Fishman, P., Shoenfeld, Y., 1994. [Superantigens and autoimmunity]. *Harefuah* 126, 715-719.
8. Barcenas-Morales, G., Cortes-Acevedo, P., Doffinger, R., 2019. Anti-cytokine autoantibodies leading to infection: early recognition, diagnosis and treatment options. *Curr Opin Infect Dis* 32, 330-336.
9. Barcenas-Morales, G., Jandus, P., Doffinger, R. 2016. Anti-cytokine autoantibodies in infection and inflammation: An update. In *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*.
10. Bellanti, J.A., 2016. *Immunology IV: Clinical Applications in Health and Disease*.
11. Biet, F., Locht, C., Kremer, L., 2002. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J Mol Med (Berl)* 80, 147-162.
12. Bliss, M., William S. Halsted and Harvey W., 2009. Cushing: reflections on their complex association. *J Neurosurg* 110, 382-383; discussion 383.
13. Browne, S.K., 2014a. Anticytokine Autoantibodies Associated Immunodeficiency. *Annual Review of Immunology*.

14. Browne, S.K., Holland, S.M. 2010. Anticytokine autoantibodies in infectious diseases: Pathogenesis and mechanisms. In *The Lancet Infectious Diseases*.
15. Browne, S.K., Holland, S.M. 2014b. Immunodeficiency secondary to anticytokine autoantibodies. In *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*.
16. Bustamante, J., Boisson-Dupuis, S., Abel, L., Casanova, J.L., 2014. Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: genetic, immunological, and clinical features of inborn errors of IFN-gamma immunity. *Semin Immunol* 26, 454-470.
17. Cao, Y., Zhang, W., Wu, J., Zhang, H., Zhou, H., 2017. Peripheral Ulcerative Keratitis Associated with Autoimmune Disease: Pathogenesis and Treatment. *Journal of Ophthalmology*.
18. Cappellano, G., Orillieri, E., Woldetsadik, A.D., Boggio, E., Soluri, M.F., Comi, C., Sblattero, D., Chiocchetti, A., Dianzani, U., 2012. Anti-cytokine autoantibodies in autoimmune diseases. *Am J Clin Exp Immunol*.
19. Caragol, I., Raspall, M., Fieschi, C., Feinberg, J., Larrosa, M.N., Hernandez, M., Figueras, C., Bertran, J.M., Casanova, J.L., Espanol, T., 2003. Clinical tuberculosis in 2 of 3 siblings with interleukin-12 receptor beta1 deficiency. *Clin Infect Dis* 37, 302-306.
20. Castela, E., Tulic, M.K., Roziars, A., Bourrat, E., Nicolas, J.F., Kanitakis, J., Vabres, P., Bessis, D., Mazereeuw, J., Morice-Picard, F., Baty, D., Berard, F., Lacour, J.P., Passeron, T., Chiaverini, C., 2018. Epidermolysis bullosa simplex generalized severe induces a Th17 response and is improved by Apremilast treatment. *British Journal of Dermatology*.
21. Commins, S., Steinke, J.W., Borish, L., 2008. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1108-1111.
22. Cortes, P., Barcenas-Morales, G., 2019. Estudio de auto-anticuerpos contra citocinas y quimiocinas en muestras séricas de caninos y humanos. Research project. UNAM, Mexico.
23. Cortes, P., Barcenas-Morales., 2016. Elaboración de sistemas de acoplamiento de quimiocinas a microesferas para el análisis de la presencia de auto-anticuerpos en muestras séricas UNAM, Mexico.
24. Cortes, P., Barcenas-Morales., 2019. Estudio de auto-anticuerpos contra citocinas y quimiocinas en muestras séricas de caninos y humanos. UNAM, Mexico.
25. Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*.
26. Cyktor, J.C., Turner, J., 2018. Interleukin-10 and immunity against prokaryotic and eukaryotic intracellular pathogens. *Infect Immun* 79, 2964-2973.

27. Chaudhry, A., Samstein, R.M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M.C., Heinrich, J.M., Jack, R.S., Wunderlich, F.T., Bruning, J.C., Muller, W., Rudensky, A.Y., 2014. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 34, 566-578.
28. Chi, C.Y., Chu, C.C., Liu, J.P., Lin, C.H., Ho, M.W., Lo, W.J., Lin, P.C., Chen, H.J., Chou, C.H., Feng, J.Y., Fung, C.P., Sher, Y.P., Li, C.Y., Wang, J.H., Ku, C.L., 2005. Anti-IFN-gamma autoantibodies in adults with disseminated nontuberculous mycobacterial infections are associated with HLA-DRB1*16:02 and HLA-DQB1*05:02 and the reactivation of latent varicella-zoster virus infection. *Blood* 121, 1357-1366.
29. Das, T., Sen, A.K., Kempf, T., Pramanik, S.R., Mandal, C., 2003. Induction of glycosylation in human C-reactive protein under different pathological conditions. *Biochem J* 373, 345-355.
30. Davies, S., 2016. Development of a neutralising assay to test human serum autoantibodies to the cytokine interleukin-6. Research Project King's College London MSc in Medical Immunology 2014-2016, London UK.
31. Denkers, E.Y., 2003. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39, 193-203.
32. Denkers, E.Y., Del Rio, L., Bennouna, S., 2003. Neutrophil production of IL-12 and other cytokines during microbial infection. *Chem Immunol Allergy* 83, 95-114.
33. Dinarello, C.A., 2003. Anti-cytokine therapeutics and infections. *Vaccine* 21 Suppl 2, S24-34.
34. Dinarello, C.A. 2007. Historical insights into cytokines. In *European Journal of Immunology*.
35. Doffinger, R., Helbert, M.R., Barcenas-Morales, G., Yang, K., Dupuis, S., Ceron-Gutierrez, L., Espitia-Pinzon, C., Barnes, N., Bothamley, G., Casanova, J.L., Longhurst, H.J., Kumararatne, D.S., 2004. Autoantibodies to interferon-gamma in a patient with selective susceptibility to mycobacterial infection and organ-specific autoimmunity. *Clin Infect Dis* 38, e10-14.
36. Doffinger, R., Jouanguy, E., Dupuis, S., Fondaneche, M.C., Stephan, J.L., Emile, J.F., Lamhamedi-Cherradi, S., Altare, F., Pallier, A., Barcenas-Morales, G., Meinel, E., Krause, C., Pestka, S., Schreiber, R.D., Novelli, F., Casanova, J.L., 2000. Partial interferon-gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with bacille Calmette-Guerin and *Mycobacterium abscessus* infection. *J Infect Dis* 181, 379-384.
37. Domeier, P.P., Chodisetti, S.B., Soni, C., Schell, S.L., Elias, M.J., Wong, E.B., Cooper, T.K., Kitamura, D., Rahman, Z.S.M., 2016. IFN-g receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*.
38. Dubin, P.J., Kolls, J.K., 2008. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 226, 160-171.

39. Egli, A., Humar, A., Widmer, L.A., Lisboa, L.F., Santer, D.M., Mueller, T., Stelling, J., Baluch, A., O'Shea, D., Houghton, M., Kumar, D., 2012. Effect of Immunosuppression on T-Helper 2 and B-Cell Responses to Influenza Vaccination. *J Infect Dis* 212, 137-146.
40. Egli, A., Levin, A., Santer, D.M., Joyce, M., O'Shea, D., Thomas, B.S., Lisboa, L.F., Barakat, K., Bhat, R., Fischer, K.P., Houghton, M., Tyrrell, D.L., Kumar, D., Humar, A., 2014. Immunomodulatory Function of Interleukin 28B during primary infection with cytomegalovirus. *J Infect Dis* 210, 717-727.
41. Ercolini, A.M., Miller, S.D., 2009. The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 155, 1-15.
42. Erkens, I.J., Verheijen, M.A., Knoop, H.C., Keuning, W., Roozeboom, F., Kessels, W.M., 2017. Plasma-assisted atomic layer deposition of conformal Pt films in high aspect ratio trenches. *J Chem Phys* 146, 052818.
43. Fernandes. 2010. The immune response in an overview. 1, 22.
44. Fernandes, R., Mazzarello, S., Stober, C., Ibrahim, M.F.K., Dudani, S., Perdrizet, K., Majeed, H., Vandermeer, L., Shorr, R., Hutton, B., Fergusson, D., Gyawali, B., Clemons, M., 2012. Primary Febrile Neutropenia Prophylaxis for Patients Who Receive FEC-D Chemotherapy for Breast Cancer: A Systematic Review. *J Glob Oncol* 4, 1-8.
45. Fox, J., Bouchet-Valat, M., 2016. Rcmdr: R Commander. R package version 2.3-1.
46. Garza, K.M., Chan, S.M., Suri, R., Nguyen, L.T., Odermatt, B., Schoenberger, S.P., Ohashi, P.S., 2000. Role of antigen-presenting cells in mediating tolerance and autoimmunity. *J Exp Med* 191, 2021-2027.
47. Gershwin, L.J., 2017. Current and Newly Emerging Autoimmune Diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 48, 323-338.
48. Glocker, E.O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N., Grimbacher, B., 2011. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
49. Green, D.S., Young, H.A., Valencia, J.C. 2017. Current prospects of type II & III interferon signaling & autoimmunity. In *Journal of Biological Chemistry*.
50. Hewagama, A., Richardson, B., 2009. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 33, 3-11.
51. Hoflich, C., Sabat, R., Rosseau, S., Temmesfeld, B., Slevogt, H., Docke, W.D., Grutz, G., Meisel, C., Halle, E., Gobel, U.B., Volk, H.D., Suttorp, N., 2004. Naturally occurring anti-IFN-gamma autoantibody and severe infections with *Mycobacterium chelonae* and *Burkholderia coccovenenans*. *Blood* 103, 673-675.

52. Huang, H.L., Krieger, I.V., Parai, M.K., Gawandi, V.B., Sacchettini, J.C., 2016. Mycobacterium tuberculosis Malate Synthase Structures with Fragments Reveal a Portal for Substrate/Product Exchange. *J Biol Chem* 291, 27421-27432.
53. Huse, K., Bohme, H.J., Scholz, G.H., 2002. Purification of antibodies by affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 51, 217-231.
54. Invernizzi, P., 2009. Future directions in genetic for autoimmune diseases. *J Autoimmun* 33, 1-2.
55. Ivashkiv, L.B., 2017. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. In *Nature Reviews Immunology*.
56. Iyer, S.S., Cheng, G., 2012. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 32, 23-63.
57. Jones, S.A., Novick, D., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Szalai, A.J., Fuller, G.M., 1999. C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding. *J Exp Med* 189, 599-604.
58. Jonsson, D.I., Pirskanen, R., Piehl, F., 2017. Beneficial effect of tocilizumab in myasthenia gravis refractory to rituximab. *Neuromuscular Disorders*.
59. Kageyama, T., Suto, A., Iwamoto, T., Tanaka, S., Suehiro, K., Saku, A., Furuta, S., Ikeda, K., Suzuki, K., Hirose, K., 2018. IL-21 Exacerbates Autoimmune Myositis by Enhancing the Accumulation of GM-CSF producing T Cells in the Muscle IL-21 Exacerbates Autoimmune Myositis by Enhancing the Accumulation of GM-CSF Producing gd T Cells in the Muscle.
60. Kamioka, I., Yoshiya, K., Satomura, K., Kaito, H., Fujita, T., Iijima, K., Nakanishi, K., Yoshikawa, N., Nozu, K., Matsuo, M., 2008. Risk factors for developing severe clinical course in HUS patients: a national survey in Japan. *Pediatr Int* 50, 441-446.
61. Kampmann, B., Hemingway, C., Stephens, A., Davidson, R., Goodsall, A., Anderson, S., Nicol, M., Scholvinck, E., Relman, D., Waddell, S., Langford, P., Sheehan, B., Semple, L., Wilkinson, K.A., Wilkinson, R.J., Ress, S., Hibberd, M., Levin, M., 2005. Acquired predisposition to mycobacterial disease due to autoantibodies to IFN- γ . *J Clin Invest* 115, 2480-2488.
62. Karner, J., Pihlap, M., Ranki, A., Krohn, K., Trebusak Podkrajsek, K., Bratanic, N., Battelino, T., Willcox, N., Peterson, P., Kisand, K., 2016. IL-6-specific autoantibodies among APECED and thymoma patients. *Immun Inflamm Dis* 4, 235-243.
63. Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med* 178, 63-72.
64. Kearney, E.R., Pape, K.A., Loh, D.Y., Jenkins, M.K., 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1, 327-339.

65. Khajoei, S., Hassaninevisi, M., Kianmehr, N., Seif, F., Khoshmirsafa, M., Shekarabi, M., Samei, A., Haghighi, A., 2014. Serum levels of adiponectin and vitamin D correlate with activity of Rheumatoid Arthritis. *Mol Biol Rep*.
66. Kindt, B.A.O., Richard, 2014. *Kuby Immunology*. 6th Edition.
67. Kisand, K., BA Wolff, A.S., Podkrajek, K.T.a., Tserel, L., Link, M., Kisand, K.V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., Meloni, A., Cetani, F., Perniola, R., Ergun-Longmire, B., Maclaren, N., Krohn, K.J.E., Pura, M.A., Schalke, B., Strabel, P., Leite, M.I., Battelino, T., Husebye, E.S., Peterson, P.r., Willcox, N., Meager, A., 2010. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patents correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*.
68. 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. *J Exp Med* 190, 875-880.
69. Kivity, S., Agmon-Levin, N., Blank, M., Shoenfeld, Y., 2009. Infections and autoimmunity-friends or foes? *Trends Immunol* 30, 409-414.
70. Klonisch, T., Panayotou, G., Edwards, P., Jackson, A.M., Berger, P., Delves, P.J., Lund, T., Roitt, I.M., 1996. Enhancement in antigen binding by a combination of synergy and antibody capture. *Immunology* 89, 165-171.
71. Knight, V., Merkel, P., O Sullivan, M., 2016. Anti-cytokine Autoantibodies: Association with Infection and Immune Dysregulation. *Antibodies*.
72. Krieger, I.V., Freundlich, J.S., Gawandi, V.B., Roberts, J.P., Sun, Q., Owen, J.L., Fraile, M.T., Huss, S.I., Lavandera, J.L., Ioerger, T.R., Sacchettini, J.C., 2012. Structure-guided discovery of phenyl-diketo acids as potent inhibitors of *M. tuberculosis* malate synthase. *Chem Biol* 19, 1556-1567.
73. Krohne, S.G. 2000. Canine systemic fungal infections. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*.
74. Lees, J.R., Charbonneau, B., Swanson, A.K., Jensen, R., Zhang, J., Matusik, R., Ratliff, T.L., 2006. Deletion is neither sufficient nor necessary for the induction of peripheral tolerance in mature CD8+ T cells. *Immunology* 117, 248-261.
75. Legoux, F.P., Lim, J.B., Cauley, A.W., Dikiy, S., Ertelt, J., Mariani, T.J., Sparwasser, T., Way, S.S., Moon, J.J., 2015. CD4+ T Cell Tolerance to Tissue-Restricted Self Antigens Is Mediated by Antigen-Specific Regulatory T Cells Rather Than Deletion. *Immunity* 43, 896-908.
76. Levin, M., Romano, T., Matassa, K., De Guise, S., 2014. Validation of a commercial canine assay kit to measure pinniped cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*.

77. Lin, C.H., Chi, C.Y., Shih, H.P., Ding, J.Y., Lo, C.C., Wang, S.Y., Kuo, C.Y., Yeh, C.F., Tu, K.H., Liu, S.H., Chen, H.K., Ho, C.H., Ho, M.W., Lee, C.H., Lai, H.C., Ku, C.L., 2016. Identification of a major epitope by anti-interferon-gamma autoantibodies in patients with mycobacterial disease. *Nat Med* 22, 994-1001.
78. Liu, G., Tarbet, B., Song, L., Reiserova, L., Weaver, B., Chen, Y., Li, H., Hou, F., Liu, X., Parent, J., Umlauf, S., Shaw, A., Tussey, L., 2011. Immunogenicity and efficacy of flagellin-fused vaccine candidates targeting 2009 pandemic H1N1 influenza in mice. *PLoS One* 6, e20928.
79. Liu, Z., Xu, B., Nameta, M., Zhang, Y., Magdeldin, S., Yoshida, Y., Yamamoto, K., Fujinaka, H., Yaoita, E., Tasaki, M., Nakagawa, Y., Saito, K., Takahashi, K., Yamamoto, T., 2012. Profiling of kidney vascular endothelial cell plasma membrane proteins by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Exp Nephrol* 17, 327-337.
80. Lutz, H.U., Binder, C.J., Kaveri, S. 2009. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. In *Trends in Immunology*.
81. Maddur, M.S., Vani, J., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S., Bayry, J., 2010. Autoimmunity as a predisposition for infectious diseases. *PLoS Pathog* 6, e1001077.
82. Malhotra, D., Linehan, J.L., Dileepan, T., Lee, Y.J., Purtha, W.E., Lu, J.V., Nelson, R.W., Fife, B.T., Orr, H.T., Anderson, M.S., Hogquist, K.A., Jenkins, M.K., 2016. Tolerance is established in polyclonal CD4(+) T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol* 17, 187-195.
83. Mannon, P.J., Hornung, R.L., Yang, Z., Yi, C., Groden, C., Friend, J., Yao, M., Strober, W., Fuss, I.J., 2011. Suppression of inflammation in ulcerative colitis by interferon- β is accompanied by inhibition of IL-13 production. *Gut*.
84. Marodi, L., Cypowyj, S., Toth, B., Chernyshova, L., Puel, A., Casanova, J.L., 2012. Molecular mechanisms of mucocutaneous immunity against *Candida* and *Staphylococcus* species. *J Allergy Clin Immunol* 130, 1019-1027.
85. McGuire, S.M., Silva, J.C., Casillas, E.G., Townsend, C.A., 1996. Purification and characterization of versicolorin B synthase from *Aspergillus parasiticus*. Catalysis of the stereodifferentiating cyclization in aflatoxin biosynthesis essential to DNA interaction. *Biochemistry* 35, 11470-11486.
86. McVey, D.S., Rudd, R., Toshach, K., Moore, W.E., Keeton, K.S., 1989. Systemic autoimmune disease and concurrent nematode infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 195, 957-960.
87. Medina, T.S., Costa, S.P., Oliveira, M.D., Ventura, A.M., Souza, J.M., Gomes, T.F., Vallinoto, A.C., Povoia, M.M., Silva, J.S., Cunha, M.G., 2011. Increased interleukin-10 and interferon-gamma levels in *Plasmodium vivax* malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malar J* 10, 264.

