

Diversos autoanticuerpos funcionales en pacientes con COVID-19

- [Eric Y. Wang](#) ,
- [Tianyang Mao](#) ,
- [\[...\]](#)
- [Aaron M. Anillo](#)

[Naturaleza](#) volumen 595 , paginas283–288 (2021) [Citar este artículo](#)

- **65k** Accesos
- **36** citas
- **1309** Altmétrico
- [Métricadetalles](#)

Abstracto

COVID-19 se manifiesta con un amplio espectro de fenotipos clínicos que se caracterizan por respuestas inmunes del huésped exageradas y mal dirigidas [1](#)·[2](#)·[3](#)·[4](#)·[5](#)·[6](#) . Aunque la activación inmunitaria innata patológica está bien documentada en la enfermedad grave [1](#) , el efecto de los autoanticuerpos sobre la progresión de la enfermedad está menos definido. Aquí utilizamos una técnica de descubrimiento de autoanticuerpos de alto rendimiento conocida como perfil rápido de antígeno extracelular [7](#)cribar una cohorte de 194 personas infectadas con SARS-CoV-2, que comprende 172 pacientes con COVID-19 y 22 trabajadores de la salud con enfermedad leve o infección asintomática, en busca de autoanticuerpos contra 2770 proteínas extracelulares y secretadas (miembros del exoproteoma). Encontramos que los pacientes con COVID-19 exhiben marcados aumentos en las reactividades de los autoanticuerpos en comparación con los individuos no infectados y muestran una alta prevalencia de autoanticuerpos contra las proteínas inmunomoduladoras (incluidas las citocinas, quimiocinas, componentes del complemento y proteínas de la superficie celular). Establecimos que estos autoanticuerpos perturban la función inmune y deterioran el control virológico al inhibir la señalización de los inmunorreceptores y al alterar la composición de las células inmunes periféricas. y encontró que los sustitutos de ratón de estos autoanticuerpos aumentan la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de infección por SARS-CoV-2. Nuestro análisis de autoanticuerpos contra antígenos asociados a tejidos reveló asociaciones con características clínicas específicas. Nuestros hallazgos sugieren un papel patológico de los autoanticuerpos dirigidos por exoproteomas en COVID-19, con diversos efectos sobre la funcionalidad inmunológica y asociaciones con los resultados clínicos.

Principal

La inmunidad humoral tiene papeles dicotómicos en COVID-19. Aunque los anticuerpos neutralizantes protegen contra la infección por SARS-CoV-2 [8](#)·[9](#) , la creciente evidencia sugiere que la inmunidad humoral desregulada también contribuye a la inmunopatología característica de COVID-19 [10](#)·[11](#)·[12](#)·[13](#)·[14](#)·[15](#)·[16](#) . Informes recientes han identificado reactividades aisladas de autoanticuerpos en pacientes con COVID-19, incluidas reactividades que son características de enfermedades autoinmunes sistémicas [11](#)·[12](#)·[13](#)·[14](#)·[15](#). Es importante destacar que algunos autoanticuerpos, en particular los autoanticuerpos neutralizantes contra los interferones de tipo I (IFN), parecen contribuir directamente a la fisiopatología de COVID-19 al antagonizar las respuestas antivirales innatas [11](#)·[12](#) . Aunque se han descrito anteriormente ejemplos notables de respuestas de autoanticuerpos modificadores de la enfermedad, la amplitud total de reactividades de autoanticuerpos en COVID-19 permanece indeterminada, al igual que sus efectos inmunológicos y clínicos.

Una clase de autoanticuerpos particularmente importante son los que se dirigen al exoproteoma. Los autoanticuerpos dirigidos a exoproteomas pueden ejercer una amplia gama de efectos funcionales, como la perturbación de la señalización celular (como en el caso de los autoanticuerpos contra los IFN de tipo I [11](#)·[12](#)) y la destrucción dirigida de poblaciones celulares específicas a través de receptores Fc (FcR) y / o complemento. Por lo tanto, buscamos identificar respuestas de autoanticuerpos funcionales en pacientes con COVID-19 mediante el cribado de reactividades de autoanticuerpos contra el exoproteoma humano.

Aumentos generalizados de autoanticuerpos en COVID-19

Para descubrir autoanticuerpos funcionales que podrían influir en el resultado de COVID-19, utilizamos un método de descubrimiento de autoanticuerpos de alto rendimiento conocido como perfil rápido de antígeno extracelular (REAP) [7](#) . REAP permite la detección altamente multiplexada de reactividades de anticuerpos a través del biopanning de IgG de pacientes contra una biblioteca con código de barras genético de 2770 proteínas extracelulares humanas que se muestran en la superficie de la levadura, convirtiendo un evento de unión anticuerpo-antígeno en una lectura de secuenciación cuantitativa (la puntuación REAP) sobre la base del enriquecimiento de los códigos de barras de cada proteína (Datos extendidos Fig. [1a](#)). Para permitir la detección de anticuerpos contra las proteínas del coronavirus, también incluimos el dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 y otros coronavirus comunes en la biblioteca (se proporciona una lista completa de antígenos en la Tabla complementaria [1](#)).

Utilizamos REAP para analizar muestras de pacientes infectados con SARS-CoV-2 que fueron seguidos de forma prospectiva como parte del estudio 'Yale Implementing Medical and Public Health Action Against Coronavirus CT' (IMPACT) (Datos extendidos Fig. [1b](#)). Esta cohorte incluye 172 pacientes que fueron atendidos en el Hospital Yale-New Haven con una variedad de gravedad clínica (como se informó anteriormente [1](#)) y 22 trabajadores de la salud que tenían una enfermedad leve o una infección asintomática. Examinamos muestras longitudinales para un subconjunto de la cohorte. Como control, examinamos a 30 trabajadores de la salud que dieron negativo en SARS-CoV-2 mediante qPCR con transcripción inversa (RT-qPCR) durante su período de seguimiento en el estudio IMPACT. Los datos demográficos de los pacientes se pueden encontrar en la Tabla de datos ampliados [1](#). Para validar el rendimiento de REAP, comparamos la reactividad de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 RBD usando REAP con la evaluada usando ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) (Datos extendidos [Fig.1c](#)), y también comparamos la reactividad de IL-6R REAP en pacientes que recibieron anticuerpos terapéuticos anti-IL-6R con los que no (Datos extendidos Fig. [1d](#)). Encontramos una fuerte concordancia entre las puntuaciones REAP para SARS-CoV-2 RBD y la positividad de ELISA para SARS-CoV-2 RBD, así como entre las puntuaciones REAP de IL-6R y el tratamiento anti-IL-6R.

A continuación, examinamos el grado total de autorreactividad en pacientes cuantificando el número de autoanticuerpos en diferentes umbrales de puntuación REAP. Independientemente del punto de corte de la puntuación REAP que utilizamos, los pacientes con COVID-19 tuvieron un mayor número de reactividades en comparación con los individuos no infectados, y las reactividades de puntuación más alta se enriquecieron preferentemente en pacientes con enfermedad grave ([Fig.1a, b](#), Datos extendidos Fig. [2a](#)). No hubo una diferencia estadísticamente significativa en los días desde el inicio de los síntomas entre los pacientes con COVID-19 grave o moderado (Datos extendidos, Fig. [2b](#)), lo que sugiere que los efectos de la confusión temporal fueron mínimos. Dado que anteriormente se han informado diferencias de sexo en la respuesta inmune al SARS-CoV-2 [17](#), comparamos el número de reactividades de autoanticuerpos entre hombres y mujeres con COVID-19 y no encontramos diferencias significativas en los números de reactividad en ningún punto de corte (Datos extendidos, Fig. [2c](#)). Finalmente, en una comparación con los perfiles REAP de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) o poliendocrinopatía autoinmune-candidiasis-distrofia ectodérmica (APECED), los pacientes con COVID-19 tuvieron un mayor número de reactividades que los individuos con LES pero un menor número de reactividades que los individuos con APECED (Datos extendidos Fig. [2d](#)). Las características demográficas y clínicas de los pacientes con LES o APECED se han descrito previamente [7](#). En conjunto, estos resultados

enfermedad moderada ($n = 160$) o leve o asintomática enfermedad ($n = 36$) e individuos no infectados (negativo) ($n = 54$). Las líneas discontinuas indican medianas; las líneas de puntos indican el primer y tercer cuartiles. NS, no significativo. **d**, Gráfico de puntuación del análisis de componentes principales (PC) realizado sobre las reactividades dirigidas al sistema inmunitario en muestras de pacientes que fueron hospitalizados con COVID-19 ($n = 226$), coloreado por puntuación clínica (CS). **e**, Cargas para los componentes principales primero (izquierda) y segundo (derecha) de **d** en orden descendente. En **b - d**, los valores n incluyen muestras longitudinales del mismo paciente. La significancia en **b**, **c** se determinó utilizando un modelo lineal mixto con corrección para comparaciones múltiples (métodos).

[Datos fuente](#)

[Imagen de tamaño completo](#)

Para investigar la naturaleza temporal de estas reactividades en relación con la progresión de COVID-19, evaluamos la dinámica de la puntuación REAP longitudinal. Aunque la asignación definitiva no fue posible debido a la falta de muestras previas a la infección, inferimos las reactividades como 'probablemente preexistentes', 'recién adquiridas' o 'menguantes' sobre la base de las trayectorias de la puntuación REAP representadas contra los días desde el inicio de los síntomas y el desarrollo de IgG anti-spike S1. Encontramos que algunas reactividades estaban presentes con puntuaciones REAP altas dentro de los 10 días posteriores al inicio de los síntomas y antes del desarrollo de respuestas IgG anti-pico S1, lo que sugiere que probablemente eran preexistentes (Datos extendidos Fig. [3a, d](#)). Otros aumentaron en la puntuación y se rastrearon con el aumento de los niveles de IgG anti-pico S1, lo que indica que fueron adquiridos recientemente después de la infección (Datos extendidos, Fig. [3b, e](#)). Finalmente, algunas reactividades disminuyeron en la puntuación REAP con el tiempo, mientras que la IgG anti-pico S1 aumentó o permaneció alta, lo que sugiere títulos de autoanticuerpos decrecientes (Datos extendidos Fig. [3c, f](#)).

Para explorar más a fondo las posibles fuentes celulares del aumento de las reactividades de los autoanticuerpos en pacientes con COVID-19, examinamos los fenotipos de células B en células mononucleares de sangre periférica que coincidían con las muestras de plasma REAP. Al igual que en informes anteriores [10](#), encontramos que las células B extrafoliculares doble negativas se expanden en pacientes con COVID-19 moderado o grave, en comparación con los individuos no infectados (Datos extendidos, Fig. [2f](#)).

Los autoanticuerpos se dirigen a proteínas relacionadas con el sistema inmunitario

Nuestro análisis de las reactividades específicas detectadas por REAP indicó que los autoanticuerpos dirigidos a proteínas relacionadas con el sistema inmunitario aumentaron en pacientes con COVID-19 grave (Fig. [1a, c](#) , Datos extendidos Fig. [2e](#)). Estas proteínas incluían las implicadas en la función y activación de los linfocitos, el tráfico de leucocitos, las respuestas de IFN de tipo I y III, la inmunidad de tipo II y la respuesta de fase aguda. Confirmando un informe anterior [11](#) , identificamos autoanticuerpos contra IFN tipo I en el 5,2% de los pacientes que fueron hospitalizados con COVID-19. Usando un ELISA, validamos ortogonalmente un subconjunto de 22 autoanticuerpos que se dirigen a citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores del complemento y proteínas de la superficie celular (Datos extendidos Fig. [4a-d](#)). Estos resultados demuestran que los pacientes con COVID-19 poseen autoanticuerpos que pueden afectar una amplia gama de funciones inmunológicas.

Para descubrir las características de baja dimensión en las reactividades dirigidas al sistema inmunológico, realizamos un análisis de componentes principales (Fig. [1d, e](#) , Datos extendidos Fig. [4e](#)). Encontramos que el primer componente principal estaba compuesto principalmente por reactividades de autoanticuerpos contra IFN de tipo I (Fig. [1e](#)) y separamos un grupo distinto de muestras de individuos con un fenotipo de enfermedad grave (Fig. [1d](#)), de acuerdo con un informe anterior [11](#) . El segundo componente principal comprendía reactividades de autoanticuerpos contra citocinas, quimiocinas y los IFN de tipo III IFN λ 2 e IFN λ 3 (Fig. [1e](#)). En particular, la gravedad de la enfermedad COVID-19 fue un predictor significativo de la puntuación del segundo componente principal (Datos extendidos Fig. [4f, g](#)). Estos hallazgos sugieren que los autoanticuerpos contra citocinas y quimiocinas pueden contribuir a la gravedad de la enfermedad en COVID-19.

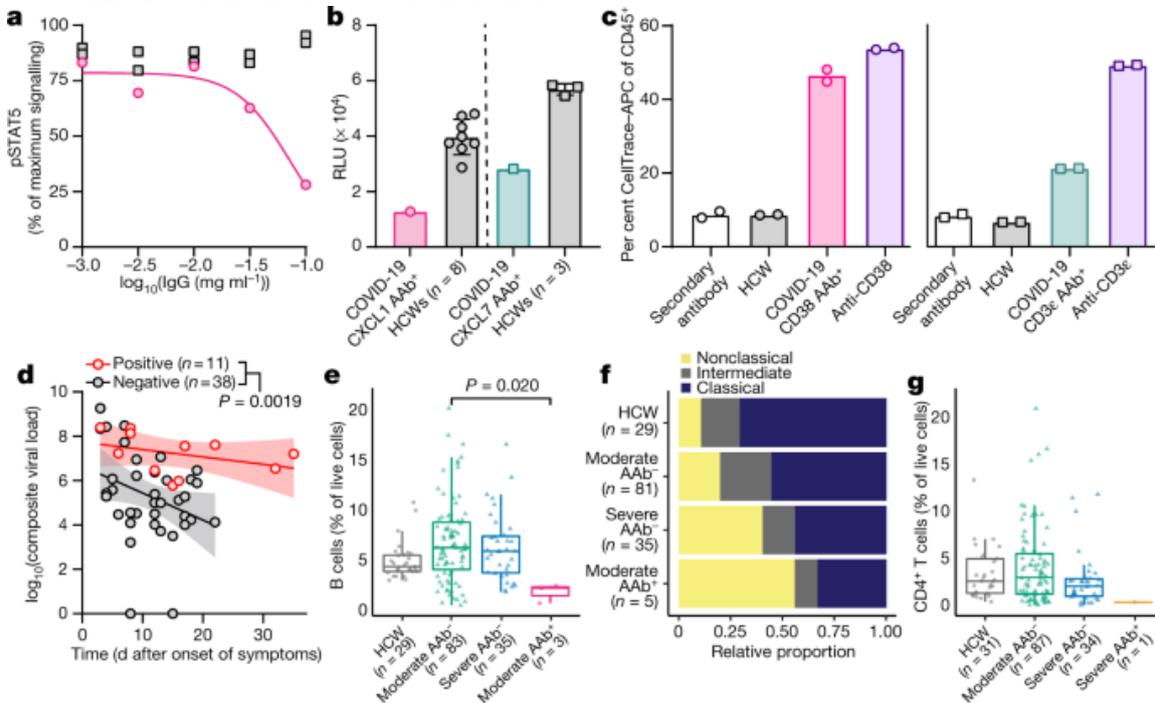
Efectos de los autoanticuerpos virológicos e inmunológicos

Debido a que los autoanticuerpos en pacientes pueden influir en las concentraciones circulantes de sus proteínas diana, examinamos las concentraciones plasmáticas de citocinas y quimiocinas en pacientes con autoanticuerpos contra estas proteínas. En algunos casos, los autoanticuerpos se asociaron con aumentos aparentes en sus dianas de autoantígeno (Datos extendidos Fig. [5b, f, j, m](#)), mientras que en otros casos se correlacionaron con disminuciones aparentes (Datos extendidos Fig. [5k, l](#)).

Para evaluar más directamente los posibles efectos inmunomoduladores de los autoanticuerpos dirigidos a citocinas y quimiocinas en pacientes con COVID-19, evaluamos la actividad in vitro de autoanticuerpos seleccionados. Encontramos que la IgG de pacientes con autoanticuerpos anti-

GM-CSF, anti-CXCL1 o anti-CXCL7 podría antagonizar la señalización de GM-CSF, CXCL1 y CXCL7, respectivamente (Fig. 2a, b). Además, encontramos que el plasma o la IgG de pacientes con autoanticuerpos anti-CD38 o anti-CD3ε condujeron a un aumento de la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos por macrófagos de células B Raji o células T Jurkat, respectivamente (Figura 2c, Datos extendidos Figura 4h, I). Estos resultados demuestran que los autoanticuerpos dirigidos al sistema inmunológico en pacientes con COVID-19 pueden inhibir directamente la actividad de citocinas y quimiocinas, y activar las funciones efectoras de FcR que podrían conducir al agotamiento de las células inmunitarias en los pacientes afectados.

Fig. 2: Los autoanticuerpos dirigidos a la inmunidad en pacientes con COVID-19 tienen efectos funcionales.



a, ensayo de señalización de GM-CSF realizado con IgG de un paciente con COVID-19 que resultó positivo para el autoanticuerpo anti-GM-CSF (círculos rosas) y dos trabajadores sanitarios no infectados (cuadrados grises). Los resultados son promedios de duplicados técnicos de un experimento. **b**, Ensayos de señalización de CXCL1 (izquierda) y CXCL7 (derecha) realizados con IgG de pacientes con COVID-19 que dieron positivo al autoanticuerpo anti-CXCL1 o anti-CXCL7 (AAb) y de trabajadores sanitarios (PS). Los resultados son promedios de tres réplicas o duplicados técnicos. RLU, unidad de luminiscencia relativa. **c**, Ensayo de fagocitosis de macrófagos realizado con células Raji (izquierda) o Jurkat (derecha), usando plasma o IgG de pacientes con COVID-19 que fueron positivos para autoanticuerpos anti-CD38 o anti-CD3ε, respectivamente, monoclonales anti-CD38 o anti-CD3ε anticuerpos (controles positivos) y plasma o IgG de trabajadores sanitarios,

respectivamente ($n = 1$ para todos los grupos). Se muestran réplicas técnicas. Los resultados en **b**, **c** son representativos de dos experimentos independientes. **d**, Comparaciones longitudinales de la carga viral del SARS-CoV-2 entre pacientes con autoanticuerpos (positivos) y sin (negativos) contra los IFN de tipo I. Se muestran regresiones lineales (líneas continuas) y bandas de confianza del 95% (áreas sombreadas) para cada grupo. **d**, día. *nortelos* valores incluyen muestras longitudinales del mismo paciente. **e - g**, porcentaje medio de células B (**e**), proporciones relativas de monocitos clásicos, intermedios y no clásicos (**f**) y porcentaje medio de células T CD4⁺ (**g**) entre leucocitos periféricos en trabajadores sanitarios y pacientes con COVID-19 estratificados por gravedad de la enfermedad y reactividad REAP positiva (autoanticuerpo positivo) (puntuación REAP ≥ 2) frente a proteínas que muestran células B (CD38, Fc μ R y FCRL3) (**e**), proteínas que se muestran preferentemente en monocitos clásicos e intermedios (CCR2, CCRL2, FFAR4, SYND4 y CPAMD8) (**f**) y CD3 ϵ (**g**), respectivamente. Las estrategias de activación para **e - g** se muestran en la Fig. [8 de datos extendidos](#). Los datos de **e**, **g** se presentan como diagramas de caja con el primer cuartil, mediana, tercer cuartil, bigotes (valores mínimo y máximo dentro del primer o tercer cuartil $\pm 1,5 \times$ el rango intercuartílico) y los puntos de datos individuales indicados. La significancia se determinó usando un modelo mixto lineal generalizado (**d**) (Métodos) o una prueba de suma de rangos de Wilcoxon de dos lados (**e**). En **b**, **c**, **e - g**, *n* los valores indican muestras de pacientes únicos. Todas las barras de error representan *sd*