- 88.Nanki, T., Onoue, I., Nagasaka, K., Takayasu, A., Ebisawa, M., Hosoya, T., Shirai, T., Sugihara, T., Hirata, S., Kubota, T., Harigai, M., Miyasaka, N. 2013. Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. In *Annals of the Rheumatic Diseases*.
- 89.Narazaki, M., Tanaka, T., Kishimoto, T. 2017. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. In *Expert Review of Clinical Immunology*.
- 90.Niemand, C., Nimmegern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P.C., Muller-Newen, G., 2003. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 170, 3263-3272.
- 91.Noack, M., Miossec, P. 2014. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. In *Autoimmunity Reviews*.
- 92.Patel, N.C., Chinen, J., Rosenblatt, H.M., Hanson, I.C., Brown, B.S., Paul, M.E., Abramson, S.L., Ritz, J., Shearer, W.T., 2008. Long-term outcomes of nonconditioned patients with severe combined immunodeficiency transplanted with HLA-identical or haploidentical bone marrow depleted of T cells with anti-CD6 mAb. *J Allergy Clin Immunol* 122, 1185-1193.
- 93.Patel, S.Y., Ding, L., Brown, M.R., Lantz, L., Gay, T., Cohen, S., Martyak, L.A., Kubak, B., Holland, S.M., 2005. Anti-IFN-gamma autoantibodies in disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *J Immunol* 175, 4769-4776.
- 94.Pedral-Sampaio, D.B., Netto, E.M., Brites, C., Badaro, R., 2002. Treating tuberculosis in AIDS patients: when to start and how long to keep giving drugs? *AIDS* 16, 1845.
- 95.Pedral-Sampaio, D.B., Netto, E.M., Brites, C., Bandeira, A.C., Guerra, C., Barberin, M.G., Badaro, R., 2003. Use of Rhu-GM-CSF in pulmonary tuberculosis patients: results of a randomized clinical trial. *Braz J Infect Dis* 7, 245-252.
- 96.Picard, C., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.L., Chatila, T., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Holland, S.M., Klein, C., Nonoyama, S., Ochs, H.D., Oksenhendler, E., Puck, J.M., Sullivan, K.E., Tang, M.L.K., Franco, J.L., Gaspar, H.B., 2015. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *Journal of Clinical Immunology*.
- 97.Pohl, M., Kawakami, N., Kitic, M., Bauer, J., Martins, R., Fischer, M.T., Machado-Santos, J., Mader, S., Ellwart, J.W., Misu, T., Fujihara, K., Wekerle, H., Reindl, M., Lassmann, H., Bradl, M., 2013. T cell-activation in neuromyelitis optica lesions plays a role in their formation. *Acta Neuropathol Commun* 1, 85.
- 98.Puel, A., & Casanova, J. L., 2013. Autoantibodies against cytokines: Back to human genetics. . *Blood*.
- 99.Puel, A., Doffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A.I., Ouache-Chardin, M., Toulon, A., Bustamante, J., Al-Muhsen, S., Al-

- Owain, M., Arkwright, P.D., Costigan, C., McConnell, V., Cant, A.J., Abinun, M., Polak, M., Bougnères, P.-F.o., Kumararatne, D., Marodi, L.s., Nahum, A., Roifman, C., Blanche, S.p., Fischer, A., Bodemer, C., Abel, L., Lilic, D., 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*.
100. Puel, A., Picard, C., Lorrot, M., Pons, C., Chrabieh, M., Lorenzo, L., Mamani-Matsuda, M., Jouanguy, E., Gendrel, D., Casanova, J.L., 2008a. Recurrent Staphylococcal Cellulitis and Subcutaneous Abscesses in a Child with Autoantibodies against IL-6. *The Journal of Immunology*.
101. Puel, A., Picard, C., Lorrot, M., Pons, C., Chrabieh, M., Lorenzo, L., Mamani-Matsuda, M., Jouanguy, E., Gendrel, D., Casanova, J.L., 2008b. Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. *J Immunol* 180, 647-654.
102. Rosen, L.B., Freeman, A.F., Yang, L.M., Jutivorakool, K., Olivier, K.N., Angkasekwina, N., Suputtamongkol, Y., Bennett, J.E., Pyrgos, V., Williamson, P.R., Ding, L., Holland, S.M., Browne, S.K., 2013. Anti-GM-CSF autoantibodies in patients with cryptococcal meningitis. *J Immunol* 190, 3959-3966.
103. Rosen, L.B., Rocha Pereira, N., Figueiredo, C., Fiske, L.C., Ressler, R.A., Hong, J.C., Gregg, K.S., Henry, T.L., Pak, K.J., Baumgarten, K.L., Seoane, L., Garcia-Diaz, J., Olivier, K.N., Zelazny, A.M., Holland, S.M., Browne, S.K., 2013. Nocardia-induced granulocyte macrophage colony-stimulating factor is neutralized by autoantibodies in disseminated/extrapulmonary nocardiosis. *Clin Infect Dis* 60, 1017-1025.
104. Rosenberg, J.M., Price, J.V., Barcenas-Morales, G., Ceron-Gutierrez, L., Davies, S., Kumararatne, D.S., Döffinger, R., Utz, P.J., 2016. Protein microarrays identify disease-specific anti-cytokine autoantibody profiles in the landscape of immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1.
105. Rosenblum, M.D., Remedios, K.A., Abbas, A.K., 2015. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest* 125, 2228-2233.
106. Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., Quackenbush, J., 2003, TM4: A Free, Open-Source System for Microarray Data Management and Analysis. *BioTechniques*.
107. Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T.E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrand, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F.J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D., Klucher, K.M., 2003. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4, 63-68.
108. Silva, J.C., Minto, R.E., Barry, C.E., 3rd, Holland, K.A., Townsend, C.A., 1996. Isolation and characterization of the versicolorin B synthase gene from *Aspergillus*

- parasiticus. Expansion of the aflatoxin b1 biosynthetic gene cluster. *J Biol Chem* 271, 13600-13608.
109. Sobansky, M.R., Hage, D.S., 2012. Analysis of Drug Interactions with Lipoproteins by High-Performance Affinity Chromatography. *Adv Med Biol* 53, 199-216.
110. Steelman, S.M., Johnson, D., Wagner, B., Stokes, A., Chowdhary, B.P., 2014. Cellular and humoral immunity in chronic equine laminitis. *Vet Immunol Immunopathol* 153, 217-226.
111. Stephen, L., 2006, Multiplex Immunoassay Profiling. *Methods Mol Biol* 1546, 169-176.
112. Strange, R.C., Ramachandran, S., Zeegers, M.P., Emes, R.D., Abraham, R., Raveendran, V., Boggild, M., Gilford, J., Hawkins, C.P., 2009. The Multiple Sclerosis Severity Score: associations with MC1R single nucleotide polymorphisms and host response to ultraviolet radiation. *Mult Scler* 16, 1109-1116.
113. Sweden, 2002. Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech: Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography, Reversed Phase Chromatography, In: Books Google. p. 019.
114. Tackey, E., Lipsky, P.E., Illei, G.G., 2004. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13, 339-343.
115. Takemura, H., Suzuki, H., Yoshizaki, K., Ogata, A., Yuhara, T., Akama, T., Yamane, K., Kashiwagi, H., 1992. Anti-interleukin-6 autoantibodies in rheumatic diseases. Increased frequency in the sera of patients with systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism*.
116. Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., Baccala, R., 2017. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol* 18, 716-724.
117. Thiele, A., 2009. Peptide microarrays for determination of cross-reactivity. *Methods Mol Biol* 524, 225-234.
118. Trapnell, B.C., Carey, B.C., Uchida, K., Suzuki, T., 2009. Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF stimulation of macrophages. *Curr Opin Immunol* 21, 514-521.
119. Venero, M., Ribaldone, G., 2018. New Onset of Inflammatory Bowel Disease in Three Patients Undergoing IL-17A Inhibitor Secukinumab: A Case Series. *Am J Gastroenterol*.
120. Vincent, T., Plawecki, M.I., Goulabchand, R., Guilpain, P., Eliaou, J.F.o. 2015. Emerging clinical phenotypes associated with anti-cytokine autoantibodies. In *Autoimmunity Reviews*.
121. Volin, M.V., Koch, A.E., 2018. Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Interferon Cytokine Res* 31, 745-751.

122. Wallace, D.J., Strand, V., Merrill, J.T., Popa, S., Spindler, A.J., Eimon, A., Petri, M., Smolen, J.S., Wajdula, J., Christensen, J., Li, C., Diehl, A., Vincent, M.S., Beebe, J., Healey, P., Sridharan, S., 2017. Efficacy and safety of an interleukin 6 monoclonal antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus: A phase II dose-ranging randomised controlled trial. *Annals of the Rheumatic Diseases*.
123. Wang, J., Bhatia, A., Cleveland, N.K., Gupta, N., Dalal, S., Rubin, D.T., Sakuraba, A., 2018. Rapid Onset of Inflammatory Bowel Disease after Receiving Secukinumab Infusion. 5, 4-6.
124. Wang, J., Li, G., Wang, Z., Zhang, X., Yao, L., Wang, F., Liu, S., Yin, J., Ling, E.A., Wang, L., Hao, A., 2012. High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes. *Neuroscience* 202, 58-68.
125. Warnberg, J., Nova, E., Moreno, L.A., Romeo, J., Mesana, M.I., Ruiz, J.R., Ortega, F.B., Sjostrom, M., Bueno, M., Marcos, A., 2006. Inflammatory proteins are related to total and abdominal adiposity in a healthy adolescent population: the AVENA Study. *Am J Clin Nutr* 84, 505-512.
126. Watanabe, M., Uchida, K., Nakagaki, K., Kanazawa, H., Trapnell, B.C., Hoshino, Y., Kagamu, H., Yoshizawa, H., Keicho, N., Goto, H., Nakata, K., 2007. Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals. *FEBS Letters*.
127. Watanabe, M., Uchida, K., Nakagaki, K., Trapnell, B.C., Nakata, K. 2010. High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: Pathogenesis and mechanisms. In *Cytokine and Growth Factor Reviews*.
128. Winthrop, K.L., Chang, E., Yamashita, S., Iademarco, M.F., LoBue, P.A., 2009. Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Emerg Infect Dis* 15, 1556-1561.
129. Wolff, A.S., Sarkadi, A.K., Marodi, L., Karner, J., Orlova, E., Oftedal, B.E., Kisand, K., Olah, E., Meloni, A., Myhre, A.G., Husebye, E.S., Motaghedi, R., Perheentupa, J., Peterson, P., Willcox, N., Meager, A., 2013. Anti-cytokine autoantibodies preceding onset of autoimmune polyendocrine syndrome type I features in early childhood. *J Clin Immunol* 33, 1341-1348.
130. Yeboa, D.N., Liao, K.P., Guadagnolo, B.A., Rao, G., Bishop, A., Chung, C., Li, J., Tatsui, C.E., Rhines, L.D., Ferguson, S., Paulino, A.C., Ghia, A.J., 2017. National Patterns of Care in the Management of World Health Organization Grade II and III Spinal Ependymomas. *World Neurosurg*.
131. Yu, W., Jiang, N., Ebert, P.J., Kidd, B.A., Muller, S., Lund, P.J., Juang, J., Adachi, K., Tse, T., Birnbaum, M.E., Newell, E.W., Wilson, D.M., Grotenbreg, G.M., Valitutti, S., Quake, S.R., Davis, M.M., 2015. Clonal Deletion Prunes but Does Not Eliminate Self-Specific alphabeta CD8(+) T Lymphocytes. *Immunity* 42, 929-941.
132. Zerweck, J., Masch, A., Schutkowski, M., 2009. Peptide microarrays for profiling of modification state-specific antibodies. *Methods Mol Biol* 524, 169-180.

133. 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.
134. Zlotnik, A., Yoshie, O., 2012. The chemokine superfamily revisited. Immunity 36, 705-716.

11. APÉNDICES

11.1. Apéndice 1.

Número	Citocina	Porcentaje de homología	Número de acceso GenBank Proteína/PDB® Citocina humana	Número de acceso GenBank Proteína/PDB® Citocina canina	Matriz de identidad (%)
1	IL-17A	99.1	NP_002181.1	UPI0001B05147	94.5
2	G-CSF	99.0	AJC19277.1	1BGD_A	99.2
3	IL-6	98.9	P05231.1	AAA83030.1	98.8
4	IFN- γ	98.6	NP_000610.2	NP_001003174.1	98.6
5	IL-10	98.3	P48411.1	NP_001003077.1	97.4
6	IL-17F	97.6	AAC50341.1	BAH89243.1	91.5
7	IL-23	97.2	NP_057668.1	NP_112542.1	93
8	IL-21	97.0	NP_001193935.1	NP_001003347.1	90.9
9	IL-22	96.9	AAH69308.1	XP_025332317.1	90.3
10	GM-CSF	95.6	AAA52578.1	NP_001003245.1	92.6
11	BSA	93.1	NP_851335.1	-	-
12	IFN- λ	92.8	NP_742152.1	AGN92945.1	91.1
13	IFN β	92.8	NP_002167.1	AYN61080.1	89
14	IL-2	88	AAB46883.1	NP_001003305.1	82
16	IL-28	79	AAR24510.1	NP_742152.1	81.1
17	IL-27	77.6	AAH62422.1	NP_663611.1	72.9
18	IL-15	76	NP_001184117.1	NP_001184117.1	79.3
19	TGF- β	67	NP_000651.3	NP_001003309.1	77
20	IL-12	64	AAB36675.1	NP_001003293.2	54
21	TNF- α	56	BAF31279.1	NP_001003244.4	65.5
22	IL-18	42.5	AAH07461.1	NP_001003169.1	62
23	IL-8	41.6	NP_001341769.1	NP_001003200.1	49
24	IL-1 β	33	NP_000567.1	CAA93909.1	22
25	IFN κ	21	NP_064509.2	NP_001271393.1	13
26	IFN- α	19.3	AAA52724.1	AAA30852.1	15
15	LT- α	14.5	AAP51435.1	NP_001300778.1	11
27	IL-1 α	12	NP_000566.3	NP_001003157.2	12
28	IFN- ω	9.7	NP_00945001.1	AAB27160.1.3	11
29	Blankbead	-	Internal control	-	-
30	LPS	7.8	NP_006138.1	XP_025285611.1	10
31	IL-33	19.5	NP_001340731.1	NP_001003180.1	19
32	IL-25	-	AAI04932.1	NA	-
33	IL-6Ra	79.3	NP_000591.1	NP_001003301.1	70
34	IL-10 viral	-	1VLK_A	NA	-
35	IL-26	-	NP_060872.1	NA	-

Tabla 1. Homología entre citocinas caninas y humanas.

Número	Citocina	Porcentaje de homología	Número de acceso GenBank Proteína/PDB® Citocina humana	Número de acceso GenBank Proteína/PDB® Citocina equina	Matriz de identidad (%)
1	IL-17A	97.3	NP_002181.1	NP_001137264.1	94.5
2	G-CSF	96.1	AJC19277.1	NP_001296316.1	95
3	IL-6	95.7	P05231.1	AAB87703.1	97
4	IFN γ	95.0	NP_000610.2	NP_001075418.1	92
5	IL-10	93.8	P48411.1	NP_001075959.1	98
6	IL-17F	93.1	AAC50341.1	AAG52985.1	94
7	IL-23	92.5	NP_057668.1	NP_001075991.1	92
8	IL-21	-	NP_001193935.1	NA	-
9	IL-22	-	AAH69308.1	NA	-
10	GM-CSF	92.2	AAA52578.1	NP_001075351.1	90
11	BSA	81.3	NP_851335.1		69
12	IFN λ	-	NP_742152.1	NA	-
13	IFN β	81.3	NP_002167.1	NP_001092910.1	78
14	IL-2	74.5	AAB46883.1	NP_001078902.1	72
16	IL-28	-	AAR24510.1	NA	-
17	IL-27	-	AAH62422.1	NA	-
18	IL-15	-	NP_001184117.1	NA	-
19	TGF β	71.8	NP_000651.3	XP_005596143.1	43
20	IL-12	45.8	AAB36675.1	NP_001075985.1	42
21	TNF α	82.4	BAF31279.1	NP_001075288.2	82
22	IL-18	34.6	AAH07461.1	NP_001075981.1	28
23	IL-8	49.1	NP_001341769.1	NP_001077420.2	42
24	IL-1 β	44.5	NP_000567.1	NP_001075995.1	38
25	IFN κ	42.7	NP_064509.2	NP_001075995.1	12
26	IFN α	19.8	AAA52724.1	NP_001108010.1	39
15	LT α	76.6	AAP51435.1	XP_001491010.1	79
27	IL-1 α	34.8	NP_000566.3	NP_001075969.2	39
28	IFN ω	23.2	NP_005500	XP_023482956.1	30
29	Blank bead	-	Internal control	-	-
30	LPS	-	NP_006138.1	AAU95609.1	-
31	IL-33	-	NP_001340731.1	NA	-
32	IL-25	-	AAI04932.1	NA	-
33	IL-6Ra	49.7	NP_000591.1	NP_001075965.2	11
34	IL-10 viral	-	1VLK_A	NA	-
35	IL-26	-	NP_060872.1	NA	-

Tabla 2. Homología entre citocinas equinas y humanas.

Grupo de enfermedad	Número de pacientes (n = 51)
1)Autoinmunidad (AID)	n = 26
Lupus eritematoso sistémico	5
Pénfigo	4
Miositis autoimmune generalizada	3
Queratitis ulcerativa inmunomediada	5
Artritis reumatoide	2
Tiroiditis	2
Miastenia Gravis	2
Epidermólisis bullosa adquirida	3
2) Autoinflamación (AUI)	n = 6
Enfermedad inflamatoria intestinal	4
Miositis masticatoria	2
3) Enfermedades infecciosas (ID)	n = 17
Infección por bacterias extracelulares	1
Infección por bacterias intracelulares	3
Infección fúngica	9
Infección viral	4
3) Otras enfermedades (OD)	
Cáncer	2
4)Controles negativos (HC) individuos clínicamente sanos	50

Tabla 3. Características clínicas de caninos.

Grupo de enfermedad	Número de pacientes (n = 50)
1) Autoinmunidad/Autoinflamación (AID/AUI)	n = 20
Artritis y laminitis	7
Fibromialgia	4
Poliradiculoneuropatía	3
Queratitis ulcerativa inmunomediada	2
Pénfigo	4
2) Enfermedades infecciosas (ID)	n = 30
Infecciones bacterianas	13
Infecciones virales	11
Infecciones fúngicas	6
3) Controles negativos (HC) individuos clínicamente sanos	50

Tabla 4. Características clínicas de equinos.

Grupo de enfermedad	No. de pacientes (n = 50)
1)Autoinmunidad/Autoinflamación (AID/AUI)	n = 133
Timoma	20
Síndrome autoinflamatorio	60
Lupus eritematoso sistémico	5
IBD-Enfermedad inflamatoria intestinal	38
Diabetes Mellitus Tipo II	10
2) Enfermedad infecciosa (ID)	n = 126
Infecciones bacterianas NTM	20
Tuberculosis	15
Salmonelosis	20
Listeriosis	5
Infecciones fúngicas	46
Infecciones virales	20
3)Enfermedad autoimmune e infecciosa (AID/ID)	n = 10
Proteinosis alveolar pulmonar e infección fúngica	5
Enfermedad celiaca y Candidiasis	3
IBD- Burkholderia	2
4)Otras enfermedades (OD)	n = 32
Mutaciones genéticas	15
APS-1	4
CMC	3
Timoma y mutación	5
Inmunodeficiencia RAG	5
5) Controles sanos (HC)	n = 50

Tabla 5. Características clínicas de humanos .

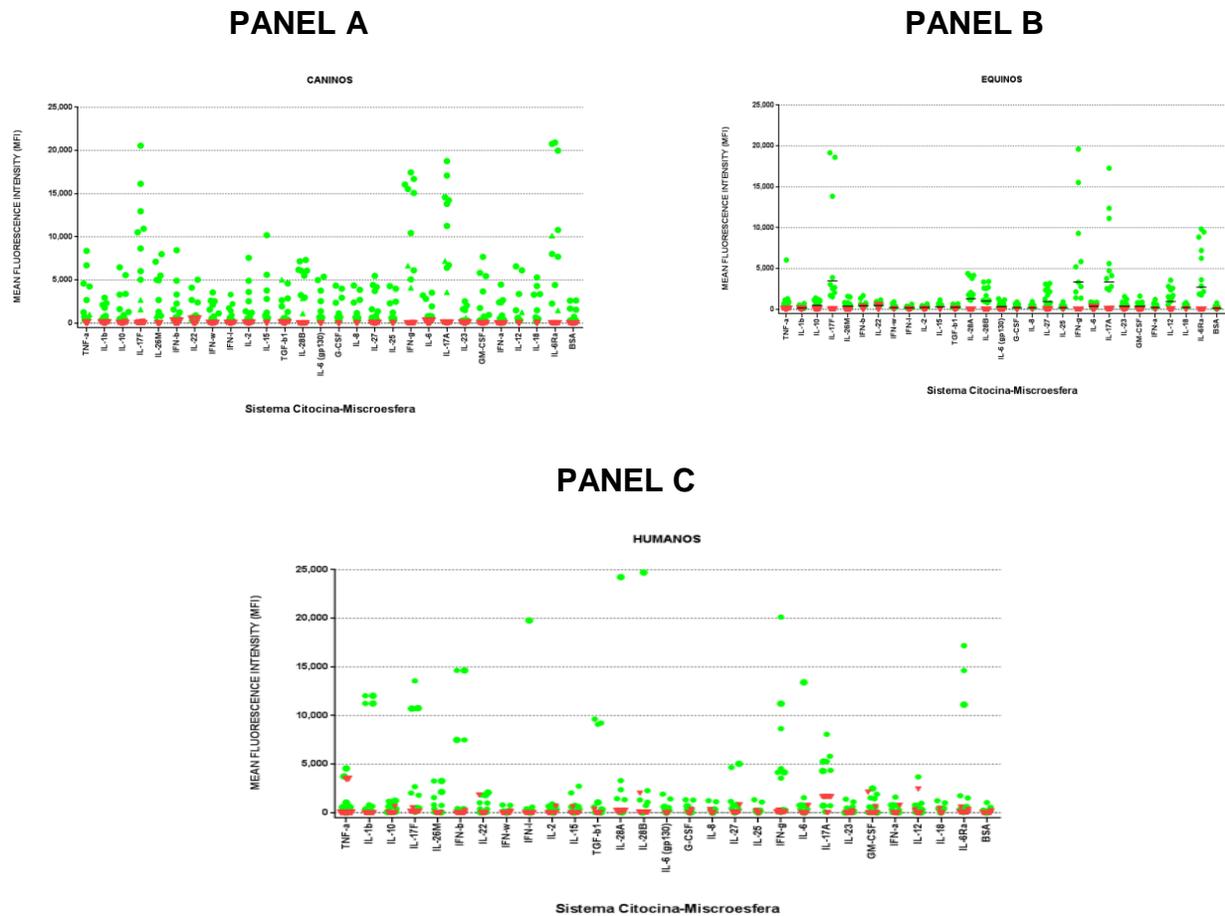


Figura 6.1. Determinación de la dilución óptima de trabajo para el análisis serológico de autanticuerpos anti-citocinas mediante el ensayo multiplex. Se incluyeron muestras séricas de (●) pacientes (n = 10) y (▼) controles negativos (n =10), **PANEL A, caninos y **PANEL B**, Equinos y **PANEL C**, Humanos.**