[Datos fuente](#)

[Imagen de tamaño completo](#)

Para investigar los efectos virológicos potenciales de los autoanticuerpos dirigidos a citocinas y quimiocinas, examinamos un subconjunto de pacientes con COVID-19 con autoanticuerpos contra los IFN de tipo I. De acuerdo con informes anteriores [11](#), encontramos que estos autoanticuerpos pueden neutralizar la actividad de señalización de los IFN de tipo I *in vitro* (Datos extendidos Fig. [4j, k](#)). Para evaluar aún más los efectos funcionales de estos autoanticuerpos, comparamos cargas virales compuestas longitudinales en pacientes que tenían autoanticuerpos contra IFN de tipo I con los que no los tenían. Después de controlar las contribuciones de la edad, el sexo, los días desde el inicio de los síntomas y las respuestas de IgG anti-SARS-CoV-2, los pacientes con autoanticuerpos contra los IFN de tipo I tenían cargas virales promedio significativamente aumentadas en comparación con los pacientes que carecían de estos autoanticuerpos (Fig. [2d](#), Datos extendidos Fig. [4l](#)). También encontramos que los pacientes con autoanticuerpos contra los IFN de tipo I tenían una mayor duración de ingreso hospitalario en comparación con los que no los tenían (Datos extendidos, [Fig.4m](#)). Estos

resultados indican que los autoanticuerpos contra los IFN de tipo I alteran el aclaramiento virológico en pacientes con COVID-19.

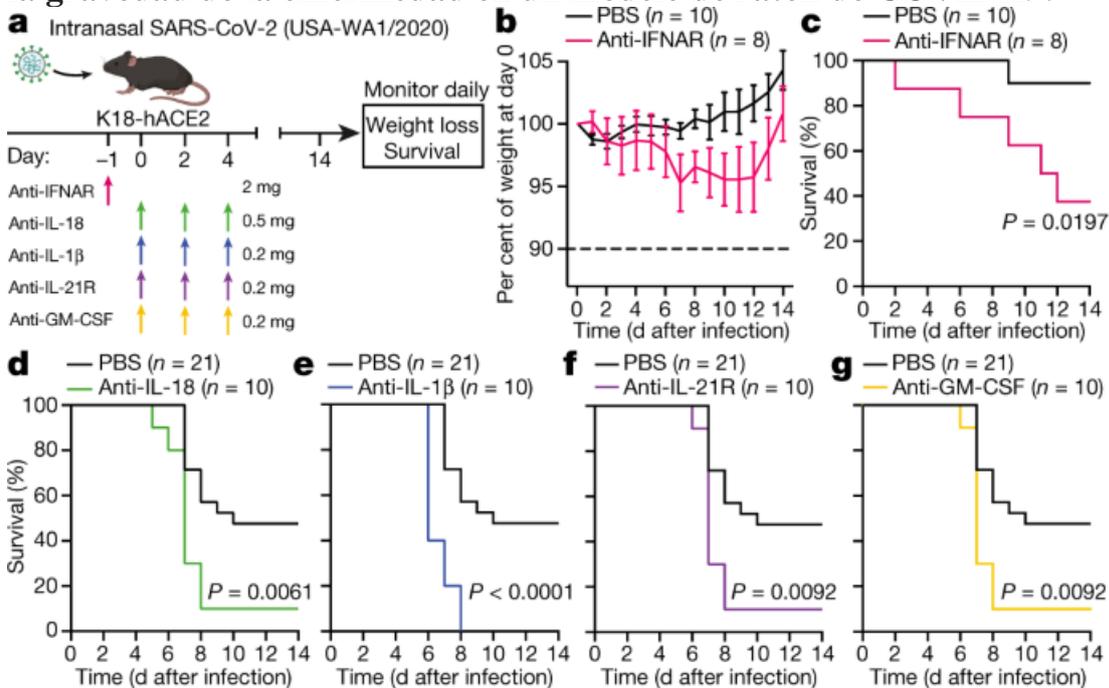
Para investigar los efectos in vivo de los autoanticuerpos contra las proteínas de la superficie de las células inmunes en COVID-19, buscamos asociaciones entre estos autoanticuerpos y la composición de los leucocitos sanguíneos. En primer lugar, nos centramos en dos grupos de antígenos: los expresados en células B (CD38, FcμR y FcRL3) y los expresados preferentemente en monocitos clásicos e intermedios (CCR2, CCRL2, FFAR4, SYND4 y CPAMD8, que identificamos a partir de un ARN público). conjunto [de](#) datos de secuenciación [18](#)). Encontramos que los pacientes con autoanticuerpos contra linfocitos B o antígenos de monocitos clásicos e intermedios tenían frecuencias más bajas de linfocitos B ([Fig.2e](#)) e IgM anti-SARS-CoV-2-RBD (Datos extendidos [Fig.6a](#)) o de antígenos clásicos e intermedios. monocitos ([Fig.2f](#) , Datos extendidos [Fig.6b](#)), respectivamente, en comparación con los pacientes que fueron emparejados por la gravedad de la enfermedad pero negativos para estos autoanticuerpos. Al observar las reactividades individuales, encontramos que un paciente con autoanticuerpos anti-CD3ε tenía compartimentos de células asesinas naturales y B intactos, pero niveles marcadamente reducidos de linfocitos T CD4⁺ , CD8⁺ y asesinos naturales (Fig. [2g](#) , Datos extendidos [Fig. 6c, d](#)). De manera similar, un paciente con autoanticuerpos anti-CD38 exhibió una frecuencia más baja de células asesinas naturales y células T CD4⁺ o CD8⁺ activadas , todas las cuales también expresan CD38 (Datos extendidos [Fig. 6f](#)). Es de destacar que encontramos que la IgG o el plasma de estos pacientes podrían mediar en la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos contra las células Jurkat o Raji, respectivamente, in vitro (Fig. [2c](#)). En conjunto, estos datos muestran que los autoanticuerpos que se dirigen a las proteínas de la superficie de las células inmunes pueden conducir al agotamiento de poblaciones de células inmunitarias específicas en pacientes con COVID-19.

Los autoanticuerpos aumentan la gravedad de la enfermedad en ratones

Para evaluar directamente el efecto de los autoanticuerpos dirigidos a citocinas en la patogénesis de COVID-19 in vivo, utilizamos ratones que expresan transgénicamente ACE2 humano bajo el promotor de queratina 18 humana (ratones K18-hACE2) para recapitular aspectos de la patogénesis de COVID-19 en humanos. tras la infección por SARS-CoV-2 [19](#)·[20](#)·[21](#) . Dado el enriquecimiento de autoanticuerpos dirigidos a IFN de tipo I en pacientes con COVID-19 grave, primero examinamos el efecto del bloqueo de IFN de tipo I mediado por anticuerpos in vivo. Encontramos que los ratones que fueron pretratados con anticuerpos neutralizantes contra IFNAR (el receptor de interferón-α / β) eran más susceptibles a la infección por SARS-CoV-2; tenían una mayor pérdida de peso (Fig. [3a](#)) y una supervivencia reducida

(Fig. 3b). Además, en comparación con los ratones infectados con SARS-CoV-2 que fueron tratados con solución salina tamponada con fosfato (PBS), los ratones infectados tratados con anti-IFNAR mostraron un retraso en el reclutamiento de monocitos, la maduración y la diferenciación de macrófagos proinflamatorios en los pulmones (Datos extendidos, Fig. 7b) . -D), así como marcadas disminuciones en la frecuencia relativa y el número absoluto de células asesinas naturales activadas ($CD44^+ CD69^+$) y células T $CD4^+$, $CD8^+$ y $\gamma\delta$ (Datos extendidos Fig. 7e, f). En conjunto, estos hallazgos demuestran que el bloqueo temprano de la señalización del IFN tipo I por los anticuerpos (que imita los efectos de los autoanticuerpos preexistentes que se dirigen al IFN tipo I) da como resultado una enfermedad agravada e interfiere con la activación mieloide y linfoide en respuesta al SARS-CoV-2. infección.

Fig. 3: Los autoanticuerpos dirigidos al sistema inmunológico aumentan la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de COVID-19.



a - g, ratones K18-hACE2 se infectaron intranasalmente con una dosis subletal (**b**, **c**) o una dosis letal media (**d** - **g**) de SARS-CoV-2 (aislado USA-WA1 / 2020) y se trataron con los anticuerpos indicados (administrado por vía intraperitoneal a la dosis indicada por ratón en los puntos de tiempo indicados en **a**). **b**, **c**, Peso corporal normalizado (**b**) y supervivencia definida como 10% de pérdida de peso o mortalidad (**c**) de ratones K18-hACE2 tratados con PBS o anti-IFNAR desde el día 1 al 14 después de la infección. **d** - **g**, La supervivencia se define como la pérdida de peso del 20% o la mortalidad de los ratones K18-hACE2 tratados con anti-IL-18 (**d**), anti-IL-1 β (**e**), anti-IL-21R (**f**), anti-GM-CSF (**g**) o tratados con PBS desde el día 1 al 14 después de la infección. La significancia en **c** - **g** se determinó mediante la prueba de log-rank (Mantel-Cox). Todas las barras de error son

sem. Todos los valores n indican ratones biológicamente independientes, examinados en dos experimentos independientes.