Subgrupo	Edad Genero (F/M*)	AUTOINMUNIDAD/AUTOINFLAMACION														
		Clasificación de citocinas reconocidas por los autoanticuerpos														
		Interferones					Citocinas Th17					Otras citocinas				
		IFN α	IFN β	IFN ω	IFN γ	IFN λ	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-22	IL-23	IL-2	IL-6	IL-10	GM-CSF	G-CSF
Lupus eritematoso sistémico	2 (F) P24a	240	720	800	1320	1020	475	15020	1320	1019	870	130	325	75	309	1920
	2 (F) P1	374	355	653	27578	980	3131	2411	10829	3018	451	779	1689	9012	818	567
	7 (M) P18	1114	1106	304	16232	520	2930	18233	968	3750	382	3341	15965	9123	809	853
	9 (F) P45	2613	6181	1631	24550	10532	16297	594	3640	4942	3823	7274	708	11717	2859	531
	3 (F) P49	974	771	876	24273	6975	3174	65	3528	2108	2202	12240	40	5595	2104	82
Pénfigo	4 (M) P17	845	1486	177	2745	13092	5216	21923	1244	1203	1742	1164	2394	1314	657	1927
	2 (F) P16	464	821	1077	1280	18734	16573	22345	101	16983	22321	5178	5726	922	3568	2216
	6 (M) P12	680	665	587	1755	580	5252	21098	1854	788	15023	2927	4109	1058	884	2935
	5 (M) P46	753	518	730	12177	2528	2363	217	2108	1895	4857	3305	125	5743	1508	492
Miositis autoinmune	6 (F) P2	655	566	330	6056	15965	405	2027	21987	2497	2027	780	892	1496	320	561
	4 (M) P19	3258	2765	1069	2253	1289	1496	2483	1593	6908	2483	18992	906	1237	2628	4519
	6(F) P15	1387	765	580	16232	813	18	151	109	79	151	15883	12	129	529	9
Queratitis ulcerativa inmunomediada	6(F) P26	621	209	1820	8111	342	0	0	213	124	87	312	12	123	181	56
	4(M) P14	1891	1036	2943	2322	589	101	2345	2436	98	2675	6265	12675	21339	700	343
	6 (M) P28	3912	5585	750	1226	1321	19843	21344	704	1019	2533	1453	2038	6683	1456	823
	3(F) P5	4871	114	520	973	2586	15012	2395	2326	5351	2395	6696	2544	18734	218	2442
	4(M) P32	450	357	808	15021	22311	1009	2396	945	5517	2359	5999	6613	18546	444	4123
Artritis reumatoide	7(F) P22	1304	1392	486	1731	19843	15123	1802	1017	839	1802	3224	1637	956	729	1226
	8(M) P11	703	880	983	212	1069	18932	217	4007	3246	1934	2041	16754	4566	878	1999
Tiroiditis	2(F) P31	2675	113	484	16456	71	4339	1913	1025	914	1191	1193	2109	14492	18992	1959
	10(F)	2613	1422	1410	17654	206	18734	397	301	238	4252	444	717	22398	238	606

	P44															
Miastenia Gravis	6(F) P35	711	527	596	2113	750	6849	1114	2140	1045	1119	4430	2696	1050	1107	1366
	3(F) P36	364	442	371	2533	363	1172	2440	1364	6544	204	6775	15012	16781	527	4646
Epidermolisis bullosa	1(M) P6	1481	2011	450	17893	90	21123	594	1270	2411	173	1945	2235	23144	1331	800
	1(M) P41	1354	1050	248	204	1410	605	4511	3670	1282	4511	19238	458	22345	883	497
	2 (M) P13	2	611	827	2447	260	3872	2392	1189	19267	2392	4965	2290	6775	487	1631
Total de sueros positivos a altos niveles de autoAb		0	0	0	9	4	8+6=14	1	2	2	3	3	7	1	0	

Tabla 6. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en perros con enfermedad autoinmune (n = 26). El **color negro** representa los valores MFI ≤ 10000 , el **color azul** representa los valores MFI ≥ 10000 y < 15000 , el **color rojo** representa los MFI ≥ 15000 . Las abreviaciones en los títulos muestran la clasificación de los principales grupos de citocinas encontrados: IL's = Interleucinas; IFN's; familia de interferones; PIC= citocinas proinflamatorias; AIC = citocinas anti-inflamatorias y GF = factores de crecimiento.

Subgrupo	Edad Género (F/M*)	ENFERMEDADES INFECCIOSAS														
		Clasificación de citocinas reconocidas por los autoanticuerpos														
		Interferones					Citocinas producidas por Th17					Otras citocinas				
		IFN α	IFN β	IFN ω	IFN γ	IFN λ	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-22	IL-23	IL-2	IL-6	IL-10	GM-CSF	G-CSF
Bacteria extracelular	9(F) P3 <i>E. Coli</i>	3072	1330	71	1383	564	<u>18992</u>	<u>24345</u>	11043	986	10532	3342	4466	6075	662	986
Bacteria intracelular	5(F) P21 <i>Streptococcus pyogenes</i>	1108	746	289	2196	486	17843	1961	9043	9154	12043	1430	933	4081	527	990
	1(F) P42 <i>Salmonella</i>	1154	624	1321	21934	360	362	198	5665	382	232	664	255	563	382	134
	2(M) P47 <i>Chlamydia</i>	231	345	1101	67	890	3400	876	11	234	401	804	1021	943	2311	2466
Infección viral	1(F) P40 Distemper	904	1200	1665	16566	1203	4267	1289	1319	785	2044	6389	2659	15433	1829	2254
	10(M) P23 CAV-2	1694	1364	362	2779	808	837	6118	3857	2764	6118	3322	654	5181	722	458
	9(M) P24 Distemper	2545	448	1436	19998	371	373	1968	1219	2413	1968	813	875	15011	691	537
	2(M) P48 Distemper	711	863	1207	21246	23	4472	419	2635	1623	859	6415	681	7343	2201	162
Infección fúngica	2(F) P38 <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	295	305	239	2595	362	24588	1528	842	4945	1582	2214	3687	18019	1036	1559
	4(F) P9 <i>Microsporium</i>	974	39	213	19045	32	15433	151	848	3122	1520	1932	1976	4783	20	1916
	2(F) P10 <i>Microsporium</i>	1176	403	281	1211	330	42	16045	8009	55	41	9	25	16346	283	157
	4(H) P39 <i>Histoplasma capsulatum</i>)	1756	1198	363	2306	1436	3607	1055	1307	6514	1085	4215	2064	799	720	1661

1(F) P8 Infección fúngica	701	694	258	653	587	1488	1117	848	3005	1176	2233	1139	21803	844	1400
1(M) P4 <i>Malassezia</i> <i>pachydermatis</i>	2051	98	1680	21342	18320	2413	1168	9932	2708	1169	1573	1271	3555	450	1153
4(H) P7 <i>Microsporum</i> <i>canis</i>	1646	1339	188	16093	161	1	6755	453	15921	569	554	908	22388	2411	2
10 (M) P50 <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	671	643	411	24001	2133	3214	219	3400	1727	1562	19375	131	8585	4611	61
4(M) P27 <i>Microsporum</i> <i>canis</i>	2337	1159	260	123	1091	18234	19830	4641	1871	6117	1397	721	4648	806	432
Total de sueros positivos a altos niveles de autoAb	0	0	0	8	1	6	0	1	0	1	0	6	0	0	

Tabla 7. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en perros con enfermedad infecciosa (n = 17). El **color negro** representa los valores MFI ≤ 10000 , el **color azul** representa los valores MFI ≥ 10000 y < 15000 , el **color rojo** representa los valores MFI ≥ 15000 . Las abreviaciones en los títulos muestran la clasificación de los principales grupos de citocinas encontrados: IL's = Interleucinas; IFN's; familia de interferones; PIC= citocinas proinflamatorias; AIC = citocinas anti-inflamatorias y GF = factores de crecimiento.

Subgrupo	Edad Género (F/M*)	AUTOINMUNIDAD/AUTOINFLAMACION														
		Clasificación de citocinas reconocidas por los autoanticuerpos														
		Interferones					Citocinas producidas por Th17					Otras citocinas				
		IFN α	IFN β	IFN ω	IFN γ	IFN λ	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-22	IL-23	IL-2	IL-6	IL-10	GM-CSF	G-CSF
Enfermedad inflamatoria Intestinal	2(M) P43	1000	167	258	218	91	552	1584	4605	193	2021	720	970	<u>1845</u> 6	<u>16232</u>	366
	5(F) P20	753	777	265	2180	983	<u>19231</u>	1650	712	6145	1635	203	1763	<u>1765</u> 0	2379	1130
	2(M) P37	495	1188	1091	2350	2482	5479	1642	1358	<u>1821</u> 1	1642	492 0	2148	1729	1959	1888
	8(F) P34	1636	<u>1674</u> 5	996	1723	1061	1914	1429	1038	4135	1428	135 5	<u>1250</u> 0	4969	3100	1760
Miositis masticatoria	4(M) P33	811	441	1289	2410	258	<u>12011</u>	<u>23211</u>	1116	5938	2378	589 8	<u>1592</u> 1	6044	475	1211
	6(H) P25	602	448	452	1459	<u>1002</u> 3	373	<u>17834</u>	<u>18731</u>	2413	834	191 5	875	211	691	537
Total de sueros positivos a altos niveles de autoAb		0	1	0	0	1	1+2=3		1	1	0	0	1	2	1	0

Tabla 8. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en perros con enfermedad autoinflamatoria (n = 6). El **color negro** representa los valores MFI < 10000, el **color azul** representa los valores MFI \geq 10000 y < 15000, el **color rojo** representa los MFI \geq 15000. Las abreviaciones en los títulos muestran la clasificación de los principales grupos de citocinas encontrados: IL's = Interleucinas; IFN's; familia de interferones; PIC= citocinas proinflamatorias; AIC = citocinas anti-inflamatorias y GF = factores de crecimiento.

Subgrupo	Edad Género (F/M*)	CÁNCER														
		Clasificación de citocinas reconocidas por los autoanticuerpos														
		Interferones					Citocinas producidas por Th17					Otras citocinas				
		IFN α	IFN β	IFN ω	IFN γ	IFN λ	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-22	IL-23	IL-2	IL-6	IL-10	GM-CSF	G-CSF
7(M) P30 Linfoma	256	485	1942	21993	450	3	49	4	23	49	4	1	22	16232	16743	
9(H) P29 Leucemia mieloide aguda	669	907	722	15403	827	2807	1507	1282	11046	1507	3255	19092	778	1867	982	
Total de sueros positivos a altos niveles de autoAb	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	

Tabla 9. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en perros con cáncer (n = 2). El **color negro** representa los valores MFI < 10000, el **color azul** representa los valores MFI ≥ 10000 y < 15000, el **color rojo** representa los MFI ≥ 15000 . Las abreviaciones en los títulos muestran la clasificación de los principales grupos de citocinas encontrados: IL's = Interleucinas; IFN's; familia de interferones; PIC= citocinas proinflamatorias; AIC = citocinas anti-inflamatorias y GF = factores de crecimiento.

Identificación	INDIVIDUOS CLINICAMENTE SANOS-CONTROLES NEGATIVOS														
	Clasificación de citocinas reconocidas por los autoanticuerpos														
	Interferones					Citocinas producidas por Th17					Otras citocinas				
	IFN α	IFN β	IFN ω	IFN γ	IFN λ	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-22	IL-23	IL-2	IL-6	IL-10	GM-CSF	G-CSF
C1 Healthy Control	0.0	0.0	0.0	207.0	1.0	6.0	296.0	0.0	0.0	0.0	11.5	3347.5	19.5	0.0	81.8
C2 Healthy Control	1176.0	1474.3	1950.8	2101.0	1.0	1091.0	284.5	3152.3	2519.3	1539.0	5999.0	139.3	199.0	2387.0	149.0
C3 Healthy Control	700.8	622.8	989.3	669.0	3.0	1666.5	200.5	2205.8	1392.0	731.8	719.4	318.3	5410.5	1470.5	79.0
C4 Healthy Control	903.5	769.5	1515.8	3054.0	0.0	2011.3	303.8	2330.8	1529.5	939.0	5133.0	160.8	5999.0	1547.0	100.5
C5 Healthy Control	2050.8	993.0	1328.0	383.0	2.0	5999.0	143.3	2782.5	3170.5	1566.3	5663.0	5999.0	566.0	1892.8	71.3
C6 Healthy Control	1646.3	2317.3	1866.0	795.0	14.0	5999.0	689.5	3457.5	3567.8	2069.5	3211.0	536.0	1256.0	2697.8	478.5
C7 Healthy Control	3.3	1.5	1.8	63.0	5.0	16.0	756.5	0.5	5.5	8.3	15.5	248.0	18.8	1.0	484.0
C8 Healthy Control	565.8	587.0	376.3	2951.0	50.0	2919.8	373.8	1521.5	864.3	783.0	3578.5	79.5	3919.5	1014.8	99.3
C9 Healthy Control	1636.3	1950.3	1424.0	1242.0	2.0	3133.7	422.5	2527.5	3049.0	5999.0	4157.8	270.8	298.0	1724.0	104.5
C10 Healthy Control	621.0	358.8	395.8	1001.0	431.0	1130.5	295.5	932.0	933.5	761.0	1443.3	172.5	4705.5	606.5	154.0
C11 Healthy Control	2675.0	2414.5	1230.8	1158.0	4.0	5999.0	223.5	2021.0	4605.3	2707.3	301.0	196.0	399.0	1610.0	90.8
C12 Healthy Control	294.5	157.0	208.3	1871.0	0.0	770.0	564.5	823.0	640.0	1218.3	1130.3	101.3	1997.5	513.8	107.0
C13 Healthy Control	1445.5	1114.0	1349.0	2972.0	2.0	4084.8	298.3	2164.5	3200.5	1910.0	2500.0	1556.5	264.7	1583.3	181.0
C14 Healthy Control	2206.5	2326.0	2264.8	2573.0	10.0	3895.5	262.5	2759.5	2732.0	2659.5	5999.0	1042.8	1991.0	1852.5	286.5
C15 Healthy Control	1489.0	1083.8	2421.3	869.0	1.0	3673.3	2486.5	1864.0	3459.0	2227.3	4920.5	182.5	1616.0	1312.5	700.3
C16 Healthy Control	1933.5	2490.0	2154.3	58.0	9.0	5999.0	298.8	2480.0	3102.0	2806.8	311.0	745.3	766.5	1717.0	628.5
C17 Healthy Control	3518.0	4581.0	1773.0	1879.0	15.0	1245.4	304.8	2373.5	5999.0	4819.5	121.9	209.0	387.0	1938.3	319.8
C18 Healthy Control	189.0	165.0	329.5	521.0	1.0	506.3	547.5	725.3	307.0	230.0	1889.0	339.8	3135.5	478.0	363.0
C19 Healthy Control	1965.0	885.5	2228.8	91.8	33.0	218.4	1029.8	2181.0	4321.0	2211.0	3806.0	148.3	907.0	1408.0	73.3
C20 Healthy Control	477.3	371.8	374.8	844.0	810.0	2245.8	269.5	1425.8	1049.8	2289.0	2346.0	72.0	1022.6	768.5	42.8

C21 Healthy Control	1.5	-0.5	-0.5	-81.7	4.0	6.0	280.5	-6.8	-0.5	1.8	11.5	168.3	9.3	-3.5	124.3
C22 Healthy Control	1290.8	591.5	825.8	1837.0	1.0	3990.3	173.3	1654.5	2205.0	973.8	3849.3	85.5	395.0	1095.5	117.3
C23 Healthy Control	868.8	467.5	319.3	1667.0	3.0	769.5	723.8	1234.0	812.5	933.5	1704.5	298.3	1667.0	738.5	1519.8
C24 Healthy Control	415.5	521.0	349.0	1869.0	661.0	395.8	480.0	613.8	772.0	217.0	961.0	161.5	1393.5	441.8	88.8
C25 Healthy Control	3211.3	4411.8	1544.8	1448.0	7.0	2145.0	160.5	3574.8	5837.5	4426.3	5999.0	215.3	2287.0	2276.5	123.5
C26 Healthy Control	78.8	54.5	116.0	719.8	2.0	237.3	316.5	225.3	198.0	135.0	161.5	373.0	827.5	185.5	79.0
C29 Healthy Control	606.3	410.3	863.3	848.5	3.0	2189.8	268.8	2357.0	1264.0	712.3	984.6	159.5	3163.0	1859.5	140.5
C30 Healthy Control	3.0	0.0	0.0	3549.0	2.0	10.5	138.3	28.3	4.5	2.5	335.3	86.0	75.0	23.8	130.8
C31 Healthy Control	4.0	0.8	1.0	437.0	13.0	11.0	246.0	4.5	3.0	0.5	24.0	87.8	37.5	2.5	100.8
C32 Healthy Control	812.0	565.8	530.8	439.8	8.0	1750.5	338.0	1107.3	1341.0	2606.8	1059.3	248.8	1395.0	705.3	314.5
C33 Healthy Control	953.8	1484.8	1372.5	2431.0	8.0	3236.3	666.3	3156.5	2095.0	1345.3	2105.0	552.5	366.4	1990.5	804.0
C34 Healthy Control	2596.3	2403.8	1758.5	3535.0	8.0	543.0	248.5	3148.0	3910.8	3850.5	659.0	161.5	2177.3	2329.8	41.0
C35 Healthy Control	788.3	446.0	644.5	1610.0	8.0	992.0	242.8	1741.5	1668.0	1078.3	2659.0	54.5	644.3	1550.8	52.5
C36 Healthy Control	782.8	542.0	529.8	1753.0	6.0	2736.3	126.0	1422.5	1351.8	746.3	2109.0	64.5	155.0	1086.0	117.8
C37 Healthy Control	421.5	299.8	258.8	3051.0	4.0	2320.8	565.5	1094.3	898.0	1547.3	1356.8	737.8	2671.3	706.3	469.8
C38 Healthy Control	4048.0	546.0	2501.3	2141.0	1.0	298.0	512.8	2964.5	339.0	94.5	437.0	172.0	1956.7	2673.5	272.8
C39 Healthy Control	2087.5	1240.3	1777.8	176.8	1.0	1490.0	306.0	2427.0	3501.0	2245.5	2167.2	388.8	377.8	1769.3	101.5
C40 Healthy Control	551.5	660.3	904.3	1327.0	1.0	2227.0	878.8	1436.8	1313.8	989.0	1258.8	136.0	1912.5	982.5	178.0
C41 Healthy Control	296.5	18.0	115.5	1458.8	0.0	0.0	0.0	11.3	4.8	414.5	183.8	0.0	5.5	516.8	34.0
C42 Healthy Control	288.3	7.5	83.0	675.0	1.5	6.3	0.0	12.0	3.5	1945.0	1058.5	0.0	4.3	6.0	667.0
C43 Healthy Control	265.8	11.0	139.3	355.5	0.0	3.5	0.0	13.0	71.8	438.3	208.5	0.0	5.0	389.0	66.0
C44 Healthy Control	204.3	2.0	84.8	234.0	394.5	268.0	150.8	13.5	4.0	514.8	334.3	81.8	5.5	789.0	5.5
C45 Healthy Control	356.5	14.0	98.0	32.0	42.0	0.0	0.0	6.5	4.5	387.0	176.3	0.0	5.5	99.0	112.3

C46 Healthy Control	188.0	471.0	229.3	192.3	450.8	373.3	428.5	102.3	257.0	82.5	4.0	409.5	193.8	144.0	12.3
C47 Healthy Control	593.3	327.8	605.3	226.0	558.0	249.3	359.0	133.5	336.0	197.5	4.3	274.5	2134.0	787.5	63.3
C48 Healthy Control	468.5	106.3	95.3	71.5	50.5	155.0	121.5	102.0	493.5	106.5	6.0	75.8	433.5	539.0	13.0
C49 Healthy Control	104.5	252.5	120.3	126.5	205.3	195.8	419.5	130.5	101.3	99.3	5.0	74.5	101.3	297.0	4.5
C50 Healthy Control	92.5	83.8	204.3	84.0	80.5	72.3	117.3	151.3	165.3	88.0	8.5	143.5	102.8	112.8	3.0
Total de sueros positivos a altos niveles de autoAb	0	0	0	0		0									

Tabla 10. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en perros controles clínicamente sanos (n = 50). El **color negro** representa los valores promedio MFI < 7000. Las abreviaciones en los títulos muestran la clasificación de los principales grupos de citocinas encontrados: IL's = Interleucinas; IFN's; familia de interferones; PIC= citocinas proinflamatorias; AIC = citocinas anti-inflamatorias y GF = factores de crecimiento.