[Datos fuente](#)

[Imagen de tamaño completo](#)

Más allá de los IFN de tipo I, identificamos pacientes con COVID-19 con autoanticuerpos que se dirigen a componentes de la vía de la interleucina-18 (IL-18) (en particular, IL-18R β) (Datos extendidos, Fig. [4d](#)), que tiene un papel crítico en respuestas antivirales de los linfocitos T CD8⁺ y asesinos naturales [22-23](#). Para examinar el efecto de las alteraciones de la vía de la IL-18 en la infección por SARS-CoV-2, administramos anticuerpos neutralizantes anti-IL-18 a ratones K18-hACE2 inmediatamente antes de la infección. Descubrimos que el bloqueo de IL-18 aumentó en gran medida la susceptibilidad de estos ratones a la infección por SARS-CoV-2 (Fig. [3d](#), Datos extendidos Fig. [7k](#)), resultó en una carga viral significativamente mayor (Datos extendidos Fig. [7g, h](#)) y condujo a una frecuencia y número disminuidos de células asesinas naturales efectoras con propiedades citotóxicas mejoradas (CD11b⁺ o KLRG1⁺) (Datos extendidos Fig. [7i, j](#)). Estos resultados destacan el papel disruptivo que puede tener el bloqueo de IL-18 mediado por autoanticuerpos en la respuesta inmune al SARS-CoV-2.

Además, identificamos IL-1 β , IL-21 y GM-CSF como dianas de autoanticuerpos de citocinas en pacientes con COVID-19. Tanto la IL-1 β como la IL-21 participan directamente en la defensa antiviral del huésped [24-25](#) e IL-21 es un importante contribuyente al segundo componente principal en nuestro análisis de componentes principales de autoanticuerpos dirigidos al sistema inmunológico en COVID-19 (Fig. [1e](#)). GM-CSF tiene un papel fundamental en el aumento de la defensa antiviral innata mediada por macrófagos alveolares [26](#). De acuerdo con las propiedades antivirales de estas tres citocinas, encontramos que los ratones que recibieron anticuerpos anti-IL-1 β , anti-IL-21R o anti-GM-CSF se volvieron sustancialmente más susceptibles a la infección por SARS-CoV-2, ya que tenían significativamente disminución de la supervivencia (fig. [3e-g](#)) y perdieron más peso (Datos extendidos Fig. [7l-n](#)) tras la infección por SARS-CoV-2 que hicieron los ratones tratados con PBS.

Correlaciones de autoanticuerpos dirigidos a tejidos

Además de los autoanticuerpos dirigidos al sistema inmunológico, también observamos una alta prevalencia de autoanticuerpos asociados a tejidos en pacientes con COVID-19 (Fig. [4a](#)). Estos autoanticuerpos se dirigieron contra células vasculares, factores de coagulación y plaquetas, tejido conectivo, componentes de la matriz extracelular y varios sistemas de órganos, incluidos los pulmones, el compartimento del sistema nervioso central, la piel, el tracto

gastrointestinal y otros tejidos. Para evaluar si cualquiera de estos autoantígenos putativos se asociaron con perturbaciones significativas en fenotipo clínico, se realizó un análisis exploratorio de datos utilizando una común, lineales generalizados modelo de efectos mixtos (Extended Data Fig. 9). Encontramos que algunos de los autoantígenos (como NXPH1, PCSK1, SLC2A10 y DCD) se correlacionaron significativamente con marcadores clínicos que se sabe que están asociados con una mayor gravedad de la enfermedad COVID-19 (como D- dímero, ferritina, C-reactivo proteína y lactato) [27](#)·[28](#) . Dada la extensión de los autoantígenos específicos del sistema nervioso central que identificamos en nuestra pantalla REAP y los informes anteriores sobre el potencial de neuroinvasión del SARS-CoV-2 [29](#), examinamos además si alguno de los autoanticuerpos se correlacionaba con las puntuaciones de la Escala de coma de Glasgow de alguno de los pacientes. Encontramos que diez pacientes con COVID-19 desarrollaron autoanticuerpos contra HCRTR2, que es un receptor de orexina que se enriquece en el hipotálamo. Observamos una marcada correlación negativa entre los niveles de autoanticuerpos HCRTR2 en estos pacientes y puntuaciones de la escala de coma de Glasgow excepcionalmente bajas, que abarcan el momento de la recogida de la muestra (Fig. [4b](#)). Además, validamos la presencia de estos autoanticuerpos en dos pacientes usando un ELISA (Fig. [4c](#)) y, usando un ensayo de señalización de orexina in vitro, encontramos que los autoanticuerpos de HCRTR2 en un paciente antagonizaban la actividad de HCRTR2 (Fig. [4d](#)).

Fig. 4: Los autoanticuerpos contra los antígenos asociados a tejidos son prevalentes y funcionales en pacientes con COVID-19.

promedio de individuos no infectados (trabajadores de la salud) + 3 sd Los resultados son promedios de duplicados técnicos de un experimento. OD, densidad óptica. **d** , Ensayo de señalización de orexina realizado con IgG de pacientes con COVID-19 que dieron positivo al autoanticuerpo anti-HCRTR2 y de trabajadores sanitarios. Los resultados son promedios de tres réplicas técnicas de un experimento. Todos los valores *n* indican muestras de pacientes únicos. Todas las barras de error representan sd

[Datos fuente](#)

[Imagen de tamaño completo](#)

Discusión

El grado de reactividades de autoanticuerpos observados en pacientes con COVID-19 sugiere que la inmunopatología humoral es un aspecto intrínseco de la patogenia de COVID-19. Al seleccionar muestras de pacientes con la plataforma REAP, hemos identificado y validado numerosas proteínas dianas en una amplia gama de tejidos y funciones inmunológicas y fisiológicas. Estos autoanticuerpos tenían potentes actividades funcionales y podrían correlacionarse directamente con varios parámetros virológicos, inmunológicos y clínicos in vivo en muestras de pacientes con COVID-19. Nuestro análisis de las trayectorias de la puntuación REAP y las comparaciones con las respuestas humorales del SARS-CoV-2 sugieren que algunos de estos autoanticuerpos probablemente precedieron a la infección, mientras que otros fueron inducidos después de la infección. Es más, Los sustitutos de ratón de estos autoanticuerpos condujeron a un aumento de la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de infección por SARS-CoV-2. Estos resultados proporcionan evidencia de que los autoanticuerpos son capaces de alterar el curso de COVID-19 perturbando la respuesta inmune al SARS-CoV-2 y la homeostasis tisular.

La diversidad de respuestas de autoanticuerpos en pacientes con COVID-19 también subraya la importancia de encuestas de alto rendimiento e imparciales a escala de proteomas para objetivos de autoanticuerpos. Más allá de validar el ejemplo biológicamente convincente de autoanticuerpos que se dirigen a los IFN de tipo I en COVID-19, nuestros estudios implicaron muchas otras vías inmunes que son el objetivo de los autoanticuerpos en COVID-19. También detectamos autoanticuerpos contra varios antígenos asociados a tejidos e identificamos correlaciones entre estos autoanticuerpos y marcadores clínicos inflamatorios como D- dímero, ferritina, proteína C reactiva y lactato en pacientes con COVID-19. Muchos de los autoanticuerpos tisulares que identificamos también estaban presentes en diversos compartimentos fisiológicos que con frecuencia han estado implicados en el síndrome post-COVID-19.³⁰ . Por ejemplo, identificamos autoanticuerpos contra el receptor

de orexina HCRTR2 que, ex vivo, podrían inhibir la señalización de la orexina, que tiene un papel importante en la regulación de la vigilia y el apetito [31](#) . En última instancia, si los autoanticuerpos específicos identificados aquí tienen un papel en el establecimiento del síndrome post-COVID-19, y si persisten más allá de la fase aguda de COVID-19, merece una mayor investigación.

En resumen, nuestros análisis han revelado un panorama expansivo de autoanticuerpos en pacientes con COVID-19 e identificado autoanticuerpos distintos que ejercieron resultados inmunológicos y clínicos notables. Estos resultados implican vías inmunológicas previamente subestimadas en la etiología de COVID-19 y sugieren paradigmas terapéuticos que se centran en modular estas vías, además de atenuar los autoanticuerpos mismos. Finalmente, nuestros hallazgos proporcionan una sólida justificación para la investigación más amplia de autoanticuerpos en la patogénesis de enfermedades infecciosas.

Métodos

No se utilizaron métodos estadísticos para predeterminar el tamaño de la muestra. Para la investigación realizada en muestras humanas, no se realizó la aleatorización ya que estos estudios fueron de naturaleza observacional. Para los experimentos con ratones, se asignaron aleatoriamente ratones de la misma edad y sexo a grupos experimentales. Para la pantalla REAP, las mediciones de citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica humana y las mediciones de citocinas plasmáticas, los investigadores estaban cegados a la información clínica y las puntuaciones clínicas de los pacientes hasta después de la recopilación y el análisis de datos. Para todos los demás experimentos, los investigadores no estaban cegados a la información clínica y las puntuaciones clínicas de los pacientes durante la recopilación y el análisis de datos.

Declaración de Ética

Este estudio fue aprobado por las Juntas de Revisión Institucional del Programa de Protección de la Investigación Humana de Yale (FWA00002571, ID de protocolo 2000027690). Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes y trabajadores sanitarios incluidos.