Subgrupo	Paciente	ENFERMEDADES AUTOINMUNES						
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados						
		Interferones		Citocinas proinflamatorias/Citocinas producidas por Th17				CAI
		IFN γ	IFN λ	IL-6	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-10
Artritis y laminitis	AID A/L (1)	4862	1327	143	35	4542	34	20
Artritis y laminitis	AID A/L (2)	11325	389	8630	709	24690	3671	861
Artritis y laminitis	AID A/L (3)	26505	517	9971	953	27234	2548	3342
Artritis y laminitis	AID A/L (3)	1862	1519	695	75	21433	236	36
Artritis y laminitis	AID A/L (4)	14811	1277	8317	1167	23882	3058	1325
Artritis y laminitis	AID A/L (5)	5107	2829	16241	1025	24474	10066	1059
Artritis y laminitis	AID A/L (6)	7108	435	4726	1627	12994	2634	2022
Fibromialgia equina	AID FM (7)	19088	2271	13133	1889	22278	3909	2374
Fibromialgia equina	AID FM (8)	12054	429	2956	747	5055	2003	1180
Fibromialgia equina	AID FM (9)	6354	1192	3169	1144	14661	2904	1997
Fibromialgia equina	AID FM (10)	528	418	16581	1516	9887	4687	2215
Poliradiculoneuritis	AID PRN (12)	6681	325	2943	2287	4381	2132	2892
Poliradiculoneuritis	AID PRN (13)	4868	347	38	1	13862	4	2
Poliradiculoneuritis	AID PRN (14)	55	632	2901	904	11086	1113	602
Poliradiculoneuritis	AID PRN (15)	3335	294	4128	1061	3228	5072	1302
Poliradiculoneuritis	AID PRN (16)	7690	229	5313	1921	5848	1189	22877
Pénfigo	AID P (17)	8826	288	5753	2379	3975	1736	772
Pénfigo	AID P (18)	5367	299	4994	892	3427	2730	1078
Pénfigo	AID P (19)	8538	434	4597	489	6654	16857	12
Pénfigo	AID P (20)	3589	554	993	789	667	15690	2098
Total de muestras con altos niveles de autoAb's		2	0	2	0	6	2	1

Tabla 11. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en equinos con enfermedades autoinmunes (n = 20). El color negro representa valores MFI < 10000, el color azul representa valores de MFI entre 10000 y 15000, mientras que el color rojo representa valores MFI \geq 15000. Th17-citocinas Th17; CAI- citocinas anti-inflamatorias; OC- otras citocinas; FC- factores de crecimiento.

Subgrupo	Paciente	ENFERMEDADES INFECCIOSAS						
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados						
		Interferones		Citocinas proinflamatorias/Citocinas producidas por Th17				CAI
		IFN γ	IFN λ	IL-6	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-10
Infección bacteriana	ID IB (21)	6127	418	6488	661	4130	3040	1014
Infección bacteriana	ID IB (22)	23185	366	12325	699	4631	13404	853
Infección bacteriana	ID IB (23)	1097	393	14	20	3850	92	54
Infección bacteriana	ID IB (24)	6261	257	10133	728	4553	2315	3182
Infección bacteriana	ID IB (25)	4140	658	16507	1378	3520	23248	3315
Infección bacteriana	ID IB (26)	3999	1328	3450	787	4445	2286	2068
Infección bacteriana	ID IB (27)	6076	549	9364	959	3522	3592	2044
Infección bacteriana	ID IB (28)	17023	1245	9745	1154	3531	3454	1415
Infección bacteriana	ID IB (29)	9064	296	8462	5890	2366	4029	7820
Infección bacteriana	ID IB (30)	6725	167	5862	671	4092	3658	1117
Infección bacteriana	ID IB (31)	9161	416	10893	925	2084	7572	1792
Infección bacteriana	ID IB (32)	9097	443	10513	1710	4148	5507	1814
Infección bacteriana	ID IB (33)	6968	268	8882	1786	1667	7297	1257
Infección viral	ID VI (34)	25473	691	1926	894	3240	7745	766
Infección viral	ID VI (35)	19779	357	5254	1364	11864	22398	5746
Infección viral	ID VI (36)	7042	10792	18517	2141	5805	3004	1242
Infección viral	ID VI (37)	9557	112	5882	912	558	3899	1063
Infección viral	ID VI (38)	3632	7	16063	314	114	1715	950
Infección viral	ID VI (39)	4193	12	3553	437	270	3411	1136
Infección viral	ID VI (40)	9203	7	3550	681	175	1323	1927
Infección viral	ID VI (41)	6456.3	4.5	778.3	75.5	2201.5	5148.5	1019.5
Infección viral	ID VI (42)	6081.3	29572.3	772.8	12353.8	2074	5885	1013.5
Infección viral	ID VI (43)	457	353.3	21	636.8	202	1057.3	48.8
Infección viral	ID VI (44)	21160.5	23.8	715.5	57	2869.5	2457.8	2231.8
Infección fúngica	ID FI (45)	1383	564	18992	24345	6523	923	6075

Infección fúngica	ID FI (46)	2196	486	17843	1961	761	334	4081
Infección fúngica	ID FI (47)	2779	808	837	6118	920	1337	5181
Infección fúngica	ID FI (48)	19998	371	373	1968	1706	1731	15011
Infección fúngica	ID FI (49)	123	1091	18234	19830	1716	2434	4648
Infección fúngica	ID FI (50)	2595	362	24588	1528	1718	1411	18019
Total de muestras con altos niveles de autoAb's anti-citocinas		6	1	7	2	0	2	2

Tabla 12. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en equinos con enfermedades infecciosas (n = 30). El color negro representa valores MFI < 10000, el color azul representa valores MFI entre 10000 y 15000, mientras que el color rojo representa valores MFI ≥ 15000. Th17-citocinas Th17; CAI- citocinas anti-inflamatorias; OC- otras citocinas; FC-factores de crecimiento.

Subgrupo	Paciente	CONTROLES NEGATIVOS / INDIVIDUOS SANOS						
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados						
		Interferones		Citocinas proinflamatorias/Citocinas producidas por Th17				CAI
		IFN γ	IFN λ	IL-6	IL-17A	IL-17F	IL-21	IL-10
Controles sanos	HC1	4431	840.3	1337.8	3558	4762.5	5999	1813.3
	HC2	5999	1212	4335.5	322	3521.5	4488.8	5999
	HC3	5999	1989.8	1751.8	2585.8	5999	5999	5308
	HC4	5131.8	957.8	690.3	1155.5	2549.3	2119.5	1966.8
	HC5	2870.5	364	2420.5	1024	1119	2259.5	1207.3
	HC6	3317	1283	791.3	163.8	987.5	5999	1769
	HC7	5999	1009.5	2330.5	136	127.3	5999	2715
	HC8	3535	640.5	1953.3	80.5	99.5	5999	2497.8
	HC9	7302	700.8	2098	204.8	44	5999	1627.5
	HC10	785	806.8	1545	126.8	168.3	5999	2305.8
	HC11	51	1903.3	2297	73	90.3	5999	5999
	HC12	59	960	2079.3	65	36.5	5999	5999
	HC13	9	826.3	1970.3	41.8	28.5	5999	5999
	HC14	33	4404	1468	25	5.3	2440	922.3
	HC15	4552	922	1512.3	36	-11.5	5632	3484.8
	HC16	4266.5	738.5	1577.5	87.8	-0.5	5152	2373
	HC17	3647.3	684	747.8	28	51.3	3276.3	2068
	HC18	5389.5	2770	3136	5999	-8.5	2982	2901
	HC19	592	3944.5	4710.3	5999	5999	4799	2488.8
	HC20	4409	518.5	1535.3	5459.5	5999	5999	2577.5
	HC21	3966.8	1566.5	1022.3	2907.3	5423	5999	2973
	HC22	5999	804.8	659.3	1424	2870.8	1877.5	4472.3
	HC23	5999	630.5	1623.3	882.3	1387.5	2009	2512.5
	HC24	4671.8	1700	2032.5	167	845.8	5999	3134.3
	HC25	4128	845.5	1869.5	34	5999	5999	2618.5

HC26	330	22.8	23	22	5999	79.5	37
HC27	3943.8	707.5	1179.5	567	5999	4552	2038.3
HC28	2542	677.3	1165	53	5999	2655	1772.8
HC29	4	600	1390	223	5999	2583	2120.5
HC30	899	1791.3	2460.8	455	5999	5904	2925.8
HC31	4815.5	442.5	762.8	78	4641.5	4606	2793.8
HC32	2667.3	349.8	1166.5	90	5999	2679.5	2360.8
HC33	5759.8	620	853.8	12	5999	4335.3	2537.8
HC34	4250.3	530.5	706.8	342	5999	5959.5	2649.8
HC35	3569.5	924	3380.8	66	5999	5999	2637.8
HC36	4508	1544.8	2427.8	177	5999	3961.5	4409.3
HC37	5623	1104.3	1203.5	456	5400.3	4336.3	5275.3
HC38	5649.8	1909.5	2589	523	3909.3	4844	1251
HC39	4024.8	1920.3	1311.5	667	1290.8	4796.5	1553.8
HC40	6495.5	877	1756.5	62	2275.8	5003	2495.3
HC41	2834	420	829.3	34	1526.8	3789.3	5999
HC42	2801.5	892.5	1722.5	21	735.3	5999	5999
HC43	4442.8	545.5	3155	1.5	543	5999	2310
HC44	2939.3	1057.3	2390.3	89	291	5999	5999
HC45	478.5	224.5	506.3	217.5	329.5	2421.5	1729.5
HC46	484	1761	218.4	973.8	2228.8	2344	17.5
HC47	99.3	689.8	2245.8	938.5	374.8	457	6.5
HC48	104.5	0	6	0.3	0.5	230.8	442.5
HC49	154	1029.8	3990.3	676.3	825.8	3988	-15.3
HC50	90.8	405.8	769.5	339.5	319.3	1548	385.5
Total de muestras con altos niveles de autoAb's	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 13. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en equinos clínicamente sanos (n = 50). El color negro representa valores MFI <10000, el color azul representa valores MFI entre 10000 y 15000, mientras que el color rojo representa valores MFI ≥ 15000. Th17-citocinas Th17; CAI-citocinas anti-inflamatorias; OC- otras citocinas; FC-factores de crecimiento; BSA- Albumina sérica bovina (CN) control negativo.

ubgrupo	Enfermedad	g. i. e. nt	AUTOINMUNIDAD/AUTOINFLAMACIÓN
---------	------------	-------------	-------------------------------

			Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados														
			Interferones					Citocinas proinflamatorias/Citocinas producidas por Th17						Otras citocinas			
			IFN α	IFN β	IFN ω	IFN γ	IFN λ	IL-6	IL-17A	IL-17F	TRANCE	IL-28A	IL-12	IL-10	IL-22	G-CSF	GM-CSF
AID	Timoma	Pt3	259	16417	57	1087	1325	659	652	823	3074	1030	476	598	1024	637	12500
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt19	638	122	97	1387	8234	347	358	646	518	21523	271	1037	454	400	82
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt20	195	144	127	1626	1122	282	335	659	3277	6086	339	633	448	350	119
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt21	1541	401	465	1581	1601	1781	1534	270	1684	6645	1234	2787	3122	1880	977
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt23	106	108	50	1670	374	212	141	157	2685	20288	653	432	446	155	407
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt26	276	149	129	767	1955	404	530	192	4796	10705	469	967	1236	387	244
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt30	171	142	17	418	793	456	1100	591	2189	686	309	616	352	379	163
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt58	12363	478	67	2901	398	680	673	990	655	3032	746	1361	1610	719	223
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt59	12532	209	46	702	718	231	182	391	201	1844	452	537	295	245	80
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt60	11962	526	1417	1269	474	586	436	394	1192	926	535	849	291	563	417
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt61	12555	145	90	1190	549	428	313	323	1706	1147	553	782	64	338	133
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt62	12519	177	381	1238	196	398	280	264	436	581	436	692	709	326	127
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt63	10117	669	955	803	789	2217	1615	454	3017	2240	1163	979	2907	2502	1516
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt64	12483	129	24	363	498	425	481	507	857	689	384	520	356	746	176
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt65	12556	129	63	130	352	242	275	464	219	631	206	218	331	278	132
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt66	11907	507	381	3466	3560	1192	1031	1267	7496	2192	874	1411	4044	1325	504
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt67	12662	61	26	776	94	167	157	119	153	544	167	315	153	151	67
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt68	12618	113	77	1453	314	220	265	268	1063	877	280	460	761	260	109
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt69	11999	318	320	3433	1932	573	524	623	3608	1179	1144	1035	293	686	251
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt70	12206	274	189	1652	824	566	431	383	460	1632	574	704	303	662	313
AID	Síndrome autoinflamatorio	Pt71	12278	310	480	1666	3234	421	406	427	5610	2061	730	822	825	467	262

AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt72	1212 0	284	94	1180	3046	1097	1215	1361	5891	1470	685	885	2064	992	420
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt73	1213 4	515	435	2250	6940	607	702	491	1419 3	1726	568	1016	1957	761	10865
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt74	1251 4	104	105	746	754	489	372	310	513	5242	343	772	455	421	149
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt75	1242 4	241	225	1171	808	225	296	362	1701	923	251	498	243	311	99
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt76	1253 3	275	148	1745	247	1038	279	313	717	635	302	491	989	355	144
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt77	1229 0	260	101	1151	1439	456	435	328	963	1136	198	1117	648	479	284
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt78	1217 7	116	68	1157	503	405	356	799	935	816	289	422	309	331	120
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt79	1189 8	348	359	838	1012	796	628	255	1850	983	743	811	835	952	448
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt12 8	127	80	26	1859	78	169	153	262	112	2293	154	3725	259	225	56
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt12 9	293	104	39	2427 7	3917	136	122	91	110	2202 3	93	4341	2438	249	81
AID	Sindrome autoinflamatorio	Pt13 0	169	78	280	437	1273	520	353	584	6668	662	507	1044	292	693	231
AID	IBD	Pt13 1	440	470	1009	1385	6505	580	594	627	2013 4	1138	1521	1716 3	471	715	269
AID	IBD	Pt13 2	1937	7923	1354	2514	1899	2069	519	723	3599	9034	2188	1035 6	4156	6080	5422
AID	IBD	Pt13 3	2102 9	997	995	4126	2058	748	963	634	1011 6	1593	1294	1834 7	1872	1111	437
AID	IBD	Pt13 4	272	109	88	489	430	215	267	1005	2248	630	154	4762	1331	421	106
AID	IBD	Pt13 5	102	124	59	742	265	191	175	236	604	1091	364	1162 1	2658	312	92
AID	IBD	Pt13 6	479	124	81	2113	3497	278	310	262	342	1674 3	250	5722	799	559	104
AID	IBD	Pt13 7	241	136	49	3477	177	294	248	214	219	1756	350	1602 7	1886	497	110
AID	IBD	Pt13 8	113	343	37	1060	599	264	341	5935	2547	1341	492	6303	631	562	87
AID	IBD	Pt13 9	226	308	67	1552	3545	562	668	2659	1003 6	8746	2281	1707 7	500	2158	208
AID	IBD	Pt14 0	2306 5	659	251	2537	2315	843	648	707	4777	2129	1945	1648 8	1618 6	1758	387
AID	IBD	Pt14 1	1017 2	2786	1043	1603	1450	252	384	310	3723	1495	1106	1236 5	732	525	141
AID	IBD	Pt14 2	487	289	238	2186	4035	666	774	702	4700	2687	618	9650	1840	1052	679

AID	IBD	Pt14 3	418	112	60	1350	273	256	278	198	434	760	218	2055	586	480	107
AID	IBD	Pt14 4	115	75	71	522	344	172	212	120	1056	654	201	7363	610	375	61
AID	IBD	Pt14 5	598	415	545	1382	2169	739	729	532	7695	3422	794	1667 2	1375	1311	319
AID	IBD	Pt14 6	225	127	46	1066	696	210	334	309	945	1291	198	1079 4	401	413	102
AID	IBD	Pt14 7	174	271	63	1181	513	185	224	151	1130	614	439	3439	408	435	80
AID	IBD	Pt14 8	181	102	74	626	403	183	177	141	1670	612	126	1101 5	449	254	66
AID	IBD	Pt14 9	1057	260	176	537	1315	963	863	270	6439	1219	330	2616	1339	2153	364
AID	IBD	Pt15 0	381	155	81	490	767	485	390	374	1110	2288 3	296	9111	389	23746	198
AID	IBD	Pt15 1	94	53	49	1577 3	955	90	128	141	2709	2247 3	191	6152	200	312	58
AID	IBD	Pt15 2	96	101	73	3290	111	111	100	317	579	2267 4	86	1346 9	1874	362	115
AID	IBD	Pt15 3	2339 7	635	269	2251	2287	824	663	649	2434	1964	1727	1504 5	1625 6	1632	394
AID	IBD	Pt15 4	2796 1	216	3531	1369	2490	566	474	1234	442	1066	303	2648 6	582	702	341
AID	IBD	Pt15 5	394	259	135	1388	448	591	449	398	417	1135	331	2058 3	500	474	303
AID	IBD	Pt15 6	187	106	112	808	217	304	275	248	320	676	435	6420	829	398	2691
AID	IBD	Pt15 7	96	76	44	195	1155	132	117	95	276	6972	256	1867	858	167	52
AID	IBD	Pt15 8	551	308	690	1365	1287	480	510	435	902	1340	741	2012 0	1315	920	220
AID	IBD	Pt15 9	214	137	96	1144	1255	289	298	377	362	1697	302	8781	461	590	137
AID	IBD	Pt16 0	666	321	641	2291	8823	365	479	311	1022	1780 6	725	2948 9	2925	934	187
AID	IBD	Pt16 1	1056	710	1488	1638	417	1904	527	376	1143	3552	1089	8115	2495	2502	3748
AID	IBD	Pt16 2	930	748	2233	1122	5586	439	398	368	244	3290	337	1815	461	355	274
AID	IBD	Pt16 3	221	165	108	925	3062	419	509	530	357	659	230	1559 8	3258	427	170
AID	IBD	Pt16 4	133	131	76	489	4954	272	262	301	284	9360	194	8105	241	315	118
AID	IBD	Pt16 5	120	169	149	504	498	358	406	421	265	1364	271	1585 3	2066	423	189

AID	IBD	Pt16 6	173	100	89	875	3322	244	256	135	236	834	228	1156 6	348	361	104
AID	IBD	Pt16 7	291	172	159	1793	1093	388	384	411	618	2054	432	2474 8	1247	460	243
AID	IBD	Pt16 8	9166	427	391	2245	2282	456	559	445	619	2047	572	1253 5	1336	770	433
AID	IBD	Pt16 9	199	181	174	3167	257	292	377	499	467	6129	339	2471 2	486	427	139
AID	IBD	Pt17 0	441	144	252	689	348	298	274	160	267	683	374	9740	1908	479	194
AID	IBD	Pt17 1	369	140	115	5946	559	226	246	521	492	1574	456	1731 0	333	1499	111
AID	IBD	Pt17 2	329	154	128	639	393	241	217	120	219	478	315	1105	311	271	124
AID	IBD	Pt17 3	400	216	189	2181	1374	482	564	339	875	1924	1369	1495 5	780	636	214
AID	IBD	Pt17 4	308	160	87	836	116	277	281	110	357	4399	294	1342 5	1248	217	135
AID	IBD	Pt17 5	125	59	148	336	687	197	146	226	115	183	70	9331	149	226	62
AID	IBD	Pt17 6	776	344	482	2838	1620 4	732	1318	1384	1064	4832	1046	2577 2	2578	1084	303
AID	IBD	Pt17 7	64	93	12	46	453	354	433	564	92	825	155	2821	169	320	138
AID	IBD	Pt17 8	268	109	68	471	5421	526	412	508	238	610	251	2396 3	3641	423	163
AID	IBD	Pt17 9	333	103	144	925	2057	215	304	537	265	2248	230	2345 6	998	362	128
AID	IBD	Pt18 0	109	115	55	600	933	680	350	237	157	523	134	9534	277	325	115
AID	IBD	Pt18 1	82	82	37	2746 9	1226	164	212	207	112	830	165	3059	255	282	103
AID	IBD	Pt18 2	145	297	206	507	126	165	159	115	231	8452	177	4978	596	317	148
AID	IBD	Pt18 3	219	199	109	810	235	380	388	305	374	1699	468	1859 5	1138	559	2021
AID	IBD	Pt18 4	157	161	91	402	1573	770	336	291	196	1699	211	1312 9	448	361	167
AID	IBD	Pt18 5	116	171	24	349	489	522	503	600	150	863	235	9698	264	431	210
AID	IBD	Pt18 6	650	128	100	1249	1660	538	435	228	304	1800	230	2378 1	459	380	166
AID	IBD	Pt18 7	2632 9	4221	1476 8	1149	2782	541	681	187	585	940	366	5133	816	461	247
AID	IBD	Pt18 8	106	87	80	736	237	157	171	237	171	520	189	2047 3	657	226	88

AID	IBD	Pt18 9	259	138	221	1762	487	278	292	208	1101	3967	193	2204 5	1418	252	125
AID	SLE	Pt19 0	2689 7	952	275	1389	2509	401	321	768	316	1579	220	476	122	450	269
AID	SLE	Pt19 1	1130	378	233	1231	2248	508	411	2550	291	3108	368	370	862	262	299
AID	SLE	Pt19 2	1193 5	513	568	2794	461	565	677	9774	772	6563	653	891	523	544	524
AID	SLE	Pt19 3	775	1450	598	2522	432	756	1318	3209	869	3509	843	1267	361	732	307
AID	SLE	Pt19 4	123	253	123	2581 8	46	208	266	1041	143	3176	209	128	123	106	133
AID	SLE	Pt19 5	2578 1	195	467	1276	1718 4	544	732	1180	536	6387	434	703	5093	380	277
AID	SLE	Pt19 6	139	1321	357	490	135	422	601	897	501	2483	302	402	112	357	218
AID	SLE	Pt19 7	158	162	222	472	198	168	216	2826	250	1080 1	170	294	234	164	87
AID	SLE	Pt19 8	89	54	97	148	16	112	86	655	106	412	146	331	45	84	47
AID	SLE	Pt19 9	137	277	168	635	58	8713	248	920	243	4172	246	361	1818 6	206	288
AID	SLE	Pt20 0	121	247	112	506	20	221	221	350	119	1309	113	2254	77	614	95
AID	SLE	Pt20 1	1296 3	322	820	1329	134	384	316	4242	964	1209	780	2326	275	476	193
AID	SLE	Pt20 2	353	271	248	816	89	391	334	1029	297	1195	226	7818	166	395	221
AID	SLE	Pt20 3	178	345	325	620	64	239	227	622	587	736	466	6145	122	715	112
AID	SLE	Pt20 4	51	251	64	138	17	132	129	546	75	436	324	1825	34	66	91
AID	SLE	Pt20 5	1237	523	378	1693	1021	671	718	2247	432	1480 8	382	1092	531	486	297
AID	SLE	Pt20 6	130	201	148	406	83	242	215	1109	193	4153	243	419	113	959	124
AID	SLE	Pt20 7	83	171	102	2214	79	130	156	2621	139	6729	153	289	84	98	76
AID	SLE	Pt20 8	361	168	120	862	171	199	198	1854	158	3512	430	833	134	140	86
AID	SLE	Pt20 9	275	362	410	1243	101	351	401	907	478	6861	540	895	117	278	114
AID	SLE	Pt21 0	87	432	160	810	37	220	195	1586	170	9593	411	221	96	152	91
AID	SLE	Pt21 1	108	203	236	566	58	241	230	889	336	1260	196	260	109	138	125

AID	SLE	Pt21 2	240	382	137	552	195	244	295	1143	175	767	174	442	128	119	116
AID	SLE	Pt21 3	769	403	332	619	334	1055	1077	4180	428	1395	516	2283	338	423	367
AID	SLE	Pt21 4	157	186	192	641	79	328	331	1523	215	6712	1365	530	91	195	147
AID	TIMOMA	Pt21 5	229	173	219	613	93	262	292	2496	246	762	196	983	139	161	92
AID	TIMOMA	Pt22 6	331	373	7890	887	2647	1796 3	241	1943 4	200	196	2517	547	840	26	146
AID	TIMOMA	Pt22 7	134	26168	2757 6	1434	105	95	2401 0	9427	81	75	486	532	77	78	98
AID	DM	Pt22 8	333	591	35	3492	1242	412	479	2317 6	257	154	909	618	2014 5	85	15262
AID	TIMOMA	Pt22 9	336	125	5557	4939	2528 9	147	82	2367 2	109	1219	1915 2	3412	53	60	49
AID	SAI	Pt23 0	241	62	5	342	52	719	28	1000 6	35	23	158	579	17	3	60
AID	SAI	Pt23 3	9	6	1	43	4	9	6	1173 4	6	6	27	876	3	0	12
AID	SAI	Pt23 8	136	209	72	169	659	413	192	7216	130	43	719	3645	65	22	44
AID	SAI	Pt23 9	240	253	241	494	880	115	144	6313	193	108	621	434	137	38	135
AID	SAI	Pt24 2	100	161	23	6583	771	672	87	1789 3	84	1112	1096	1984	117	23	18
AID	SAI	Pt25 6	530	48	35	418	54	36	17	7768	31	34	753	107	16	8	23
AID	SAI	Pt26 5	162	122	30	860	1055	1576 3	63	2255 6	120	125	431	416	50	60	63
AID	SAI	Pt26 6	149	120	22	909	719	1238 4	62	1815 4	115	126	339	347	40	78	52
AID	SAI	Pt26 7	64	29	2	330	125	3338	23	5507	52	28	60	47	9	55	14
AID	SAI	Pt26 8	2	4	2	115	12	560	4	665	8	6	6	12	2	11	11
AID	SAI	Pt30 0	94	648	363	620	188	465	359	77	3	339	188	142	45	915	9561
AID	SAI	Pt30 1	148	2614	137	827	206	1049 6	110	67	8	104	497	129	105	197	88
Total de muestras con altos niveles de autoAb's			7	2	1	4	3	2	1	6	1	8	1	23	4	1	1

Tabla 14. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en humanos con enfermedades autoinmunes (n = 133). El color negro representa valores MFI < 10000, el color azul representa valores MFI entre 10000 y 15000, mientras que el color rojo representa valores MFI ≥ 15000. Th17-citocinas Th17; CAI- citocinas anti-inflamatorias; OC- otras citocinas; FC- factores de crecimiento.

Subgrupo	Enfermedad	Paciente	ENFERMEDADES INFECCIOSAS														
			Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados														
			Interferones					Citocinas proinflamatorias/Citocinas producidas por Th17					OTRAS CITOCINAS				
			IFN γ	IFN α	IFN β	IFN ω	IFN λ	IL-6	IL-17A	IL-17F	TRANCE	IL-28A	IL-12	IL-10	IL-22	G-CSF	GM-CSF
ID	Disseminated tb	Pt5	35	5	2	2	5	2	2	2	1	11	12	2	23	5	5
ID	Infección fúngica recurrente	Pt6	65	1	4	5	176	24	30	91	136	1545	3	7	86	25	5
ID	Infección fúngica recurrente	Pt7	201	51	30	36	991	118	131	214	975	170	74	94	233	126	74
ID	Infección fúngica recurrente	Pt8	205	150	139	69	305	433	250	405	356	885	218	276	1993	363	103
ID	NTM	Pt9	746	287	494	131	750	1952	572	681	421	1580	293	480	432	516	224
ID	NTM	Pt10	565	275	284	230	907	101	100	280	11379	592	79	234	130	94	58
ID	NTM	Pt11	154	176	97	102	1719	262	213	187	5762	2405	128	197	618	240	99
ID	NTM	Pt12	306	1154	195	189	294	283	319	201	196	468	139	222	2560	384	115
ID	Viral infection	Pt13	863	209	164	83	15268	446	485	566	24052	860	788	453	1059	367	203
ID	NTM	Pt14	334	93	218	31	1332	150	181	151	4069	785	260	189	1075	604	68
ID	NTM	Pt15	678	1705	591	536	1965	1650	1274	679	3133	2718	1658	1234	1807	1798	523
ID	NTM	Pt16	2780	265	203	111	980	389	508	410	1472	1939	1675	606	465	431	170
ID	NTM	Pt17	246	165	87	42	1353	466	376	351	2941	467	374	351	302	314	116
ID	NTM	Pt18	374	269	269	55	1525	696	715	1086	3706	700	493	555	478	615	268
ID	NTM	Pt29	297	174	189	55	551	3925	584	922	773	652	303	307	2371	371	181
ID	NTM	Pt33	409	297	440	164	830	14816	698	807	487	787	733	506	1353	537	265
ID	NTM	Pt34	241	129	86	69	4988	138	132	110	4578	2943	227	231	2379	187	75
ID	NTM	Pt35	335	10199	118	2845	2274	702	229	227	6515	1073	711	331	269	327	1194
ID	NTM	Pt36	423	261	181	50	831	626	688	828	815	1145	312	263	1076	528	222
ID	NTM	Pt37	86	209	114	73	1186	258	198	165	6757	802	93	140	4234	313	227
ID	NTM	Pt38	2	34	33	42	173	60	49	68	27	167	434	66	376	47	16
ID	NTM	Pt39	336	102	67	66	299	120	99	182	993	540	145	546	749	2228	64
ID	NTM	Pt40	291	118	100	61	4223	262	266	326	9278	1120	2470	239	241	228	135
ID	NTM	Pt41	443	1	225	60	1325	697	782	994	590	2052	583	300	158	623	13399
ID	NTM	Pt43	187	1	303	35	891	171	197	157	3304	820	246	251	1008	643	76
ID	NTM	Pt44	654	1	739	709	2255	2121	1696	870	3442	3231	1869	1682	2106	2211	625

ID	NTM	Pt45	1218	1	424	503	1953	2120	1784	320	1967	7068	1385	2658	3318	2105	1138
ID	Micobacterial	Pt46	2113	1	294	173	13743	865	764	538	910	25852	802	2135	821	900	212
ID	Aspergillus	Pt47	1458	12093	372	910	1299	423	391	255	1945	1909	845	1547	504	603	180
ID	Infección fúngica recurrente	Pt48	10169	1	170	124	1085	313	341	216	5736	2116	449	947	1911	403	168
ID	Infección fúngica recurrente	Pt49	1	1	112	13	388	299	326	459	171	284	161	80	139	236	78
ID	Infección fúngica recurrente	Pt50	756	1	114	144	1863	270	299	367	856	10183	247	260	988	289	114
ID	Infección fúngica recurrente	Pt51	1454	1	274	107	947	771	807	818	956	2080	861	781	556	759	276
ID	Infección fúngica recurrente	Pt52	2238	1	872	106	580	452	446	619	952	1365	698	821	274	491	184
ID	Infección fúngica recurrente	Pt53	578	1	136	67	424	362	415	489	357	594	427	374	122	363	170
ID	Infección fúngica recurrente	Pt54	5823	1	1103	1744	5758	1045	1103	1212	9986	3696	1516	2122	1179	1251	626
ID	Infección fúngica recurrente	Pt55	285	1	139	64	147	393	311	222	626	570	235	734	104	681	159
ID	Infección fúngica recurrente	Pt80	193	1	181	63	440	275	271	247	794	449	136	321	79	281	133
ID	Infección fúngica recurrente	Pt81	648	249	197	48	1286	688	769	979	580	2325	521	268	487	621	13692
ID	Infección fúngica recurrente	Pt82	1073	141	112	124	1787	264	303	320	805	9759	234	265	1279	261	322
ID	Infección fúngica recurrente	Pt83	668	634	288	399	4418	642	556	611	10782	979	395	491	1395	648	252
ID	Infección fúngica recurrente	Pt84	1943	13526	7016	10699	6512	10863	8349	773	15114	8900	3237	4639	14510	12791	4328
ID	Infección fúngica recurrente	Pt85	1174	10014	3574	5388	5157	8216	5657	522	13111	4476	3954	3997	11231	9733	3392
ID	Infección fúngica recurrente	Pt86	683	4115	791	1230	1506	3463	1945	209	5393	1334	2062	2302	4946	4025	1802
ID	Infección fúngica recurrente	Pt87	362	757	128	174	180	726	411	91	998	207	562	596	1054	841	385
ID	Infección fúngica recurrente	Pt88	146	131	17	22	27	123	70	29	153	46	93	115	183	139	68
ID	Infección fúngica recurrente	Pt89	39	20	5	6	4	26	13	7	29	9	18	23	34	28	11
ID	Infección fúngica recurrente	Pt90	5	1	1	2	1	2	1	1	4	3	3	3	4	5	1
ID	Infección fúngica recurrente	Pt91	1	0	3	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
ID	Infección fúngica recurrente	Pt92	2500	10277	416	153	490	800	1003	441	539	2943	493	1863	3107	822	259
ID	Infección fúngica recurrente	Pt93	2391	1127	235	248	1520	459	470	481	2892	1853	873	599	511	460	279
ID	Infección fúngica recurrente	Pt94	1234	1231	369	477	2231	1112	729	555	2327	1753	604	722	1852	1355	674
ID	Infección fúngica recurrente	Pt95	515	718	457	390	1161	1427	636	789	1728	1063	262	467	1270	731	435

ID	Infección fúngica recurrente	Pt96	240	171	123	68	434	284	215	219	2481	451	171	268	549	244	110
ID	Infección fúngica recurrente	Pt97	456	259	96	52	168	413	356	237	332	1769	417	422	487	337	207
ID	Infección fúngica recurrente	Pt98	166	58	65	25	55	98	87	137	90	341	58	127	279	75	81
ID	Infección fúngica recurrente	Pt99	512	270	139	147	432	253	196	202	210	4950	145	282	214	227	83
ID	Infección fúngica recurrente	Pt216	917	462	299	193	147	335	403	2013	211	3643	361	492	177	124	119
ID	Infección fúngica recurrente	Pt217	584	180	289	144	64	374	381	992	169	6617	214	629	100	175	109
ID	Infección fúngica recurrente	Pt218	28491	167	141	99	29	170	8721	1052	145	1027	200	247	1015	76	117
ID	Infección fúngica recurrente	Pt219	528	162	4097	179	61	446	387	684	168	5071	960	428	115	86	217
ID	Infección fúngica recurrente	Pt220	696	196	440	123	242	157	287	421	260	1906	299	1486	130	71	76
ID	Infección fúngica recurrente	Pt221	281	120	356	106	24	219	221	5386	125	1303	593	232	121	138	106
ID	Infección fúngica recurrente	Pt222	637	221	289	173	140	190	212	2429	225	3856	131	328	83	145	143
ID	Infección fúngica recurrente	Pt223	839	3482	194	282	354	179	232	1539	340	14438	202	411	432	301	123
ID	Infección fúngica recurrente	Pt224	1072	405	285	259	121	362	466	1124	293	1489	240	713	143	439	152
ID	Infección fúngica recurrente	Pt225	1380	232	1866	230	65	302	346	1608	259	18699	432	685	133	241	148
ID	Infección fúngica recurrente	Pt231	134	12	7	93	23	11	2	1569	6	11	309	162	10	1	1
ID	Infección fúngica recurrente	Pt232	460	5	4	3	56	19	6	368	4	24	77	577	3	3	12
ID	Infección fúngica recurrente	Pt234	1120	166	142	82	14815	552	140	19653	177	126	333	232	152	110	126
ID	Infección fúngica recurrente	Pt235	31	133	84	45	165	43	61	17555	87	33	4044	296	72	18	26
ID	Infección fúngica recurrente	Pt236	4069	250	231	273	753	416	382	11772	371	549	3860	3257	174	119	129
ID	Infección fúngica recurrente	Pt240	1207	396	609	150	6393	441	471	7709	315	169	1957	546	207	35	295
ID	Infección fúngica recurrente	Pt241	2875	194	217	80	734	130	155	6998	124	130	698	1446	107	21	80
ID	PAP FI	Pt243	150	154	168	29	809	51	52	12489	106	49	297	570	48	8	59
ID	Infección fúngica recurrente	Pt244	1536	196	416	39	1532	285	215	13739	170	89	419	337	93	137	26095
ID	Infección fúngica	Pt245	870	322	337	98	14725	194	313	21953	208	17356	26485	441	125	103	96

	recurrente																
ID	Infección fúngica recurrente	Pt246	517	158	122	103	1417	112	97	24835	161	110	3460	1138	63	26	96
ID	Infección fúngica recurrente	Pt247	905	441	559	38	3872	231	475	23505	454	101	720	260	88	60	223
ID	Infección fúngica recurrente	Pt248	133	40	54	338	2376	345	44	8723	49	78	294	570	100	20	35
ID	Infección fúngica recurrente	Pt249	1053	136	96	86	2240	92	76	13332	101	114	237	1161	98	40	62
ID	Infección fúngica recurrente	Pt250	194	108	69	59	494	59	50	18863	63	47	10384	340	40	25	44
ID	Infección fúngica recurrente	Pt251	1205	132	89	34	1850	137	55	5471	83	100	716	190	66	43	62
ID	Infección fúngica recurrente	Pt252	400	177	227	63	1367	102	225	16423	133	50	3664	435	80	20	87
ID	Infección fúngica recurrente	Pt253	375	179	311	992	4597	634	212	27601	172	73	566	1720	288	31	169
ID	Infección fúngica recurrente	Pt254	478	49	66	1205	1856	52	45	6322	30	42	695	2267	334	3	57
ID	Infección fúngica recurrente	Pt255	5980	156	201	41	425	225	158	1963	107	154	337	1901	59	9	49
ID	Infección fúngica recurrente	Pt257	882	211	317	21613	397	23251	254	13647	157	162	2234	715	1453	116	181
ID	Infección fúngica recurrente	Pt258	317	92	135	6934	118	10021	123	4987	87	70	513	268	428	107	87
ID	Infección fúngica recurrente	Pt259	98	12	18	1127	14	1928	16	697	15	14	58	54	71	22	4
ID	Tuberculosis(235)	Pt260	2	3	0	120	0	148	0	41	3	2	5	3	3	3	13
ID	NTM(236)	Pt261	17	1	1	10	2	13	1	6	1	3	2	1	1	2	16
ID	Staphylococcus(237)	Pt262	5	5	3	2	1	1	3	4	2	2	4	1	2	1	16
ID	CMC(241)	Pt263	17	8	2	0	2	1	3	4	2	3	3	2	4	1	17
ID	CMC(242)	Pt264	20	93	62	416	151	47	37	13673	57	29	263	545	90	23	133
ID	Salmonella(244)	Pt269	836	379	288	1632	311	395	486	521	3	429	312	193	175	743	172
ID	Listeria(245)	Pt270	1311	593	3294	6303	608	1042	1021	5124	30	812	591	556	312	1586	337
ID	Burkholderia(246)	Pt271	1386	605	1731	472	643	4703	457	5584	80	399	361	402	167	1253	199
ID	Infección fúngica recurrente (247)	Pt272	596	206	1547	682	680	320	1208	2068	23	1759	297	253	146	142	110
ID	Infec y otras compl(248)	Pt273	565	283	505	429	302	299	266	6103	49	211	270	212	162	807	130
ID	Ntm disem(249)	Pt274	1298	681	2299	423	725	2073	431	7108	11	356	398	320	614	459	220
ID	Tuberculosis(250)	Pt275	1533	341	944	1141	668	388	332	7777	19	307	335	332	178	335	238
ID	Streptococcus(251)	Pt276	1725	678	1016	1723	658	602	594	6884	28	467	373	339	385	1202	258
ID	Aspergillus	Pt277	763	227	377	196	166	312	285	6331	36	231	367	209	111	454	157
ID	Aspergillus	Pt278	622	550	1418	477	363	623	655	9087	30	525	711	270	381	206	1512

ID	<i>Aspergillus</i>	Pt279	1403	756	2920	1267	563	1185	752	29431	36	605	489	605	260	789	480
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt280	4484	263	408	362	342	502	333	21941	50	411	463	262	215	310	157
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt281	731	292	1762	1043	374	636	413	28949	42	349	383	283	117	20699	214
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt282	425	160	932	234	773	199	196	29564	4	124	116	172	69	14021	2933
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt283	3473	225	251	1227	499	220	193	27503	27	387	326	374	80	326	92
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt284	1431	553	575	1442	632	474	337	25724	5	309	429	356	267	279	231
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt285	1872	461	1189	1040	481	395	359	16655	77	244	558	374	159	273	164
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt286	680	327	415	933	342	424	412	29138	23	296	246	282	144	270	233
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt287	3205	161	1116	192	449	259	170	25453	23	284	204	306	119	288	118
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt288	924	334	2543	1292	936	362	321	29278	65	253	407	397	217	167	718
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt289	434	206	1657	17054	645	334	256	12694	34	212	531	220	82	447	129
ID	<i>Aspergillus</i>	Pt290	742	196	340	492	235	346	353	28757	18	321	325	242	85	633	181
ID	Infección fúngica recurrente	Pt291	1268	486	1094	7113	384	382	323	24497	50	360	338	259	460	282	232
ID	Infección fúngica recurrente	Pt292	787	402	590	649	526	713	729	20228	4	702	456	360	126	1268	333
ID	Infección fúngica recurrente	Pt293	862	299	1085	1646	339	1096	711	21423	23	597	925	310	97	1101	257
ID	Infección fúngica recurrente	Pt294	1430	569	537	720	381	344	269	24950	11	215	196	177	196	247	292
ID	Infección fúngica recurrente	Pt295	1411	218	549	410	456	4084	446	28129	16	427	288	309	92	891	176
ID	Infección fúngica recurrente	Pt296	1936	268	883	438	429	403	331	28590	136	290	584	263	1325	322	227
ID	Infección fúngica recurrente	Pt297	1327	197	841	989	330	720	427	26411	8	362	227	255	121	734	202
ID	Infección fúngica recurrente	Pt298	4706	425	1158	878	852	310	437	29129	65	318	328	490	156	549	127
ID	PAP FI	Pt299	1944	136	281	1240	2100	7095	304	258	8	336	368	204	100	549	30075
Total de muestras con altos niveles de autoAb's anti-citocinas			20	0	0	2	1	1	0	27	2	3	1	0	0	1	2

Tabla 15. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en humanos con enfermedades infecciosas (n = 126). El color negro representa valores MFI < 10000, el color azul representa valores MFI entre 10000 y 15000, mientras que el color rojo representa valores MFI ≥ 15000. Th17-citocinas Th17; CAI- citocinas anti-inflamatorias; OC- otras citocinas; FC-factores de crecimiento.

Subgrupo	Enfermedad	Paciente	AUTOINMUNIDAD/INFECCIONES														
			Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados														
			Interferones					Citocinas proinflamatorias/Citocinas producidas por Th17					Otras citocinas				
			IFN γ	IFN α	IFN β	IFN ω	IFN λ	IL-6	IL-17A	IL-17F	TRANCE	IL-28A	IL-12	IL-10	IL-22	G-CSF	GM-CSF
AID/ID	Enfermedad Celiaca y candida	Pt1	1611	18032	1272	7364	2143	3023	316	469	2081	2936	16390	234	664	337	217
AID/ID		Pt2	1432	25729	155	26591	221	2265	24572	26190	330	682	288	450	25505	172	75
AID/ID	FQ e infecciones fúngicas	Pt24	12477	148	121	114	1034	252	276	165	5906	1679	342	711	1972	285	153
AID/ID		Pt25	1884	1343	966	1876	8866	734	795	761	14441	2706	934	1154	1479	7221	577
AID/ID		Pt27	889	240	188	148	11262	264	284	311	24469	1798	447	425	535	378	161
AID/ID	IBD e Infecciones fúngicas	Pt28	2177	2178	243	269	2290	309	285	296	10233	1256	826	790	1837	333	130
AID/ID		Pt32	323	136	136	31	1438	386	425	489	2588	1105	677	240	842	776	135
AID/ID		Pt42	495	1	162	75	16560	421	485	587	25311	893	740	435	712	389	199
Total de muestras con altos niveles de autoAb's anti-citocinas			0	2	0	1	1	0	1	1	2	0	1	0	1	0	0

Tabla 16. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en humanos con enfermedades autoinmunes/infecciosas (n = 10). El color negro representa valores MFI < 10000, el color azul representa valores MFI entre 10000 y 15000, mientras que el color rojo representa valores MFI \geq 15000. Th17-citocinas Th17; CAI citocinas anti-inflamatorias; OC otras citocinas; FC factores de crecimiento.