Pacientes

Como se describió anteriormente [1](#) y se reproduce aquí por motivos de accesibilidad, se incluyeron en este estudio 197 pacientes ingresados en el Hospital Yale New Haven con COVID-19 entre el 18 de marzo y el 5 de mayo de 2020. No se utilizaron métodos estadísticos para predeterminar el

tamaño de la muestra. Se recolectaron muestras nasofaríngeas y de saliva como se describió previamente [32](#), aproximadamente cada cuatro días, para el análisis de qPCR de transcripción inversa del SARS-CoV-2 cuando sea clínicamente factible. La sangre completa emparejada para el análisis de citometría de flujo se recogió simultáneamente en recipientes al vacío recubiertos con heparina de sodio y se mantuvo en agitación suave hasta el procesamiento. Toda la sangre se procesó el día de la recolección. Se puntuó a los pacientes según la gravedad de la enfermedad COVID-19 mediante la revisión de los registros médicos electrónicos en cada punto de tiempo longitudinal. Las puntuaciones fueron asignadas por un médico clínico especializado en enfermedades infecciosas de acuerdo con una escala de gravedad de la enfermedad desarrollada a medida. El estado de enfermedad moderada (puntuación clínica 1-3) se definió como: infección por SARS-CoV-2 que requirió hospitalización sin oxígeno suplementario (1); infección que requiere oxígeno suplementario no invasivo ($< 3 \text{ l min}^{-1}$ para mantener la $\text{SpO}_2 > 92\%$) (2); e infección que requiere oxígeno suplementario no invasivo ($> 3 \text{ l min}^{-1}$ para mantener la $\text{SpO}_2 > 92\%$, o $> 2 \text{ l min}^{-1}$ para mantener la $\text{SpO}_2 > 92\%$ y tenía una proteína C reactiva (PCR) de alta sensibilidad > 70) y recibió tocilizumab (3). El estado de enfermedad grave (puntuación clínica 4 o 5) se definió como una infección que cumplía con todos los criterios para la puntuación clínica 3 y también requería ingreso en la unidad de cuidados intensivos y $> 6 \text{ l min}^{-1}$ de oxígeno suplementario para mantener la $\text{SpO}_2 > 92\%$ (4); o infección que requiera ventilación mecánica invasiva u oxigenación por membrana extracorpórea además de la administración de glucocorticoides o vasopresores (5). Se asignó una puntuación clínica de 6 a los pacientes fallecidos. Para todos los pacientes, los días desde el inicio de los síntomas se estimaron de la siguiente manera: (1) se dio la máxima prioridad a las fechas de inicio explícitas proporcionadas por los pacientes; (2) se le dio la siguiente prioridad más alta al síntoma más temprano informado por un paciente; y (3) en ausencia de información directa sobre el inicio de los síntomas, estimamos una fecha a través de la evaluación manual de los registros médicos electrónicos por un médico independiente. La información demográfica se agregó a través de una revisión sistemática y retrospectiva de los registros médicos electrónicos de los pacientes y se utilizó para construir la Tabla de datos ampliados [1](#). Los datos clínicos se recopilaron mediante el software EPIC EHR y REDCap 9.3.6. En el momento de la adquisición y el procesamiento de la muestra, los investigadores desconocían las condiciones de los pacientes. La adquisición de sangre fue realizada y registrada por un equipo separado. La información sobre las condiciones de los pacientes no estuvo disponible hasta después del procesamiento y análisis de los datos brutos mediante citometría de flujo y ELISA. Un equipo clínico, separado del equipo experimental, realizó revisiones de gráficos para determinar las estadísticas relevantes. Los análisis de clasificación de citocinas y células activadas por fluorescencia se realizaron a ciegas. La información clínica de

los pacientes y la codificación de la puntuación clínica se revelaron solo después de la recopilación de datos.

Adquisición de datos clínicos

Los datos clínicos de pacientes y trabajadores de la salud se extrajeron de la plataforma de salud computacional de Yale – New Haven Health [33](#)–[34](#) en el modelo de datos Observational Medical Outcomes Partnership. Para cada muestra de investigación, se obtuvieron estadísticas resumidas, incluidos los valores mínimo, medio, mediano y máximo para las mediciones clínicas relevantes, incluida la escala de coma de Glasgow, dentro de ± 1 día de la recolección de la bioespecificación. Los criterios de valoración de la gravedad de la enfermedad, incluido el ingreso, el uso de oxígeno suplementario y la ventilación invasiva, se validaron como se describió anteriormente [35](#) .

Mediciones de ARN viral de muestras nasofaríngeas humanas

Las concentraciones de ARN se midieron a partir de muestras nasofaríngeas humanas mediante RT-qPCR como se describió anteriormente [32](#) . En resumen, se extrajo el ácido nucleico total de 300 μ l de medio de transporte viral (hisopo nasofaríngeo) utilizando el kit de aislamiento de ácido nucleico viral / patógeno MagMAX (ThermoFisher) y se eluyó en 75 μ l de tampón de elución. Para la detección de ARN del SARS-CoV-2, se probaron 5 μ l de plantilla de ARN como se describió anteriormente [36](#), utilizando los conjuntos de cebadores / sondas de RT – PCR en tiempo real de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE. UU. 2019-nCoV_N1 y 2019-nCoV_N2, así como la RNasa P humana como control de extracción. Las copias de ARN del virus se cuantificaron usando una curva estándar de dilución diez veces mayor de las transcripciones de ARN que se generó previamente. Si la concentración de ARN era inferior al límite de detección (ND) que se determinó previamente, el valor se estableció en 0 y se utilizó para los análisis.

Inducción de levadura

Todas las levaduras fueron inducidas como se describió previamente [7](#) . En resumen, un día antes de la inducción, la levadura se expandió en medio de dextrosa sintética sin uracilo (SDO-Ura) a 30 ° C. Al día siguiente, las levaduras se indujeron mediante resuspensión a una densidad óptica de 1 en medio de galactosa sintética sin uracilo (SGO-Ura) suplementado con SDO-Ura al 10% y cultivando a 30 ° C durante aproximadamente 18 h.

RECOGER

El aislamiento de anticuerpos IgG para REAP se realizó como se describió anteriormente [71]. En resumen, se agregaron Triton X-100 y RNase A a las muestras de plasma en concentraciones finales de 0.5% y 0.5 mg ml⁻¹, respectivamente, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su uso para reducir el riesgo de cualquier virus potencial en el plasma. Se lavaron veinte µl de resina magnética de proteína G (soluciones líticas) con PBS estéril, se resuspendieron en 75 µl de PBS estéril y se añadieron a 25 µl de plasma. La mezcla de plasma y resina se incubó durante la noche a 4 ° C con agitación. La resina se lavó con PBS estéril, se resuspendió en 90 µl de glicina 100 mM, pH 2,7, y se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se extrajo y se añadió a 10 µl de Tris 1 M estéril pH 8,0. En este punto, se midió la concentración de IgG usando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific). Para generar IgG empobrecida en levadura para su uso en REAP, se añadió IgG purificada a 10⁸ indujo levadura de vector vacío (pDD003) y se incubó durante 3 ha 4 ° C con agitación. Se colocaron mezclas de levadura-IgG en placas de filtro de 96 pocillos de 0,45 µm (Thomas Scientific) y se eluyó la IgG empobrecida en levadura en placas estériles de 96 pocillos mediante centrifugación a 3.000 g durante 3 min.

La selección de la biblioteca de levadura para REAP se realizó como se describió anteriormente [71]. En resumen, se apartaron 400 µl de la biblioteca de levadura inducida para permitir la comparación con las bibliotecas de post-selección. Entonces, 10⁸ levadura inducida se añadieron a los pocillos de una placa de microtitulación de fondo en V de 96 pocillos estériles, se resuspendieron en 100 µl de PBE (PBS con BSA al 0,5% y EDTA 0,5 mM) que contenían 10 µg de anticuerpo derivado del paciente, y se incubaron con agitación durante 1 ha 4 ° C. Las levaduras se lavaron dos veces con PBE, se resuspendieron en 100 µl de PBE con una dilución 1: 100 de anticuerpo Fc IgG antihumano de biotina (clon HP6017, BioLegend) y se incubaron con agitación durante 1 ha 4 ° C. Las levaduras se lavaron dos veces con PBE, se resuspendieron en 100 µl de PBE con una dilución 1:20 de Streptavidin MicroBeads (Miltenyi Biotec) y se incubaron con agitación durante 30 min a 4 ° C. Todos los pasos siguientes se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Se colocaron columnas Multi-96 (Miltenyi Biotec) en un separador MultiMACS M96 (Miltenyi Biotec) en modo de selección positiva y las columnas se equilibraron con etanol al 70% y PBE desgasificado. Las levaduras se resuspendieron en 200 µl de PBE desgasificado y se colocaron en las columnas. Las columnas se lavaron tres veces con PBE desgasificado. Para eluir la levadura seleccionada, se retiraron las columnas del separador y se colocaron sobre placas de 96 pocillos profundos. Luego, se añadieron 700 µl de PBE desgasificado a cada pocillo de la columna y la columna y la placa de pozos profundos se centrifugaron brevemente. Este proceso se repitió tres veces. Las levaduras se recuperaron en 1 ml de SDO-Ura a 30 ° C.

El ADN se extrajo de bibliotecas de levadura utilizando kits de Miniprep de plásmido de levadura Zymoprep-96 o kits de Miniprep II de plásmido de levadura Zymoprep (Zymo Research) de acuerdo con los protocolos estándar del fabricante. Se utilizó una primera ronda de PCR para amplificar una secuencia de ADN que contenía el código de barras de visualización de la proteína en el plásmido de levadura. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 1 µl de ADN plasmídico, cebadores 159_DIF2 y 159_DIR2, y las siguientes configuraciones de PCR: desnaturalización a 98 ° C, hibridación a 58 ° C, extensión a 72 ° C, 25 rondas de amplificación. Se realizó una segunda ronda de PCR utilizando 1 µl de producto de PCR de primera ronda, cebadores de biblioteca de índice dual Nextera i5 e i7 (Illumina) junto con cebadores de índice dual que contienen índices personalizados y los siguientes ajustes de PCR: desnaturalización a 98 ° C, 58 ° C recocido, extensión a 72 ° C, 25 rondas de amplificación. Los productos de la PCR se combinaron y se procesaron en un gel de agarosa al 1%. Se cortó la banda correspondiente a 257 pares de bases y se extrajo el ADN (biblioteca NGS) utilizando un kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) de acuerdo con los protocolos estándar del fabricante. La biblioteca NGS se secuenció utilizando un kit de alto rendimiento de 75 ciclos de Illumina NextSeq 500 y NextSeq 500/550 v2.5 con secuenciación de un solo extremo de 75 pares de bases de acuerdo con los protocolos estándar del fabricante. Se recogió un mínimo de 50.000 lecturas por muestra y la biblioteca de preselección se muestreó a una profundidad diez veces mayor que otras muestras. 5 con secuenciación de un solo extremo de 75 pares de bases de acuerdo con los protocolos estándar del fabricante. Se recogió un mínimo de 50.000 lecturas por muestra y la biblioteca de preselección se muestreó a una profundidad diez veces mayor que otras muestras. 5 con secuenciación de un solo extremo de 75 pares de bases de acuerdo con los protocolos estándar del fabricante. Se recogió un mínimo de 50.000 lecturas por muestra y la biblioteca de preselección se muestreó a una profundidad diez veces mayor que otras muestras.

REAP análisis de datos

La puntuación REAP se calculó como se describió anteriormente [7](#). En primer lugar, se extrajeron los recuentos de códigos de barras a partir de datos NGS sin procesar utilizando códigos personalizados. A continuación, se calculó el enriquecimiento clonal y agregado utilizando edgeR [37](#) y códigos personalizados. Para el enriquecimiento agregado, se sumaron los recuentos de códigos de barras en todos los códigos de barras únicos asociados con una proteína determinada, se normalizaron los tamaños de las bibliotecas en las muestras utilizando los parámetros edgeR predeterminados, se estimó la dispersión común y por etiquetas utilizando los parámetros edgeR predeterminados y las pruebas exactas que compararon cada muestra con la biblioteca de preselección se realizaron utilizando los parámetros edgeR predeterminados. El enriquecimiento agregado es, por tanto, los valores de

cambio de pliegue transformados en \log_2 de estas pruebas exactas con ceros en lugar de cambios de pliegue negativos. registro₂ Los valores de cambio de pliegues transformados para el enriquecimiento clonal se calcularon de manera idéntica, pero no se sumaron los recuentos de códigos de barras en todos los códigos de barras únicos asociados con una proteína determinada. El enriquecimiento clonal para una reactividad dada se definió como la fracción de clones del total de clones que se enriquecieron (cambio de veces de \log_2 transformado ≥ 2). Por tanto, la métrica de enriquecimiento clonal penaliza progresivamente a las proteínas con fracciones menores de clones enriquecidos. Esta métrica se implementó porque una verdadera reactividad debería enriquecer teóricamente todos los clones de levadura que muestran una proteína determinada.

Agregado (E_a) y enriquecimiento clonal (E_c) para una proteína dada, un factor de escala (β_u) sobre la base del número de clones de levadura únicos (levadura que tiene un código de barras de ADN único) que muestran una proteína determinada, y un El factor de escala (β_f) sobre la base de la frecuencia general de levadura en la biblioteca que muestra una proteína determinada se utilizó como entradas para calcular la puntuación REAP, que se define como puntuación REAP = $E_a \times (E_c)^2 \times \beta_u \times \beta_f$. β_u y β_f son factores de escala logarítmica que penalizan progresivamente la puntuación REAP de proteínas con números bajos de códigos de barras únicos o frecuencias bajas en la biblioteca. β_u se aplica a las proteínas con ≤ 5 clones de levadura únicas en la biblioteca y β_f se aplica a las proteínas con una frecuencia de $\leq 0,0001$ en la biblioteca. β_f se implementó para mitigar las señales de enriquecimiento espúreas de proteínas de baja frecuencia, que podrían ocurrir debido a errores de secuenciación o estocasticidad en el proceso de selección. Se implementó β_u porque la métrica de enriquecimiento clonal es menos válida para proteínas con un número bajo de clones de levadura únicos, lo que disminuye la confianza en la validez de la reactividad. β_u se define como $\beta_u = \ln(x_u + 0.5) / 1.705$ y β_f se define como $\beta_f = \ln(x_f + 7.1) / 1.16$, donde x_u es el número de clones de levadura únicos para una proteína dada y x_f es el registro₁₀ de frecuencia-transformado de una proteína dada en la biblioteca. Los antígenos (excluidos los RBD de coronavirus y el IL-6R) con una puntuación REAP media superior a 0,5 en todas las muestras se definieron como "pegajosos" y se excluyeron de análisis posteriores. Los antígenos definidos como dirigidos al sistema inmunológico y asociados a tejidos se identificaron manualmente.

Medición ELISA de autoanticuerpos

En resumen, se añadieron 200 ng de proteína recombinante comprada o producida independientemente en 100 μ l de PBS pH 7,0 a placas Immulon 2HB de fondo plano de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) y se colocaron

a 4 ° C durante la noche. Las placas se lavaron una vez con 225 µl de tampón de lavado ELISA (PBS + Tween 20 al 0,05%) y se añadieron al pocillo 150 µl de tampón de bloqueo ELISA (PBS + albúmina de suero humano al 2%). Las placas se incubaron durante 2 ha temperatura ambiente. Se eliminó el tampón de bloqueo de ELISA de los pocillos y se añadieron a cada pocillo las diluciones apropiadas de muestra de plasma en 100 µl de tampón de bloqueo de ELISA. Las placas se incubaron durante 2 ha temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con 225 µl de tampón de lavado ELISA y HRP anti-IgG humana de cabra (Millipore Sigma) o HRP anti-IgG humana específica de isotipo (Southern Biotech; IgG1: clon HP6001, IgG2: clon 31-7-), IgG3: clon HP6050, IgG4: clon HP6025) en 100 µl de tampón de bloqueo de ELISA se añadió a los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 ha temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con 225 µl de tampón de lavado ELISA. Luego, se agregaron 50 µl de sustrato TMB (BD Biosciences) a los pocillos y las placas se incubaron durante 20 a 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 µl de ácido sulfúrico 1 M a los pocillos y se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek). Las proteínas utilizadas son las siguientes: ACKR1 – mIgG2a-Fc (producido internamente), BAMBI (Sino Biological, 10890-H08H-20), C1qB (Sino Biological, 10941-H08B-20), CCL15 (PeproTech, 300-43), CCL16 (PeproTech, 300-44), CNPY3 (producido internamente), CNPY4 (producido internamente), CST5 (producido internamente), CD38 (R&D Systems, 2404-AC-010), GM-CSF (producido internamente), CXCL1 (PeproTech, 300-11), CXCL3 (PeproTech,

Medición ELISA de anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2

Los anticuerpos específicos del SARS-CoV-2 se midieron como se describió previamente [38](#). En resumen, las muestras de plasma se trataron primero con Triton X-100 al 0,5% y 0,5 mg ml⁻¹ de RNasa A a temperatura ambiente durante 30 min para inactivar los virus potencialmente infecciosos. Mientras tanto, la proteína recombinante SARS-CoV-2 S1 (ACRO Biosystems, S1N-C52H3) o la proteína recombinante SARS-CoV-2 RBD (ACRO Biosystems, SPD-C82E9) se utilizó para recubrir placas MaxiSorp de 96 pocillos (Thermo Scientific) en una concentración de 2 µg ml⁻¹ en PBS en 50 µl por pocillo, seguido de incubación durante la noche a 4 ° C. Se eliminó el tampón de recubrimiento y las placas se incubaron durante 1 ha temperatura ambiente con 200 µl de solución de bloqueo (PBS con 0,1% de Tween-20 y 3% de leche en polvo). El plasma se diluyó 1:50 en solución de dilución (PBS con 0,1% de Tween-20 y 1% de leche en polvo) y se añadieron 100 µl de suero diluido durante 2 ha temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T (PBS con 0,1% de Tween-20) y 50 µl de anticuerpo IgG antihumano HRP a una dilución de 1: 5.000 (GenScript) o con anticuerpo de peroxidasa IgM antihumana a una dilución de 1: 5.000 (Sigma-Aldrich) en solución de dilución se añadieron a cada pocillo. Después de 1 h de

incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron seis veces con PBS-T. Las placas se revelaron con 100 μ l de TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences 555214) y la reacción se detuvo después de 12 minutos mediante la adición de 100 μ l de ácido sulfúrico 2 N. A continuación, se leyeron las placas a una longitud de onda de 450 nm y 570 nm. Los valores de corte para la seropositividad se determinaron como 0,392, 0,436 y 0,341 para IgG anti-S1, IgM anti-S1 e IgG anti-RBD, respectivamente. Se analizaron ochenta y sesenta y nueve muestras de plasma prepanémicas para establecer las líneas de base negativas para los antígenos S1 y RBD, respectivamente. Estos valores se determinaron estadísticamente con un nivel de confianza del 99%. Se analizaron ochenta y sesenta y nueve muestras de plasma prepanémicas para establecer las líneas de base negativas para los antígenos S1 y RBD, respectivamente. Estos valores se determinaron estadísticamente con un nivel de confianza del 99%. Se analizaron ochenta y sesenta y nueve muestras de plasma prepanémicas para establecer las líneas de base negativas para los antígenos S1 y RBD, respectivamente. Estos valores se determinaron estadísticamente con un nivel de confianza del 99%.