Subgrupo	Enfermedad	Paciente	Otras enfermedades														
			Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados														
			Interferones					Citocinas proinflamatorias /Citocinas producidas por Th17						Otras citocinas			
			IFN γ	IFN α	IFN β	IFN ω	IFN λ	IL-6	IL-17A	IL-17F	TRANCE	IL-28A	IL-12	IL-10	IL-22	G-CSF	GM-CSF
OD	Mutaciones	Pt100	215	282	154	47	141	533	341	240	293	483	299	1126	304	362	129
OD	Mutaciones	Pt101	206	114	48	51	1316	98	106	112	1570	595	777	78	60	115	47
OD	Mutaciones	Pt102	441	269	204	45	257	326	317	430	304	630	162	419	308	291	212
OD	Mutaciones	Pt103	417	157	119	25	231	255	268	293	324	329	131	227	673	196	117
OD	CMC	Pt104	788	355	208	128	11559	279	260	343	317	21099	246	427	1907	303	147
OD	Mutaciones	Pt105	161	144	101	260	627	218	226	239	935	297	402	178	198	201	104
OD	Mutaciones	Pt106	198	78	68	29	622	127	91	132	750	365	72	157	2092	148	51
OD	Mutaciones	Pt107	383	396	209	138	293	330	309	211	1008	354	259	423	517	319	175
OD	Mutaciones	Pt108	241	168	114	56	746	342	336	369	700	22995	318	255	239	352	137
OD	APS1	Pt109	282	200	179	166	494	267	237	277	1513	483	247	278	953	266	115
OD	Mutaciones	Pt110	312	291	131	169	6225	254	268	380	6841	1534	395	264	185	295	147
OD	Mutaciones	Pt111	347	138	520	46	211	204	182	169	384	531	125	231	435	221	523
OD	Muta stat3	Pt112	1140	198	128	91	219	19170	171	213	257	347	528	405	2718	299	113
OD	Mutaciones	Pt113	960	218	100	71	181	11700	174	202	232	290	465	363	2891	283	115
OD	Mutaciones	Pt114	1163	297	660	159	756	13147	686	866	521	845	363	610	1264	591	344
OD	Mutaciones	Pt115	1151	245	300	132	544	5665	556	967	400	769	445	359	1956	449	225
OD	Mutaciones	Pt116	219	99	99	71	161	207	186	538	180	569	105	328	135	200	96
OD	Mutaciones	Pt117	208	207	136	134	478	700	220	238	1115	5199	275	317	324	279	135
OD	DEF RAG	Pt118	829	23771	231	10659	25233	332	335	362	342	1247	328	424	379	18250	191
OD	Mutaciones	Pt119	1839	286	222	116	371	525	389	381	401	376	221	9160	470	1078	265

OD	Mutaciones	Pt120	801	141	124	60	402	5526	929	208	849	183	332	228	373	463	110
OD	Mutaciones	Pt121	1337	181	96	60	231	215	174	208	211	206	351	232	216	880	137
OD	Mutaciones	Pt122	687	297	209	58	756	675	489	371	563	8040	210	643	475	885	231
OD	Mutaciones	Pt123	994	382	165	59	837	1245	877	715	2535	1609	382	1244	670	1764	528
OD	Mutaciones	Pt124	1247	361	20412	65	27910	615	432	520	1856	29590	307	420	2798	738	196
OD	Mutaciones	Pt125	498	142	98	127	2420	191	203	183	7533	610	157	205	443	205	91
OD	Mutaciones	Pt126	1595	308	101	55	2236	175	180	566	210	2413	229	169	171	213	56
OD	Mutaciones	Pt127	1566	253	223	68	2333	2659	707	910	985	7214	345	378	721	1058	286
OD	Timoma mutac	Pt22	1888	23308	292	750	1223	258	268	204	1803	1581	763	1129	534	303	103
OD	Timoma mutac	Pt4	369	98	146	55	384	189	179	182	579	399	72	254	173	166	82
OD	Timoma mutac	Pt31	201	124	317	99	2138	89	111	200	4436	297	83	134	129	132	46
OD	APS1	Pt237	2152	609	676	296	10856	718	604	23776	496	468	5664	6884	441	146	1035
Total de muestras con altos niveles de autoAb's			0	2	1	0	1	1	0	1	0	3	0	0	0	1	0

Tabla 17. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en humanos con otras enfermedades (n = 32). El color negro representa valores MFI < 10000, el color azul representa valores MFI entre 10000 y 15000, mientras que el color rojo representa valores MFI ≥15000. Th17 citocinas Th17; CAI citocinas anti-inflamatorias; OC otras citocinas; FC factores de crecimiento.

Subgrupo	Paciente	CONTROLES NEGATIVOS/INDIVIDUOS CLINICAMENTE SANOS														
		Clasificación de las citocinas reconocidas por los autoanticuerpos detectados														
		Interferones						Citocinas proinflamatorias/ Citocinas producidas por Th17					Otras citocinas			
		IFN γ	IFN α	IFN β	IFN ω	IFN λ	IL-6	IL-17A	IL-17F	TRANCE	IL-28A	IL-12	IL-10	IL-22	G-CSF	GM-CSF
CONTROLES SANOS	HC1	263	114	84	49	1720	201	212	211	1062	5999	134	157	134	193	101
	HC2	96	48	66	19	323	164	158	934	618	719	652	97	134	200	54
	HC3	388	181	96	121	1640	401	250	260	3022	2526	247	255	149	267	124
	HC4	241	79	85	49	1456	214	233	271	1442	2871	118	122	893	675	104
	HC5	548	308	245	608	214	205	220	166	126	893	163	469	440	148	111
	HC6	1795	220	179	126	3420	606	673	618	2125	3538	422	458	1400	610	234
	HC7	17	12510	159	75	2730	298	329	323	7881	1777	221	289	2618	387	185
	HC8	304	12273	308	231	1445	822	762	686	2015	852	500	744	2466	826	506
	HC9	201	11266	212	228	378	381	397	323	270	499	192	276	2418	430	149
	HC10	130	12699	33	20	785	101	105	125	523	5999	75	60	295	95	53
	HC11	462	511	290	214	1425	854	734	656	2119	775	487	765	2726	793	513
	HC12	638	701	314	438	4787	623	594	624	5999	1090	446	559	1701	665	274
	HC13	1823	134	120	67	253	274	269	313	295	696	1644	226	3009	307	161
	HC14	1218	137	100	29	357	261	311	313	196	966	441	249	331	266	486
	HC15	108	133	122	46	273	352	232	254	301	454	124	159	492	211	96
	HC16	319	180	249	127	682	189	165	177	1024	2063	125	327	823	257	98
	HC17	1106	87	70	42	253	134	95	116	645	5999	56	127	1010	167	61
	HC18	1099	187	134	28	325	366	365	481	2135	2511	181	366	597	248	142
	HC19	205	76	123	38	820	175	101	142	451	5999	161	169	590	105	872

	HC20	1117	209	131	79	224	1225	178	204	2513	5999	144	178	224	228	79
	HC21	335	125	70	61	435	120	120	192	5999	2304	138	160	339	70	60
	HC22	498	233	133	55	839	485	492	539	1683	5999	337	272	924	345	190
	HC23	393	136	132	83	703	163	174	188	1698	3603	101	270	284	119	77
	HC24	826	192	204	30	695	584	736	827	1288	4967	309	191	1242	144	270
	HC25	223	58	57	14	256	152	155	1041	800	5999	635	79	131	99	67
	HC26	571	216	7335	100	528	7361	306	327	237	1592	502	491	2467	523	121
	HC27	622	336	265	199	2253	303	259	221	281	3093	236	522	457	463	165
	HC28	915	346	260	58	798	1060	973	896	259	3604	384	615	1321	1357	385
	HC29	1677	134	226	68	777	307	346	340	222	1044	350	156	1066	380	137
	HC30	177	43	44	13	149	119	169	154	69	1709	187	308	152	149	34
	HC31	522	75	467	96	7786	165	166	199	230	595	97	162	265	168	72
	HC32	552	133	338	149	75	7345	299	1459	173	2691	358	198	6973	286	108
	HC33	862	284	537	236	114	471	500	1756	346	1861	262	982	154	279	180
	HC34	287	88	74	70	24	111	96	399	66	1708	52	746	68	51	44
	HC35	424	137	1870	166	120	214	165	1876	233	1255	518	360	118	175	404
	HC36	241	53	1095	72	25	101	81	326	108	2213	108	129	34	90	50
	HC37	871	199	811	253	63	2517	693	5999	349	5999	314	439	197	282	298
	HC38	257	197	182	416	55	181	154	4203	169	5956	189	432	85	88	95
	HC39	12	5	2	3	2	30	4	11	1	2	3	2	3	1	14
	HC40	27	5	0	1	2	5	2	3	0	1	5	3	4	3	11
	HC41	16	4	5	1	2	1	2	2	1	1	5	2	5	1	14
	HC42	6662	157	473	264	1503	418	207	123	44	621	567	725	121	1193	159

HC43	840	135	284	3161	331	212	166	112	16	485	221	137	80	199	72
HC44	213	69	1962	179	424	191	226	46	21	199	1003	121	63	338	66
HC45	41	62	590	94	296	158	134	44	50	105	67	100	41	175	45
HC46	969	118	406	821	339	258	195	76	43	180	3506	191	151	229	103
HC47	150	124	525	6716	246	147	138	79	57	115	302	170	137	229	84
HC48	328	78	115	91	107	143	101	31	39	81	66	95	37	177	54
HC49	4469	306	874	5999	752	284	260	259	8	388	456	417	309	758	150
HC50	1320	677	1140	1551	541	483	334	498	9	368	346	344	484	374	171
Total de muestras con altos niveles de autoAb's anti-citocinas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 18. Niveles de autoanticuerpos anti-citocinas en humanos clínicamente sanos (n = 50). El color negro representa valores MFI < 7000. Th17 citocinas Th17; CAI citocinas anti-inflamatorias; OC otras citocinas; FC factores de crecimiento.

Auto-Ab anti-citocina	Paciente	Título
	IL-6	C-5
a-IL-6 Con Pos	Ab biotinilado	
Con Neg	CT01 Diluyente Ab	
IL-17A	C-7	1/250
a-IL-17 Con Pos	Ab biotinilado	
Con Neg	CT09 Diluyente Ab	
IFN λ	C-8	1/200
a-IFNλ Con Pos	Ab biotinilado	
Con Neg	CT2122 Diluyente Ab	
IFN γ	C-11	1/250
a-IFNγ Con Pos	Ab biotinilado	
Con Neg	CT3144 Diluyente Ab	
IL-10	C-23	1/200
a-IL-10 Con Pos	Ab biotinilado	
Con Neg	CT110 Diluyente Ab	
IL-6	E-9	1/250
IL-17A	E-10	1/250
IFN λ	E-12	1/200
IFN γ	E-14	1/250
IL-6	H-153	1/200
IL-17A	H-165	1/200
IFN λ	H-17	1/250
IFN γ	H-24	1/1250

Tabla 19. Valores promedio de intensidad de fluorescencia obtenida de las muestras séricas utilizadas de las tres especies (**C**: canino; **E**: equino; **H**: humano). Se trabajó por duplicado cada una de las 4 diluciones quintuplas de las muestras iniciando con la dilución de 1/50. La lectura de las microplacas realizó en Luminex. Algunas de las muestras séricas se presentan en orden numérico.

11.2. Apéndice 2

Preparación de Soluciones

Solución Amortiguadora de fosfatos (PBS), pH= 7.2 Cloruro de sodio (NaCl) 8.00 g
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) 1.21 g Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
0.34 g y Agua destilada 1000 mL

Solución Bloqueadora BSA-PVP-PVA

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

Solución pre bloqueadora

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

Solución de Lavado (PBS-T)

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

Medio RPMI 1640 Completo

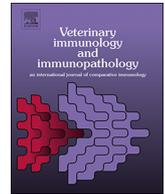
2 mM glutamina, 20 mM HEPES, y 0.01 mg/mL penicilina-estreptomicina con 10% de suero fetal Bovino (SFB) a 37 °C, CO₂ al 5% y 10% de humedad relativa.

Medio DMEM Suplementado

Añadir suero fetal bovino al 2%, L-glutamina y penicilina-estreptomicina 5% (v/v) a 37 °C, CO₂ al 5% y 10% de humedad relativa.

Viabilidad y conteo celular

Se determinó por medio del método de exclusión con colorante azul de tripán al 0.4%.



Research paper

High incidence of anti-cytokine autoantibodies in dogs with immune diseases suggests important immuno-regulatory functions

M. Autran-Martínez^a, P. Cortes-Acevedo^a, L. Cerón-Gutiérrez^b, S. Davies^b, E.S. Mendoza-Elvira^f, H.A. Martínez-Rodríguez^c, C. Liboni^d, V. Pérez-Valencia^e, R. Döffinger^{b,*}, G. Barcenas-Morales^a

^a Laboratorio 2 Inmunología, Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico

^b Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Addenbrookes Hospital and National Institute of Health Research (NIHR), Cambridge Biomedical Research Centre, Cambridge, UK

^c Laboratorio de Virología, Genética y Biología Molecular, FES Cuautitlán, UNAM, Mexico

^d Università degli studi di Padova, Dipartimento di Scienze Biomediche- Via Ugo Bassi, 58/B-35131 Padova Italy Fondazione Istituto di Ricerca Pediatrica Città della Speranza-Corso Stati Uniti, 4-37127, Padova, Italy

^e Hospital Veterinario Belén, Tultitlán, Estado de México, Mexico

^f Laboratorio de Microbiología, FES Cuautitlán, UNAM, Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Dog (*canis lupus familiaris*)
Anti-cytokine autoantibodies
Autoimmunity
Infectious disease
Immunoregulation

ABSTRACT

Autoantibodies against cytokines have been associated with immunodeficiency, susceptibility to infectious diseases, autoimmunity and inflammation in humans, but have not yet been investigated in the Veterinary field so far. The aim of the current study was to determine the presence of anti-cytokine autoantibodies in canines suffering from various conditions including recurrent infections, autoimmune diseases and cancer in comparison to healthy controls. This is the first report of the presence of autoantibodies against cytokines in dogs. A total of 101 serum samples (51 patients and 50 clinically healthy dogs) from the state of Mexico and surroundings were analysed using a multiplex bead-based flow cytometry assay. Results show significant levels of various anti-cytokine autoantibodies in diseased dogs but not in healthy controls. In addition we show distinct associations of various disease types to the specificity of anti-cytokine autoantibodies and to response complexities. Apart from the direct functional/causal implication of anti-cytokine auto-antibodies on disease processes, this findings point to the possibility to use anti-cytokine response patterns as diagnostic tools.

1. Introduction

The immune system defends organisms against pathogens. Antibodies are major effectors of the adaptive immune response. Higher organisms such as vertebrates have developed mechanisms of tolerance in order to focus its immune responses to 'foreign' pathogen-derived antigens and to avoid responses against 'self' antigens. Sometimes, the state of self-tolerance may be broken resulting in autoimmune disease (Schwartz, 2012). However autoantibodies may as well have regulatory functions (Silverman et al., 2013). Cytokines are secreted proteins, which are key mediators of immune responses. They play an important role in the organization of the host defense against pathogens. Cytokine

deficiency may cause susceptibility to infection and/or immune dysregulation. Overproduction of proinflammatory cytokines may cause various inflammatory diseases (Dinarello, 2007). A steadily increasing number of studies in humans identified high titer often functionally neutralizing autoantibodies to single cytokines alone or as part of more complex anti-cytokine patterns to be associated with immunodeficiency characterized by susceptibilities to various pathogens (Browne, 2014; Barcenas-Morales et al., 2016; Knight et al., 2016; Barcenas-Morales et al., 2019). This was recognized as secondary autoimmune phenocopies of primary immune deficiencies (Picard et al., 2018). Autoantibodies have been proposed to be as well involved in preventing infection, maintenance of physiological homeostasis and immune

Abbreviations: α, prefix of anti (against); ACAB, anti-cytokine autoantibodies; AID, autoimmune disease; APECED, autoimmune-poly-endocrinopathy-candidiasis-ectodermal-dystrophy syndrome; ID, infectious disease; Ca, cancer; EBA, epidermolysis bullosa acquisita; GF, growth factors; GM-CSF, Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor; G-CSF, Granulocyte Colony Stimulating Factor; IBD, inflammatory bowel disease; IMUK, immune-mediated ulcerative keratitis; MG, myasthenia gravis; MFI, mean fluorescence intensity; PAP, pulmonary alveolar proteinosis; PCA, principal component analysis; RA, rheumatoid arthritis; rHu, recombinant human; SLE, systemic lupus erythematosus

* Corresponding author.

E-mail address: rd270@medschl.cam.ac.uk (R. Döffinger).

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109902>

Received 12 February 2019; Received in revised form 9 July 2019; Accepted 14 July 2019

0165-2427/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

regulation (Wildbaum et al., 2003; Watanabe et al., 2007; Lutz et al., 2009; Browne, 2014; Barcenas-Morales et al., 2016; Knight et al., 2016; Barcenas-Morales et al., 2019). Anti-cytokine autoantibodies have so far been mostly studied in humans. Here, we investigated the presence of serum ACAB in domestic dogs to test the hypothesis if there is an association with various pathological conditions including recurrent infections, autoimmune diseases, and cancer. The study focused on evaluating canines selected from private veterinary clinics, shelters and the veterinary hospital at the FESC, UNAM that were grouped according to disease manifestations.

2. Material and methods

2.1. Study population

Serum samples from diseased dogs (> 1 year up to 9 years, n = 51) and healthy control dogs (> 1 year up to 8 years, n = 50) were obtained after informed owner consent. The study was approved by the Internal Committee of Care of Experimental Animals of the Postgraduate Program of Animal Production and Health (UNAM, Mexico) and was carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, of the National Institutes of Health guide. Control subjects were considered to be clinically healthy based on history, physical examination, complete blood count, and biochemistry panel. Medical records were obtained from private veterinary clinics, shelters and the veterinary hospital at the FES, UNAM. Data regarding age, gender, daily outdoor access, origin, vaccination history, clinical biochemical profiles, serological tests and complete hematological panels were recorded.

2.2. Disease categories

The patient cohort were divided into three main groups according to their disorders: **1)** Autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus (SLE), pemphigus, immune-mediated ulcerative keratitis, rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, epidermolysis bullosa acquisita, thyroiditis, inflammatory bowel disease (IBD) and myositis; **2)** Infectious diseases including recurrent and/or severe infections caused by canine distemper virus, intracellular bacteria (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*), fungi (*Histoplasma capsulatum*, various Dermatophytes), generalized dermatitis by *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus pyogenes* and secondary *Malassezia pachydermatis*, gastroenteritis by enterobacteria such as *Proteus* and *E. Coli*; and **3)** Cancer including lymphoma or acute myeloid leukemia.

2.3. In silico sequence comparison of human and canine cytokines

Considering that the commercial availability of canine cytokines and related reagents is limited (Levin et al., 2014), we decided to use human cytokines. It was necessary to demonstrate that canine cytokines are sufficiently homologous (percentage of similarity and divergence) to their human counterparts in order to allow a substantive and informative polyclonal cross recognition. Homology analysis and identity matrix were performed using the GenBank database NCBI[®] and Protein Data Bank PDB[®], the Bioedit[®] (Hall, 2001) and MEGA 6[®] (Tamura et al., 2013), allowing to analyze, recognize, and compare the cytokine peptide sequences of these two different species.

2.4. Coupling of anti-cytokine beads for multiplexed bead array

Recombinant human cytokines (IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- γ , IFN- λ , IFN- κ , IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-2, IL-6, IL-10, IL-1 α , IL-28A, IL-28B, IL-15, IL-27, TGF β , TNF α , IL-12, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF α , Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) and Bovine serum

Table 1
Homology between human and canine cytokines.