Validación funcional de autoanticuerpos anti-GM-CSF y autoanticuerpos dirigidos a IFN de tipo I

Se cultivaron células TF-1 (ATCC, CRL-2003) en RPMI (+ 10% de FBS inactivado por calor, 10 U ml⁻¹ de penicilina, 100 mg ml⁻¹ de estreptomina, piruvato de sodio 1 mM, 2 ng ml⁻¹ de GM-CSF (PeproTech, 300-03)) y se incubaron a 37 ° C, 5% de CO₂. Células THP-1 (ATCC, TIB-202) se cultivaron en RPMI (+ 10% FBS inactivado por calor, 10 U ml⁻¹ penicilina, 100 mg ml⁻¹ estreptomina) y se incubó a 37 ° C, 5% de CO₂. Para la validación de los autoanticuerpos de GM-CSF, las células TF-1 se privaron de GM-CSF recombinante 18 h antes de los experimentos. GM-CSF a 200 pg ml⁻¹ se incubó con diluciones de IgG purificada durante 15 min a temperatura ambiente y luego se usa para estimular las células TF-1 en una placa de 96 pocillos (2 \times 10⁵ células por pocillo) en un volumen final de 100 μ l (concentración final de 100 pg ml⁻¹). Para la validación de los autoanticuerpos contra IFN, se incubaron IFN α 2 (R&D Systems, 11100-1) e IFN ω (PeproTech, 300-02J) a 1500 pg ml⁻¹ y 2000 pg ml⁻¹, respectivamente, con diluciones de IgG purificada durante 15 min a temperatura ambiente y luego se utiliza para estimular las células THP-1 en una placa de 96 pocillos (3,5 \times 10⁵ células por pocillo) en un volumen final de 100 μ l (concentraciones finales de 750 y 1000 pg ml⁻¹, respectivamente). La IgG se purificó del plasma utilizando perlas magnéticas de proteína G (Soluciones Líticas) como se describió anteriormente [7](#). Después de 15 min de estimulación, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 min, se lavaron con PBS y se permeabilizaron en metanol al 100% sobre hielo durante 45 min. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBE y se tiñeron con anti-STAT5 pY694 (1:50) (BD Biosciences, 562077) o anti-STAT1 pY701 (1:50)

(BD Biosciences, 612564) conjugado con PE y TruStain FcX humano (1 : 100) (Biolegend, 422302) durante 1 h a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBE y se adquirieron en un citómetro de flujo SONY SA3800. Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo versión 10.6 (Tree Star). La señal pSTAT se midió en función de la intensidad de fluorescencia media (MFI). El porcentaje de señal máxima se calculó restando el MFI de fondo y calculando los valores como porcentaje de pSTAT MFI inducido por citocinas en ausencia de IgG. Las curvas se ajustaron utilizando una curva logística sigmoidea de cuatro parámetros. Las células TF-1 y THP-1 se compraron comercialmente y no fueron autenticadas por nosotros. No se analizaron las células TF-1 y THP-1 para determinar la contaminación por micoplasma.

Validación funcional de autoanticuerpos anti-CXCL1, anti-CXCL7 y anti-HCTR2

La señalización de CXCL1, CXCL7 y orexina se ensayó utilizando el sistema PRESTO-TANGO [39](#). Se sembraron células HTLA, una línea celular derivada de HEK293 que expresa de manera estable β -arrestina-TEV y tTA-luciferasa, en pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano estéril para cultivo de tejidos (35.000 células por pocillo) en 100 μ l DMEM (+ 10% FBS, 1% de penicilina-estreptomicina) e incubado a 37 ° C, 5% de CO₂. A las 18-24 h después de la siembra (aproximadamente 80-90% de confluencia celular), se mezclaron 200 ng de plásmido CXCR2-Tango o HCTR2-Tango en 20 μ l de DMEM y 600 ng de polietilimina-max (Polysciences, 24765-1) en 20 μ l de DMEM, se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y se añadió a cada pocillo. A las 18-24 h después de la transfección, el medio se reemplazó con 100 μ l de DMEM (+ 1% de penicilina-estreptomicina, HEPES 10 mM) que contenía 10 ng de CXCL7 (Peprotech, 300-14) o CXCL1 (PeproTech, 300-46), o 100 orexina A nM (Millipore Sigma, O6012) y 5 μ g de IgG aislada. La IgG se purificó del plasma utilizando perlas magnéticas de proteína G (Soluciones Líticas) como se describió anteriormente [7](#). A las 18-24 h después de la estimulación, el sobrenadante se reemplazó con 50 μ l de solución Bright-Glo (Promega) diluida 20 veces con PBS con HEPES 20 mM. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 20 min en la oscuridad y se cuantificó la luminiscencia usando un lector de microplacas multimodo Synergy HTX (BioTek). Las células HTLA fueron un regalo de N. Palm y se obtuvieron como se describió anteriormente [[39](#)]. Las células HTLA se autenticaron según su rendimiento en PRESTO-TANGO y no se analizaron para detectar contaminación por micoplasmas. Los plásmidos de tango fueron un regalo de B. Roth (plásmido Addgene n. ° 66260)

Validación funcional de autoanticuerpos anti-CD38 y anti-CD3 ϵ

Se aislaron células madre de médula ósea del fémur y la tibia de ratones C57BL / 6 de 8 semanas de edad. Las células se sembraron en RPMI (+ 10% de FBS inactivado por calor, 10 U ml⁻¹ de penicilina, 100 mg ml⁻¹ de estreptomicina (cRPMI)) con medio acondicionado de fibroblastos L929 al 30% (v / v) como fuente de M-CSF y incubado a 37 ° C, 5% CO₂. El día 3 después del aislamiento, se añadieron a las placas 10 ml de medio acondicionado de fibroblastos L929. Doscientos mil macrófagos derivados de médula ósea (7 días después del aislamiento) se sembraron en placas de 6 pocillos no tratados con TC en medio cRPMI + 10% L929. Al día siguiente, se marcaron células Raji (ATCC, CCL-86) o Jurkat (ATCC, TIB-152) usando CellTrace Far Red (Thermo Fisher) de acuerdo con los protocolos estándar del fabricante. Para el ensayo de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos de células T, se incubaron células Jurkat marcadas con 100 µg ml⁻¹ de IgG de control sano o autoanticuerpo CD3ε + IgG de paciente durante 30 min en hielo. Se usó IgG2a de ratón anti-CD3ε humano (clon OKT3, Biolegend) a 5 µg ml⁻¹ como control positivo. Las células Jurkat se lavaron con 10 ml de PBS. Se añadieron un millón de células Jurkat a cada pocillo y se incubaron durante 3 h. Para el ensayo de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos de células B, las células Raji se incubaron con plasma de paciente inactivado con complemento a una dilución 1:50 en PBS durante 30 min en hielo. Se usó IgG2a de ratón anti-CD38 humano (clon MAB2404, R&D systems) a 5 µg ml⁻¹ como control positivo. Las células Raji se lavaron una vez con 10 ml de PBS. Se agregaron quinientas mil células Raji a cada pocillo y se incubaron durante 3 h a 37 ° C, 5% de CO₂. Los macrófagos derivados de la médula ósea se separaron de la placa después de una incubación de 3 h con EDTA PBS 10 mM y se tiñeron con anti-ratón CD45-Pacific blue (clon 30-F11, Biolegend) durante 30 min a 4 ° C. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter). Las células Raji y Jurkat se compraron comercialmente y no fueron autenticadas por nosotros. No se analizaron las células Raji y Jurkat para determinar la contaminación por micoplasmas.

Ratones

Se compraron ratones B6.Cg-Tg (K18-ACE2) 2Prlmn / J (K18-hACE2) (stock no. 034860) y ratones C57BL / 6 (stock no. 000664) de Jackson Laboratories y posteriormente se criaron y alojaron en Yale. Universidad. Se utilizaron ratones mixtos de seis a diez semanas de edad durante todo el estudio. Todos los ratones se alojaron en grupos de 5 a 6 ratones por jaula y se mantuvieron en un ciclo de luz / oscuridad de 12 h (luces encendidas a las 07:00) a 22-25 ° C y 30-70% de humedad relativa bajo patógeno específico. condiciones libres. Todos los procedimientos utilizados en este estudio (emparejados por sexo y edad) cumplieron con las pautas federales y las políticas institucionales del Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Escuela de Medicina de Yale. Todos los estudios de infección se realizaron en instalaciones de nivel 3

de bioseguridad animal en la Universidad de Yale de acuerdo con los protocolos institucionales aprobados.

Infecciones de ratón SARS-CoV-2 y tratamientos con anticuerpos

Antes de la infección, los ratones se anestesiaron utilizando isoflurano al 30% (v / v) diluido en propilenglicol. Luego, 50 μ l de SARS-CoV-2 aislado USA-WA1 / 2020 (NR-52281; BEI Resources) a 2×10^4 o 6×10^4 Se administraron unidades formadoras de placa (PFU) por ml por vía intranasal a ratones, equivalente a 1.000 (dosis subletal) o 3.000 (dosis letal media) PFU por ratón, respectivamente. Después de la infección, se controlaron diariamente la pérdida de peso y la supervivencia. Los ratones reportados como "muertos" en este estudio fueron encontrados muertos, moribundos o sacrificados al 90% o al 80% de su peso corporal inicial. Para el bloqueo de IFNAR, los ratones se trataron intraperitonealmente una vez con 2 mg de anticuerpos bloqueantes un día antes de la infección (clon MAR1-5A3). Para el bloqueo de IL-18, los ratones se trataron intraperitonealmente tres veces cada uno con 0,5 mg de anticuerpos bloqueantes a los 0, 2 y 4 días después de la infección (clon YIGIF74-1G7). Para el bloqueo de IL-1 β , GM-CSF o IL-21R, los ratones fueron tratados intraperitonealmente tres veces cada uno con 0.2 mg de anticuerpos bloqueantes a los 0, 2 y 4 días después de la infección (anti-IL-1 β : clon B122; anti-GM-CSF: clon MP1-22E9; y anti-IL-21R: clon 4A9). La primera inyección de anticuerpos anti-IL18, anti-IL-1 β , anti-GM-CSF o anti-IL-21R se administró al menos 8 a 10 h antes de la infección. Todos los anticuerpos bloqueantes se adquirieron de BioXCell.

análisis estadístico

Los detalles de los modelos lineales y el análisis de componentes principales se pueden encontrar en los [métodos complementarios](#). Los detalles específicos de otros análisis estadísticos se encuentran en las leyendas de las figuras. El análisis de datos se realizó utilizando MATLAB, GraphPad Prism, R y los siguientes paquetes de R: ggplot2, edgeR, tidyverse, tidyr, dplyr, stringr, forcats, lme4, emmeans y ggpubr.