Human/ Canine cytokine	Homology (%)	GenBank Access Protein Number Human cytokine	GenBank Access Protein Number Canine cytokine
IL-17A	99.1	NP_002181.1	UPI0001B05147
G-CSF	99.0	AJC19277.1	1BGD_A
IL-6	98.9	P05231.1	NP_001003301.1
IFN- γ	98.6	NP_000610.2	NP_001003174.1
IL-10	98.3	P48411.1	ABY86619.1
IL-17F	97.6	AAC50341.1	BAH89243.1
IL-23	97.2	NP_057668.1	NP_112542.1
IL-21	97.0	NP_001193935.1	NP_001003347.1
IL-22	96.9	AAH69308.1	XP_02532317.1
GM-CSF	95.6	AAA52578.1	NP_001003245.1
IFN- λ	92.8	NP_742152.1	AGN92945.1
IFN β	92.4	NP_002167.1	AYN61080.1
IL-2	88.0	AAB46883.1	NP_001003305.1
IL-28	79.0	AAR24510.1	NP_742152.1
IL-27	77.6	AAH62422.1	NP_663611.1
IL-15	76.0	NP_001184117.1	NP_001184117.1
IL-12	64	AAB36675.1	NP_001003293.2
IL-8	41.6	NP_001341769.1	NP_001003200.1
IFN- α	19.3	AAA52724.1	AAA30852.1
IFN- ω	9.7	CAA26501.1	AAB27160.1.3

albumin (BSA control), (R&D Systems, Minneapolis, Minn., Table 1) were covalently coupled to carboxylated beads (Bio-Plex; Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) as previously described (Rosenberg et al., 2016). Briefly, for the coupling procedure, the bead was activated with 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Mass Cat. Nu. E6383) in the presence of *N*-hydroxysuccinimide (NHS; Thermo Fisher Scientific Cat. Nu. 606682-6), according to the manufacturer's instructions to form amine-reactive intermediates. The activated bead was then incubated with the recombinant human (rHu) cytokine (20 μ g/mL) for 3 h at 37 °C on a rotator in darkness. The coupled bead was washed, counted to a concentration of 2×10^6 beads/mL and stored in blocking buffer (FBS 1%, Sigma-Aldrich Cat. Nu. 997RA) in Phosphate Buffered Saline (PBS; Gibco, Cat. Nu. 10010023) and 0.05% Sodium Azide NaN₃ (Sigma-Aldrich, Cat. Nu.26628-22-8).

The successful coupling of the rHu-cytokine to its respective bead set was verified with specific mAb (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). BSA-control beads were run for patient and control sera and found to be negative (data not shown).

2.5. Detection of anti-cytokine autoantibodies in canine sera using multiplexed microparticle-based flow cytometry

Blood Samples were obtained by puncture of the jugular or radial veins from patients and normal donors, and sera were obtained using tubes without anticoagulant (Vacutainer BD[®] Mexico). Following coagulation and subsequent centrifugation (10 min, 2500 X g) samples were stored at -20 °C. For the assay the 30 coupled cytokine-beads sets were mixed and incubated with diluted sera (1/200) from patients and healthy controls for 30 min in a 96-well filter plate (Multi Screen HTS; Millipore, Temecula, California Cat. Nu. PF1150EN00) at 37 °C in the dark on a horizontal shaker. Fluids were aspirated with a vacuum manifold, and beads were washed 3 times with PBS/0.05% Tween 20 (Sigma, P2287). Following an incubation for 30-min with a phycoerythrin-labelled anti-dog IgG-Fc antibody 1/200 (Goat anti-canine IgG-PE, sc-3731, Cat. Nu. A18765, Santa Cruz Biotechnology[®]), beads were washed as described above and resuspended in 130 μ L of PBS/ Tween. Samples were then analyzed on a Bio-Plex platform by using Bio-Plex Manager 6.1 software (Bio-Rad Laboratories).

2.6. Statistical analysis

The data was analyzed using the GraphPad® Prism software version 7.0 for Windows. The data set values were analyzed by means of ANDEVA, Mann-Whitney U test as unpaired non-parametric test. In order to visualize the fusion distances between the groups of patients in comparison with the clinically healthy subjects, a cluster dendrogram was performed with the program R commander i386 version 3.5.1 using the Ward method and a Euclidean distance (Fox and Bouchet-Valat, 2019). Based on the values obtained from healthy subjects (MFI \pm 4 SD), a fluorescence intensity cut-off value (FI) of < 7000 was established and positive samples were therefore defined as \geq 7000. A principal component analysis (PCA) was carried out using XLSTAT software (Addinsoft, 2010), to be able to explore the relationship between the spectra of anti-cytokine autoantibodies and the different types of diseases. Correlations were calculated using the Pearson coefficient correlation and “*r*” value were interpreted as strong correlation to very weak correlation. An unsupervised hierarchical grouping was performed by means of the Pearson correlation with an average link grouping with the Multiple Experiment Viewer program MeV 4.9.0® for Windows 7 (Saeed et al., 2003), the level of statistical significance was established at $p \leq 0.005$.

3. Results

3.1. Homology between human and canine cytokines

An *in silico* analysis confirmed very high homology between most (but not all) canine cytokines and their respective human counterparts suggesting that human cytokines will allow to analyze canine anti-cytokine responses. We choose 16 target cytokines with at least 75% homology (mean homology 93%), and as well 4 targets with lower homology, IL-12 (64%), IL-8 (41%), IFN α (19.3%) and IFN ω (9.7%) as the latter had been previously reported to be targets of ACAB (Rosenberg et al., 2016). We used BSA-coupled control beads for background evaluation, which showed negative results for controls and patients (data not shown). Most of the selected targets however exhibited homologies of above 90% (14 out of 20, mean homology 96%) (Table 1).

3.2. Detection of anti-cytokine autoantibodies in dog sera using multiplexed microparticle-based flow cytometry

In the current study, we wanted to investigate if anti-cytokine autoantibodies are present in the sera of dogs. We collected serum samples from dogs presenting with three main groups of diseases (autoimmune disease, infectious disease, and cancer) referred from throughout Mexico ($n = 51$) and compared them to clinically healthy subjects ($n = 50$) from different breeds without known congenital disease (Table 2). Anti-cytokine autoantibodies to 30 cytokines were measured by multiplexed bead array on a Luminex system. The anti-cytokine data from the 50 healthy control subjects were then used to define cytokine specific cut-offs. Individual mean fluorescence intensities (MFI) values were found to be between 83 and 1650; the cut-off values were calculated based on MFIs \pm 4 SD, which were set in a range of 827 to 9938. A generalized arbitrary cut-off value of < 7000 was defined, which represents the mean of all cytokine MFI's \pm 4 SD. Based on this cut-off value, 46 patients were found to be positive for IgG autoantibodies against at least one cytokine and 43 samples showed high MFI values (\geq 15,000) indicating elevated levels of IgG autoantibodies to 12 different cytokines (IFN- γ , IFN- λ , IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF and G-CSF). Results are shown as heat maps (Fig. 1, Panel A: Healthy controls and Panel B: Patients) and reveal individual patient-specific anti-cytokine reactivities. Some cytokines were targeted with higher frequencies, including in particular IFN γ ($n = 19$), IL-10 ($n = 16$), IL-17A ($n = 15$), IL-17F ($n = 11$), IL-22($n = 4$) followed by

Table 2
Clinical characteristics of the cohort of dogs.

Disease	Number	Gender		Status		
		Male	Female	Castrated	Spayed	Unknown
1) Autoimmune diseases						
Systemic Lupus	5	1	4	1	2	2
Erythematous						
Pemphigus	4	3	1	1	1	2
Myositis	3	1	2	0	1	1
Immune-mediated ulcerative keratitis	5	3	2	2	1	2
Rheumatoid Arthritis	2	1	1	1	0	1
Thyroiditis	2	0	2	0	1	1
Myasthenia Gravis	2	0	2	0	1	1
Epidermolysis bullosa acquisita	3	3	0	2	0	0
Inflammatory bowel disease	4	3	1	1	1	0
Myositis	2	1	1	1	0	0
2) Infectious diseases						
Extracellular bacterial infection	1	0	1	0	0	0
Intracellular bacterial disease	3	0	2	0	1	0
Fungal infection	9	3	7	2	4	2
Viral infection	4	3	1	1	0	0
3) Other disease						
Cancer	2	1	1	1	1	0
Total Number of patients:	51	23	28	13	14	12
4) Healthy subjects	50	23	27	12	10	5

IL-6 ($n = 5$) and IFN λ ($n = 5$) (Fig. 1, Panel B).

3.3. Significant anti-cytokine autoantibody responses in patients

An ANOVA analysis was performed comparing healthy controls and patients to evaluate differences in their ACAB's. Targets were divided into three different groups: Interferons, TH17 cytokines and other cytokines, corresponding to Fig. 2a, b and c, respectively. Significantly positive anti-cytokine responses were identified in the patients when compared to the control group, with the lowest *P* values identified for IFN γ (AID, $p < 0.00003$), IFN λ (AID, $p < 0.0001$), IL-17A (AID $p = 0.000002$; ID, $p < 0.0001$), IL-17F (AID $p < 0.0001$), IL-6 (AID, $p < 0.0008$), IL-10 (AID, $p < 0.0001$; ID, $p < 0.00001$)

In addition, we performed unsupervised hierarchical clustering on the 15 highest targeted cytokines (Fig. 3, Panel A). Data reduction using a two-class significance analysis was performed and seven statistically significant differences were identified within the ACAB reactivity's when compared to the healthy controls: α IFN γ ($p = 0.0001$), α IFN λ ($p = 0.002$), α IL-17A ($p = 0.00003$), α IL-17F ($p = 0.001$), α IL-22 ($p = 0.0003$), α IL-6 ($p = 0.002$) and α IL-10 ($p = 0.00004$) (Fig. 3, Panel B). A PCA was done to further analyze the anti-cytokine profiles among all the data set. Serum samples from patients and healthy subjects exhibited remarkably different responses against the targeted cytokines (Supplementary Fig. 4). A correlation matrix identified a strong correlation value ($r = 0.864$) between the patient's disease and the targeted cytokine.

3.4. Disease specific anti-cytokine autoantibody reactivities

AID patients displayed more complex anti-cytokine responses with 27% showing high positivity to more than three cytokines versus only 6.25% in the ID group. Patient with skin related AID disease (5 out of 7) showed a particular tendency for α TH17 autoantibodies including

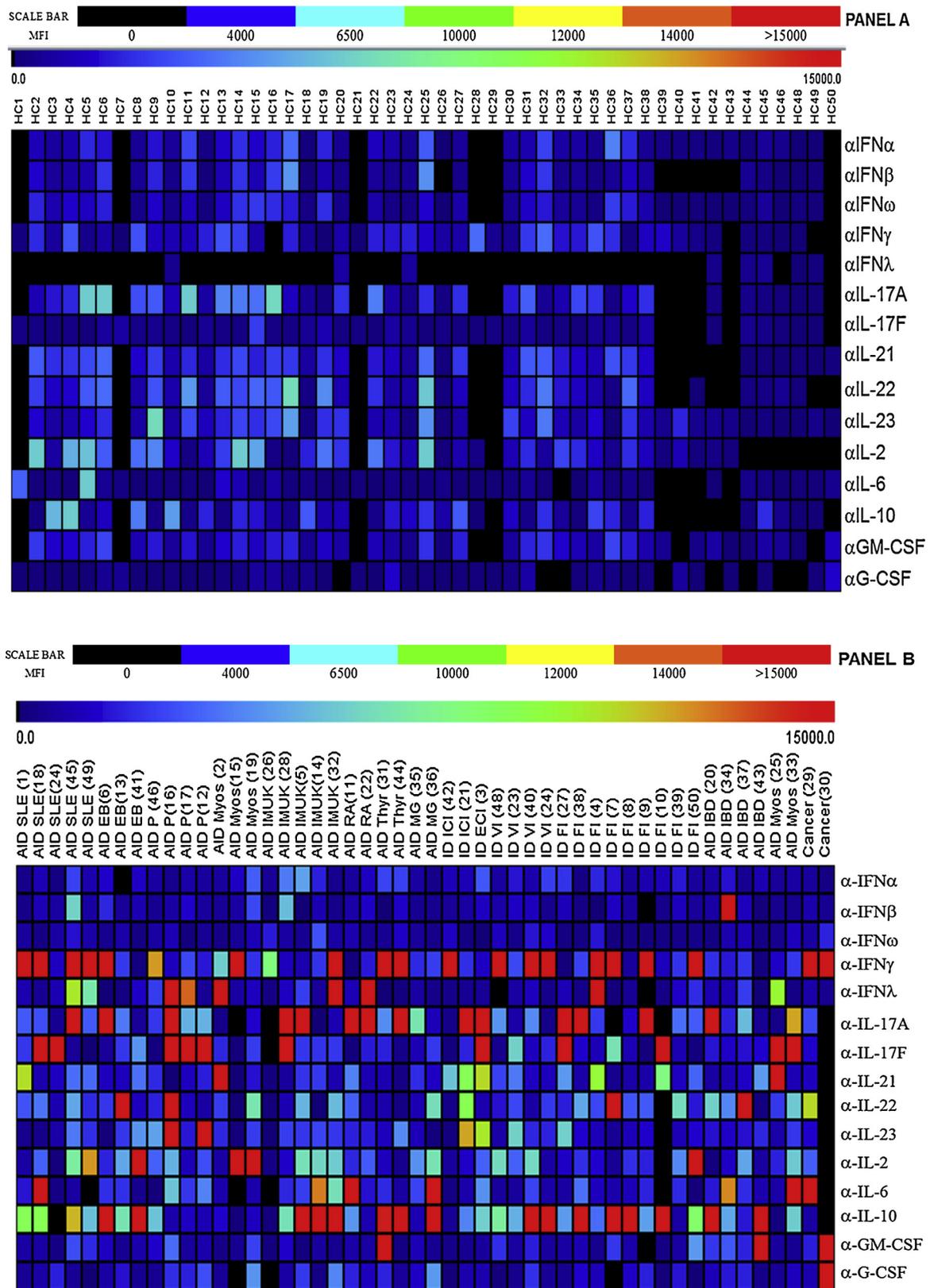


Fig. 1. Heatmaps of individual anti-cytokine values. Samples were plotted along the X-axis and the anti-cytokine autoantibodies were plotted along the Y-axis. MFI values from 0 to greater than 15000 are shown in the heatmap as a color scale ranging from black to red respectively. Anti-cytokine reactivity from the 50 healthy control (**Panel A**) subjects and 51 patients (**Panel B**) are shown. (α): Prefix of anti / against; (MFI): Mean fluorescence intensity.

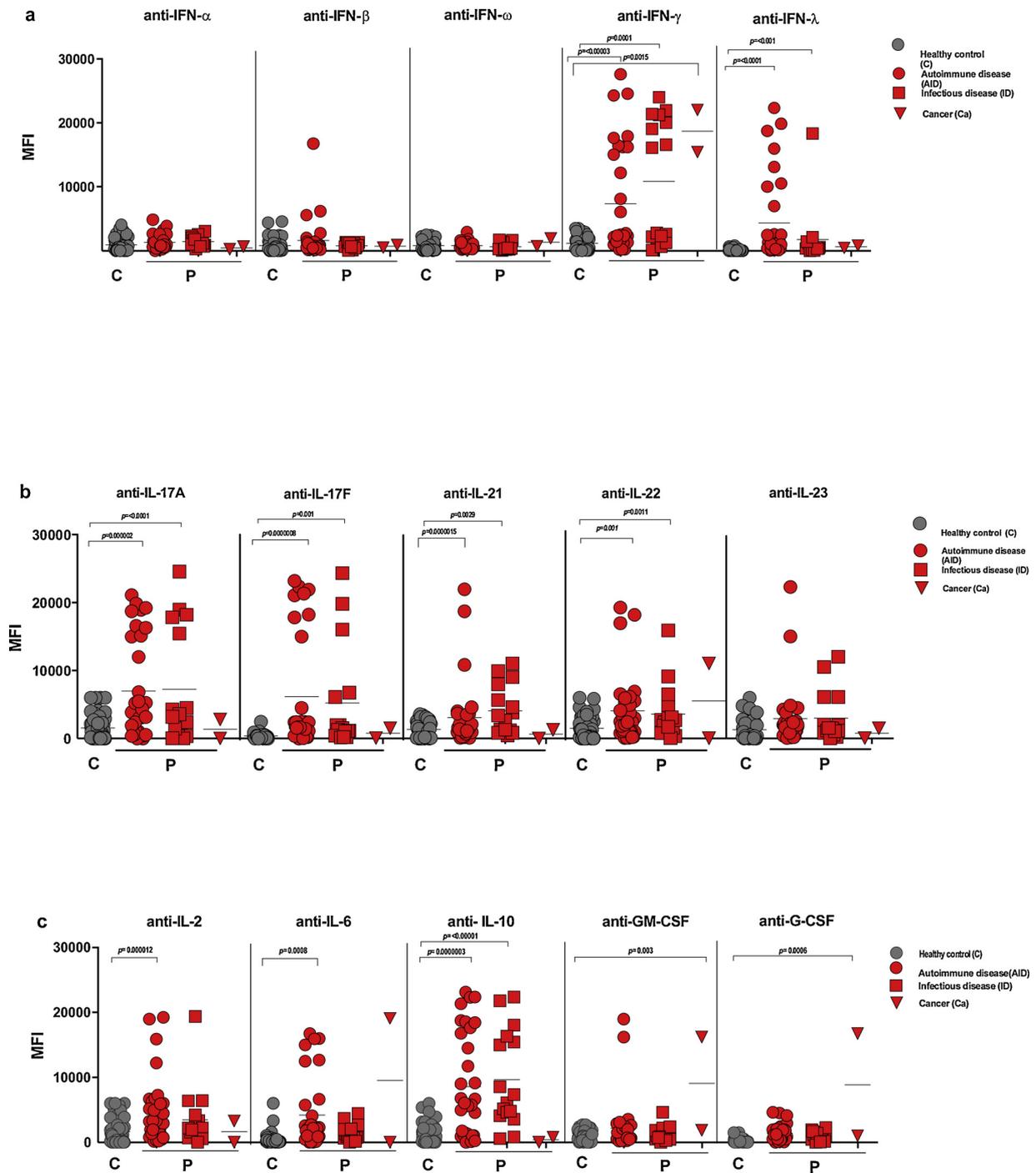


Fig. 2. a, b, c: Anti-cytokine autoantibodies in patients and healthy controls. Median fluorescence intensities (MFI's) are shown: Healthy subjects (C, n = 50), Patients with autoimmune disease (P-AID, n = 32), Patients with Infectious disease (P-ID, n = 17), Patients with cancer (P-Ca, n = 2); Mean values are indicated as horizontal bars. P-values were calculated using two-tailed unpaired *t*-test Fig. 2a: autoantibodies to interferons - type I (IFN α , IFN β , IFN ω) Type II (IFN γ) and Type III (IFN λ); Fig. 2b: autoantibodies to TH17 cytokines (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23). Fig. 2c: autoantibodies to cytokines (IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF, G-CSF).

IL17A, IL17F and IL-22. Overall AID patient had a higher tendency to present with anti-Th17 antibodies when compared to ID patients (61% vs. 43% respectively).

Interestingly, two of the four patients with IBD displayed autoantibodies to IL-10. Other targets included the Th17 cytokines IL-17A and IL-22. One IBD patient showed autoantibodies to GM-CSF and one had antibodies to IFN β , which was the only time, we found this activity in our population. From the 5 patients with autoimmune keratitis, 3 showed high activity against IL-10 and 2 against IL17-A and F. Major targets in SLE patients were IFN γ (4 out of 5) and IL-17A/F (3 out of 5)

with one patient being positive for anti-IL-6. All dogs with thyroiditis displayed autoantibodies to IFN γ . The predominant targets in ID patients (n = 16) were IFN γ (8), IL-10 (6), IL-17A (5), IL-17F (3). Further targets include IL-22 and IFN- λ . Interestingly, some patients exhibited rare reactivity's: Both patients with myositis had antibodies to IL-21. Both cancer patients displayed relative unique patterns with antibodies to IL-6 and IFN γ , in one case with B-cell leukemia and G-CSF, GM-CSF and IFN γ in the second case with advanced multicentric B-cell lymphoma.

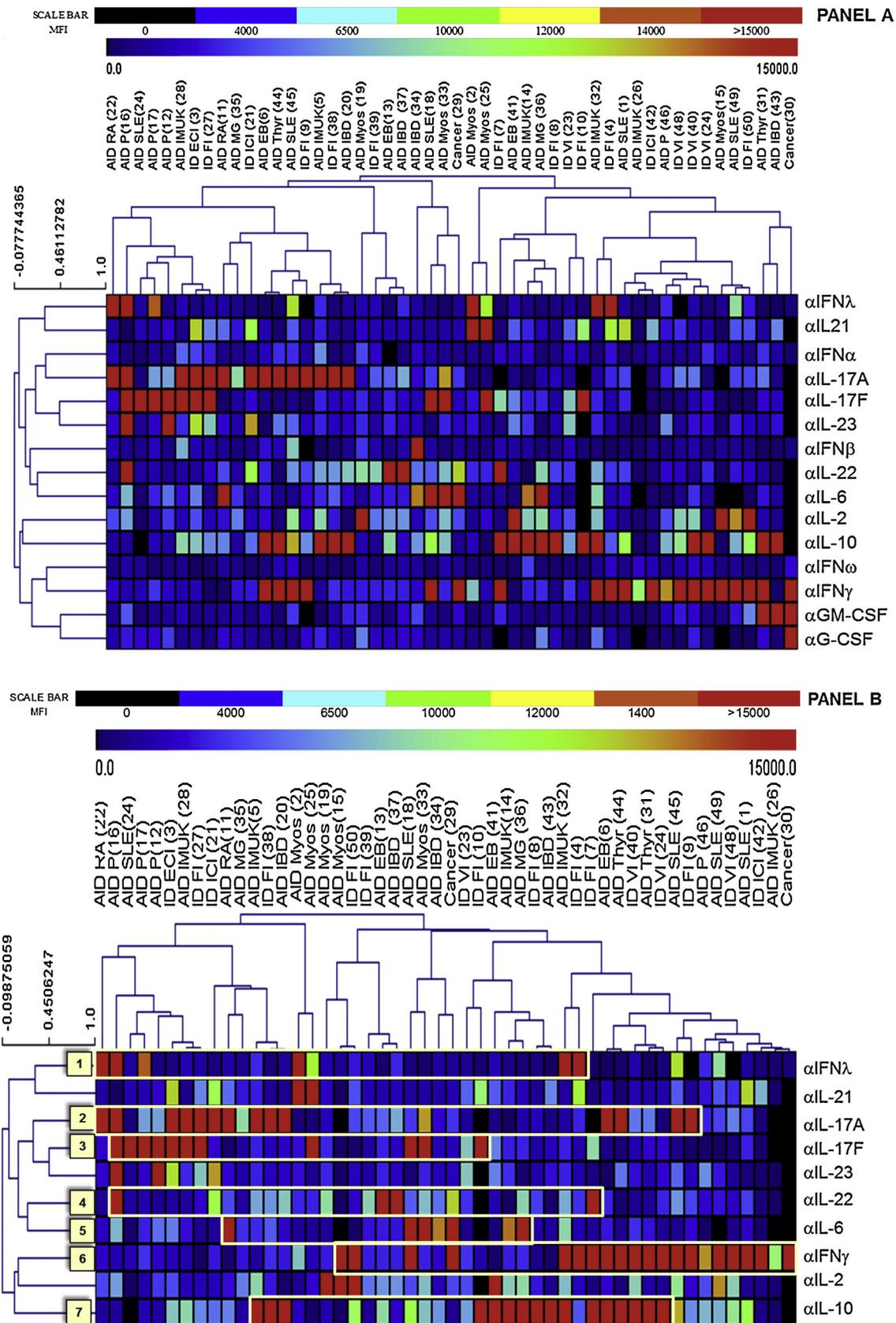


Fig. 3. PANEL A and B. Heatmaps of individual anti-cytokine values in patients. A dendrogram clustering using Euclidean distance as the metric, with related patterns shown in closer proximity. **Panel A:** Hierarchical clustering indicating reactivity patterns against 15 different cytokines in patients with several types of disease (n = 51) as probed by Luminex assay. Samples were plotted along the X-axis and the anti-cytokine autoantibodies were plotted along the Y-axis. FI values from 0 to greater than 15000 are shown in the heatmap as a colour scale ranging from black to red respectively. **Panel B.** A two-class significance analysis identifies seven statistically significant differences in a groups of 10 selected anti-cytokine reactivity's compared to healthy controls: different patterns of high anti-cytokine reactivity are shown: 1) anti-IFNλ autoantibodies ; 2 and 3) anti-IL17 A/ F ; 4) anti-IL-22 autoantibodies; 5) anti-IL-6 autoantibodies; 6) anti-IFNγ autoantibodies, 7) anti-IL-10 autoantibodies. (α): Prefix of anti / against; (MFI): Mean fluorescence intensity.

4. Discussion

Autoantibodies to cytokines have been mainly studied in humans so far. They are increasingly recognized to cause acquired immunodeficiency and susceptibility to infection (Browne, 2014; Barcenas-Morales et al., 2016; Barcenas-Morales et al., 2019). In inflammatory conditions, they may be either protective or disease exacerbating (Knight et al., 2016; Barcenas-Morales et al., 2019). Anti-cytokine autoantibodies are also commonly found in healthy individuals and may play a role in the normal cytokine homeostasis (Watanabe et al., 2007; Lutz et al., 2009; Watanabe et al., 2010). Here we present the first study of anti-cytokine autoantibodies in the veterinary field. Using multiplexed bead arrays, we investigated the presence of serum ACAB to 21 cytokines in 101 domestic dogs (51 patients and 50 healthy controls) to test the hypothesis if there is an association with various pathological conditions including recurrent infections, autoimmune diseases and cancer. Dog anti-cytokine antibodies are mostly unavailable. We therefore used human cytokines as targets as most (but not all) dog cytokines showed very high sequence homologies to their human counterparts (Table 1).

4.1. Significant serum anti-cytokine autoantibodies in diseased dogs

We detected significant levels of anti-cytokine autoantibodies in patient dogs when compared to healthy control dogs. 46 patients were found to be positive for IgG autoantibodies against at least one cytokine and 43 samples showed high MFI values ($\geq 15,000$) indicating elevated levels of IgG autoantibodies to 12 different cytokines including IFN- γ , IFN- λ , IL-17A, IL-17 F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-2, IL-6, IL-10, GM-CSF and G-CSF (Fig. 1, Panel A: Healthy controls and Panel B: Patients) with patient-specific anti-cytokine reactivity patterns. Some cytokines were targeted with higher frequencies, including in particular IFN- γ (n = 19), IL-10 (n = 16), IL-17A (n = 15), IL-17 F (n = 11), IL-22 (n = 4) followed by IL-6 (n = 5) and IFN- λ (n = 5) (Fig. 1, Panel B).

Two different statistical analytical approaches were applied. Using an ANOVA approach, significant positive anti-cytokine responses were identified in the patients when compared to the control group, with the lowest *P* values identified for IFN- γ , IFN- λ , IL-17A, IL-6, and IL-10 (Fig. 2a, b, c). Unsupervised hierarchical clustering revealed seven statistically significant differences within the ACAB reactivity's when compared to the healthy controls: including α IFN- γ , α IFN- λ , α IL-17A, α IL-17 F, α IL-22, α IL-6 and α IL-10 (Fig. 3, Panel B).

Some of the main targets identified in this study overlap with previously identified targets in human diseases. IL-17A/F, IL-22 and IFN- λ have been previously identified as 'common' targets in patients with APECED and Thymoma and antibodies to IL-17A/F and IL-22 have in particular been associated with susceptibility to candidiasis (Kisand et al., 2010; Puel et al., 2010). We identified anti TH17 antibodies in 7 out of 16 dogs with ID, presenting with fungal (5) and bacterial infections (2). Candidiasis is however not a frequent manifestation in immunocompetent dogs (Krohne, 2000). We did not find autoantibodies to the type I IFNs IFN- α and IFN- ω in our study, which may be secondary to the fact that those targets exhibited very low homologies between dog and human and therefore could not be recognized.

High titer inhibitory antibodies to IFN- γ have been previously described to cause susceptibility to intracellular pathogens, such as mycobacteria, salmonella, CMV, VZV and certain filamentous fungi, in certain ethnic backgrounds. However low titer, de facto non-inhibitory antibodies may be more widely found (Doffinger Lab, unpublished observation). We found antibodies to IFN- γ , both in patients with ID and in patients with AIDs. Interestingly all of our ID patients with anti IFN- γ antibodies (8 out of 18) presented with infection due to obligate or facultative intracellular pathogens including fungi (n = 4), viruses (n = 3) and *Salmonella* (n = 1) (Fig. 3). We found anti IFN- γ antibodies as well in AID patients (9 out of 26) which interestingly mainly present with SLE (4). Several studies suggest a role of IFN- γ in the induction of

autoimmunity and particularly in the etiology of systemic lupus (Domeier et al., 2016; Green et al., 2017). High titer, neutralizing antibodies to IL-6 have been described in patients with severe bacterial infections (Puel et al., 2008; Nanki et al., 2013). We did not identify significant anti-IL-6 autoantibodies in the ID group, but instead in 3 dogs with AID presenting with SLE, RA, and MG. IL-6 plays a key role in inflammation by activating the acute phase response and by potentially causing B-cell hyperactivity (Narazaki et al., 2017; Wallace et al., 2017), and it has been shown to be involved in the pathogenesis of various autoimmune diseases including RA (Narazaki et al., 2017) and SLE (Tackey et al., 2004). A recent report showed that treatment with the IL-6R antagonist Tocilizumab was beneficial in a patient with MG (Jonsson et al., 2017). Increased levels of antibodies to IL-6 have been previously noted in patients with autoimmune disease and an exacerbating role was suggested (Takemura et al., 1992).

4.2. Higher complexity of anti-cytokine responses in patients with AID

AID patients (n = 32) displayed more complex anti-cytokine responses with 27% showing high positivity to more than 3 cytokines versus only 6.25% in the ID group. Mainly targeted cytokines include TH17 cytokines (IL-17A/F, IL-21, IL-22; IL-23; n = 18), the TH1 cytokine IFN- γ (n = 9) and the regulatory cytokine IL-10 (n = 9). The balance between TH17 cells/cytokines and Treg cells with IL-10 as one signature cytokine is thought to play an important role in the induction of autoimmune diseases (Noack and Miossec, 2014). The high incidence of ACAB's in AID patient may reflect the particular induction of their targets and thus be considered as 'reactive' and regulative or it may play a more direct part in the etiology of the AID condition either by exacerbating pro-inflammatory cytokines (e.g. Th17 and Th1) or by attenuating the effect of regulatory factors (e.g. IL-10).

In this context, it is particular noteworthy that two IBD patients (n = 4) presented with autoantibodies to IL-10 and two as well with antibodies to the Th17 cytokines IL-17A and IL-22. Genetic defects in the IL-10 signaling pathway have been shown to cause IBD (Glocker et al., 2011). Therapeutic blockade of IL-17A has recently been associated with various forms of gastrointestinal inflammation including IBD in several recent report (Wang et al., 2018; Venero et al., 2019).

Patients with ulcerative keratitis (UK) and epidermolysis bullosa acquisita (EBA) exhibited autoantibodies to IL-17 and/or IL-10 (UK: 4 out of 5; EBA: 3 out of 3). Th17 responses are reported to play key roles in both UK and EBA. Therapeutic TH17 blockade of IL-17A are considered as a possible treatment options (Cao et al., 2017; Castela et al., 2019).

4.3. Th1/Th17 cytokines and IL-10 are main targets in patients with infectious diseases

Interestingly all of our ID patients with anti-IFN- γ antibodies (8 out of 18) presented with infection due to obligate or facultative intracellular pathogens including fungi (n = 4), viruses (n = 3) and *Salmonella* (n = 1). We identified anti TH17 antibodies in 7 out of 16 dogs with ID, presenting with fungal (5) and bacterial infections (2). These findings are in line with previously reported susceptibilities in the human system (Browne, 2014; Barcenas-Morales et al., 2019). Anti-IL-10 autoantibodies were identified in 7 dogs with ID. IL-10 is an antagonist of IFN- γ and an important regulatory component in the response to infection helping to find the correct balance between antimicrobial efficiency and host injury (Couper et al., 2008). Both inhibitory and enhancing antibodies could be considered to play a role in the regulation of infection but also may have detrimental effects. In summary, data suggest disease specific anti-cytokine response pattern. This is in line with previously published data in humans (Rosenberg et al., 2016).

4.4. Rare anti-cytokine specificities

Interestingly, the only two patients found to have antibodies to IL-21 were both presenting with myositis. A recent report suggested a link between autoimmune myositis and high levels of IL-21 (Kageyama et al., 2017). One patient with lymphoma showed an unusual anti-cytokine response pattern including autoantibodies to GM-CSF and G-CSF. Antibodies to IFN β were only identified in one patient presenting with IBD. IFN β administration has been shown to induce clinical remission in a subset of patients with ulcerative colitis (Mannon et al., 2011).

5. Conclusion

In this study, we show a significant presence of anti-cytokine autoantibodies in sera of canines with various immune related diseases including recurrent infections, autoimmune diseases and cancer in comparison to healthy controls. In addition, we show distinct associations of various disease types to the specificity of anti-cytokine autoantibodies and to the number of targeted cytokines. Results are likely to be relevant for the wider field of mammalian immunology. The wide occurrence of ACAB strongly suggests, that they have immuno-regulatory functions and reflect the induction of distinct sets of cytokines in infection and inflammation. A more direct involvement in the various disease pathologies may be considered but will need in detail functional studies, which was not the aim of the current study. The investigation of anti-cytokine autoantibodies may give us new insights into immune disease mechanisms and states of immune dysregulation and may allow us to develop new tools for disease diagnosis and intervention. Further studies with larger patient numbers will be needed to ascertain the association ACAB's with the various types of autoimmunity and susceptibility to infectious disease.

Acknowledgements

This study was supported by the National Institute of Health Research (NIHR), Cambridge Biomedical Research Centre (RD) and from UNAM-DGAPA-PAPIIT program (IN217312 and IN220815) and UNAM-FESC-PIAPI, Project No.1642 (GBM). Marcela Autran-M was supported by Conacyt 3977442 and received a graduate fellowship at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) within the Master's and Doctoral Program in Veterinary Science and Animal Health Production. Special thanks to the collaborators inside the project.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109902>.

References

Addinsoft, 2010. XLSTAT Addinsoft. Paris, France. .
 Barcenas-Morales, G., Jandus, P., Doffinger, R., 2016. Anticytokine autoantibodies in infection and inflammation: an update. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 16, 523–529.
 Barcenas-Morales, G., Cortes-Acevedo, P., Doffinger, R., 2019. Anticytokine autoantibodies leading to infection: early recognition, diagnosis and treatment options. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 32, 330–336.
 Browne, S.K., 2014. Anticytokine autoantibody-associated immunodeficiency. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 635–657.
 Cao, Y., Zhang, W., Wu, J., Zhang, H., Zhou, H., 2017. Peripheral ulcerative keratitis associated with autoimmune disease: pathogenesis and treatment. *J. Ophthalmol.* 2017, 7298026.
 Castela, E., Tulic, M.K., Rozieres, A., Bourrat, E., Nicolas, J.F., Kanitakis, J., Vabres, P., Bessis, D., Mazereeuw, J., Morice-Picard, F., Baty, D., Berard, F., Lacour, J.P., Passeron, T., Chiaverini, C., 2019. Epidermolysis bullosa simplex generalized severe induces a T helper 17 response and is improved by apremilast treatment. *Br. J. Dermatol.* 180, 357–364.
 Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: the master regulator of immunity to

infection. *J. Immunol.* 180, 5771–5777.
 Dinarello, C.A., 2007. Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.* 37 (Suppl. 1), S34–45.
 Domeier, P.P., Chodiseti, S.B., Soni, C., Schell, S.L., Elias, M.J., Wong, E.B., Cooper, T.K., Kitamura, D., Rahman, Z.S., 2016. IFN-gamma receptor and STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 213, 715–732.
 Fox, J., Bouchet-Valat, M., 2019. Rcmdr: R Commander. R Package.
 Glocker, E.O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N., Grimbacher, B., 2011. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1246, 102–107.
 Green, D.S., Young, H.A., Valencia, J.C., 2017. Current prospects of type II interferon gamma signaling and autoimmunity. *J. Biol. Chem.* 292, 13925–13933.
 Hall, T., 2001. BioEdit North Caroline State University, Raleigh, United States.
 Jonsson, D.I., Pirskanen, R., Piehl, F., 2017. Beneficial effect of tocilizumab in myasthenia gravis refractory to rituximab. *Neuromuscul. Disord.* 27, 565–568.
 Kageyama, T., Suto, A., Iwamoto, T., Tanaka, S., Suehiro, K., Yokoyama, Y., Saku, A., Furuta, S., Ikeda, K., Suzuki, K., Hirose, K., Nakajima, H., 2017. IL-21 exacerbates autoimmune myositis by enhancing the accumulation of GM-CSF-producing $\gamma\delta$ T cells in the muscle. *ImmunoHorizons* 1, 176–187.
 Kisand, K., Boe Wolff, A.S., Podkrajsek, K.T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K.V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M.M., Bratanic, N., Meloni, A., Cetani, F., Perniola, R., Ergun-Longmire, B., Maclaren, N., Krohn, K.J., Pura, M., Schalk, B., Strobel, P., Leite, M.L., Battelino, T., Husebye, E.S., Peterson, P., Willcox, N., Meager, A., 2010. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 207, 299–308.
 Knight, V., Merkel, P.A., O'Sullivan, M.D., 2016. Anticytokine autoantibodies: association with infection and immune dysregulation. *Antibodies* 5, 3.
 Krohne, S.G., 2000. Canine systemic fungal infections. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 30, 1063–1090.
 Levin, M., Romano, T., Matassa, K., De Guise, S., 2014. Validation of a commercial canine assay kit to measure pinniped cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 160, 90–96.
 Lutz, H.U., Binder, C.J., Kaveri, S., 2009. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends Immunol.* 30, 43–51.
 Mannon, P.J., Hornung, R.L., Yang, Z., Yi, C., Groden, C., Friend, J., Yao, M., Strober, W., Fuss, I.J., 2011. Suppression of inflammation in ulcerative colitis by interferon-beta-1a is accompanied by inhibition of IL-13 production. *Gut* 60, 449–455.
 Nanki, T., Onoue, I., Nagasaka, K., Takayasu, A., Ebisawa, M., Hosoya, T., Shirai, T., Sugihara, T., Hirata, S., Kubota, T., Harigai, M., Miyasaka, N., 2013. Suppression of elevations in serum C reactive protein levels by anti-IL-6 autoantibodies in two patients with severe bacterial infections. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1100–1102.
 Narazaki, M., Tanaka, T., Kishimoto, T., 2017. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 13, 535–551.
 Noack, M., Miossec, P., 2014. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun. Rev.* 13, 668–677.
 Picard, C., Bobby Gaspar, H., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.L., Chatila, T., Crow, Y.J., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., Holland, S.M., Klein, C., Morio, T., Ochs, H.D., Oksenhendler, E., Puck, J., Tang, M.L.K., Tangye, S.G., Torgerson, T.R., Sullivan, K.E., 2018. International union of immunological societies: 2017 primary immunodeficiency diseases committee report on inborn errors of immunity. *J. Clin. Immunol.* 38, 96–128.
 Puel, A., Picard, C., Lorrot, M., Pons, C., Chrabieh, M., Lorenzo, L., Mamani-Matsuda, M., Jouanguy, E., Gendrel, D., Casanova, J.L., 2008. Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6. *J. Immunol.* 180, 647–654.
 Puel, A., Doffinger, R., Natividad, A., Chrabieh, M., Barcenas-Morales, G., Picard, C., Cobat, A., Ouachee-Charadin, M., Toulon, A., Bustamante, J., Al-Muhsen, S., Al-Owain, M., Arkwright, P.D., Costigan, C., McConnell, V., Cant, A.J., Abinun, M., Polak, M., Bougneres, P.F., Kumararatne, D., Marodi, L., Nahum, A., Roifman, C., Blanche, S., Fischer, A., Bodemer, C., Abel, L., Lilic, D., 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. *J. Exp. Med.* 207, 291–297.
 Rosenberg, J.M., Price, J.V., Barcenas-Morales, G., Ceron-Gutierrez, L., Davies, S., Kumararatne, D.S., Doffinger, R., Utz, P.J., 2016. Protein microarrays identify disease-specific anti-cytokine autoantibody profiles in the landscape of immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137 204–213 e203.
 Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., Quackenbush, J., 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374–378.
 Schwartz, R.H., 2012. Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a006908.
 Silverman, G.J., Vas, J., Gronwall, C., 2013. Protective autoantibodies in the rheumatic diseases: lessons for therapy. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 291–300.
 Takey, E., Lipsky, P.E., Illei, G.G., 2004. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13, 339–343.
 Takemura, H., Suzuki, H., Yoshizaki, K., Ogata, A., Yuhara, T., Akama, T., Yamane, K., Kashiwagi, H., 1992. Anti-interleukin-6 autoantibodies in rheumatic diseases. Increased frequency in the sera of patients with systemic sclerosis. *Arthritis. Rheum.* 35, 940–943.
 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipi, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
 Vernero, M., Asteigiano, M., Ribaldone, D.G., 2019. New onset of inflammatory bowel disease in three patients undergoing IL-17A inhibitor secukinumab: a case series. *Am. J. Gastroenterol.* 114, 179–180.

- Wallace, D.J., Strand, V., Merrill, J.T., Popa, S., Spindler, A.J., Eimon, A., Petri, M., Smolen, J.S., Wajdula, J., Christensen, J., Li, C., Diehl, A., Vincent, M.S., Beebe, J., Healey, P., Sridharan, S., 2017. Efficacy and safety of an interleukin 6 monoclonal antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus: a phase II dose-ranging randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 534–542.
- Wang, J., Bhatia, A., Krugliak Cleveland, N., Gupta, N., Dalal, S., Rubin, D.T., Sakuraba, A., 2018. Rapid onset of inflammatory bowel disease after receiving secukinumab infusion. *ACG Case Rep. J.* 5, e56.
- Watanabe, M., Uchida, K., Nakagaki, K., Kanazawa, H., Trapnell, B.C., Hoshino, Y., Kagamu, H., Yoshizawa, H., Keicho, N., Goto, H., Nakata, K., 2007. Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals. *FEBS Lett.* 581, 2017–2021.
- Watanabe, M., Uchida, K., Nakagaki, K., Trapnell, B.C., Nakata, K., 2010. High avidity cytokine autoantibodies in health and disease: pathogenesis and mechanisms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 263–273.
- Wildbaum, G., Nahir, M.A., Karin, N., 2003. Beneficial autoimmunity to proinflammatory mediators restrains the consequences of self-destructive immunity. *Immunity* 19, 679–688.