Resumen de informes

Más información sobre el diseño de la investigación está disponible en el [Resumen de informes de investigación de Nature](#) vinculado a este documento.

Disponibilidad de datos

El conjunto de datos de secuenciación de ARN publicado anteriormente está disponible públicamente en el Gene Expression Omnibus con el número de acceso [GSE107011](#). Todos los datos analizados en este estudio están

disponibles en el artículo y en la [información complementaria](#) . Los datos que no están disponibles en el manuscrito están disponibles de los autores correspondientes a solicitud razonable. [Los datos originales](#) se proporcionan con este documento.

Disponibilidad de código

Los códigos personalizados utilizados para el análisis en este estudio están disponibles públicamente en https://github.com/ring-lab/COVID-19_REAP_nature_2021 .

Referencias

1. 1.

Lucas, C. y col. Los análisis longitudinales revelan fallas inmunológicas en el COVID-19 severo. *Nature* **584** , 463–469 (2020).

[CAS Artículo](#) [Google Académico](#)

2. 2.

Maucourant, C. et al. Inmunotipos de células asesinas naturales relacionados con la gravedad de la enfermedad COVID-19. *Sci. Immunol.* **5** , eabd6832 (2020).

[CAS Artículo](#) [Google Académico](#)

3. 3.

Mann, ER y col. El perfil inmunológico longitudinal revela firmas mieloides clave asociadas con COVID-19. *Sci. Immunol.* **5** , eabd6197 (2020).

[Artículo](#) [Google Académico](#)

4. 4.

Lee, JS y col. La inmunofenotipificación de COVID-19 y la influenza destaca el papel de los interferones de tipo I en el desarrollo de COVID-19 grave. *Sci. Immunol.* **5** , eabd1554 (2020).

[CAS Artículo Google Académico](#)

5. 5.

Rodrigues, TS et al. Los inflamamasomas se activan en respuesta a la infección por SARS-CoV-2 y se asocian con la gravedad de COVID-19 en los pacientes. *J. Exp. Med.* **218**, e20201707 (2021).

[CAS Artículo Google Académico](#)

6. 6.

Vabret, N. et al. Inmunología de COVID-19: estado actual de la ciencia. *Immunity* **52**, 910–941 (2020).

[CAS Artículo Google Académico](#)

7. 7.

Wang, EY y col. REAP: una plataforma para identificar autoanticuerpos que se dirigen al exoproteoma humano. Preimpresión en <https://doi.org/10.1101/2021.02.11.430703> (2021).

8. 8.

Hassan, AO y col. Un modelo de infección por SARS-CoV-2 en ratones demuestra protección mediante anticuerpos neutralizantes. *Cell* **182**, 744–753.e4 (2020).

[CAS Artículo Google Académico](#)

9. 9.

García-Beltrán, WF et al. Los anticuerpos neutralizantes COVID-19 predicen la gravedad y la supervivencia de la enfermedad. *Cell* **184**, 476–488 (2021).

[CAS Artículo Google Académico](#)

10.10.

Woodruff, MC y col. Las respuestas de las células B extrafoliculares se correlacionan con los anticuerpos neutralizantes y la morbilidad en COVID-19. *Nat. Immunol.* **21**, 1506-1516 (2020).

[Artículo Google Académico](#)

11.11.

Bastardo, P. et al. Autoanticuerpos contra los IFN de tipo I en pacientes con COVID-19 potencialmente mortal. *Science* **370**, eabd4585 (2020).

[CAS Artículo Google Académico](#)

12.12.

Combes, AJ et al. Ausencia global y focalización de estados inmunes protectores en COVID-19 grave. *Nature* **591**, 124-130 (2021).

[ANUNCIOS CAS Artículo Google Académico](#)

13.13.

Zuo, Y. et al. Autoanticuerpos protrombóticos en suero de pacientes hospitalizados con COVID-19. *Sci. Transl. Med.* **12**, eabd3876 (2020).

[CAS Artículo Google Académico](#)

14.14.

Woodruff, MC, Ramonell, RP, Lee, FE-H. & Sanz, I. La autorreactividad clínicamente identificable es común en la infección grave por SARS-CoV-2. Preimpresión en <https://doi.org/10.1101/2020.10.21.20216192> (2020).

15.15.

Zhou, Y. et al. Características clínicas y autoinmunes de casos graves y críticos de COVID-19. *Clin. Transl. Sci.* **13**, 1077–1086 (2020).

[CAS Artículo Google Académico](#)

16. dieciséis.

Chang, SE y col. Autoanticuerpos IgG de nueva aparición en pacientes hospitalizados con COVID-19. Preimpresión en <https://doi.org/10.1101/2021.01.27.21250559> (2021).

17. 17.

Takahashi, T. et al. Diferencias de sexo en las respuestas inmunitarias que subyacen a los resultados de la enfermedad COVID-19. *Nature* **588**, 315–320 (2020).

[ANUNCIOS CAS Artículo Google Académico](#)

18. 18.

Mónaco, G. et al. Las firmas de secuencia de ARN normalizadas por la abundancia de ARNm permiten la deconvolución absoluta de los tipos de células inmunitarias humanas. *Rep. Celular* **26**, 1627–1640.e7 (2019).

[CAS Artículo Google Académico](#)

19. 19.

McCray, PB, Jr y col. Infección letal de ratones K18-hACE2 infectados con coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo. *J. Virol.* **81**, 813–821 (2007).

[CAS Artículo Google Académico](#)

20. 20.

Zheng, J. y col. Tratamientos y patogénesis de COVID-19, incluida la anosmia en ratones K18-hACE2. *Nature* **589**, 603–607 (2021).

[ANUNCIOS CAS Artículo Google Académico](#)

21.21.

Winkler, ES et al. La infección por SARS-CoV-2 de ratones humanos transgénicos con ACE2 provoca una inflamación pulmonar grave y una función alterada. *Nat. Immunol* . **21** , 1327-1335 (2020).

[CAS Artículo Google Académico](#)

22.22.

Mantovani, A., Dinarello, CA, Molgora, M. y Garlanda, C. Interleucina-1 y citocinas relacionadas en la regulación de la inflamación y la inmunidad. *Immunity* **50** , 778–795 (2019).

[CAS Artículo Google Académico](#)

23.23.

Zhou, T. y col. IL-18BP es un punto de control inmunológico secretado y una barrera para la inmunoterapia con IL-18. *Nature* **583** , 609–614 (2020).

[ANUNCIOS CAS Artículo Google Académico](#)

24.24.

Orzalli, MH y col. Una rama antiviral de la vía de señalización de IL-1 restringe la replicación del virus inmunoevasivo. *Mol. Cell* **71** , 825–840.e6 (2018).

[CAS Artículo Google Académico](#)

25.25.

Spolski, R. & Leonard, WJ Interleukin-21: un arma de doble filo con potencial terapéutico. *Nat. Rev. Drug Discov* . **13** , 379–395 (2014).

[CAS Artículo Google Académico](#)

26.26.

Trapnell, BC & Whitsett, JA GM-CSF regula la homeostasis del surfactante pulmonar y la defensa innata del huésped mediada por macrófagos alveolares. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 775–802 (2002).

[CAS Artículo Google Académico](#)

27.27.

Wang, G. y col. El nivel de proteína C reactiva puede predecir el riesgo de agravamiento de COVID-19. *Open Forum Infect. Dis.* **7**, ofaa153 (2020).

[Artículo Google Académico](#)

28.28.

Cheng, L. y col. Ferritina en la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19): revisión sistemática y metanálisis. *J. Clin. Laboratorio. Anal.* **34**, e23618 (2020).

[CAS PubMed PubMed Central Google Académico](#)

29.29.

Song, E. y col. Neuroinvasión de SARS-CoV-2 en cerebro humano y de ratón. *J. Exp. Med.* **218**, e20202135 (2021).

[CAS Artículo Google Académico](#)

30.30.

Nalbandian, A. et al. Síndrome de COVID-19 posaguda. *Nat. Med.* **27**, 601–615 (2021).

[CAS Artículo Google Académico](#)

31.31.

Nixon, JP y col. Trastornos del sueño, obesidad y envejecimiento: el papel de la orexina. *Envejecimiento Res. Rev.* **20** , 63–73 (2015).

[CAS](#) [Artículo](#) [Google Académico](#)

32.32.

Wyllie, AL y col. Muestras de saliva o hisopos nasofaríngeos para la detección del SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* **383** , 1283–1286 (2020).

[Artículo](#) [Google Académico](#)

33.33.

McPadden, J. y col. Investigación en salud y medicina de precisión: análisis de una plataforma de ciencia de datos escalable. *J. Med. Internet Res.* **21** , e13043 (2019).

[Artículo](#) [Google Académico](#)

34.34.

Schulz, WL, Durant, TJS, Torre, CJ, Jr, Hsiao, AL & Krumholz, HM
Análisis ágil del cuidado de la salud: permite la vigilancia de enfermedades en tiempo real con una plataforma de salud computacional. *J. Med. Internet Res.* **22** , e18707 (2020).

[Artículo](#) [Google Académico](#)

35.35.

McPadden, J. y col. Características clínicas y resultados de 7995 pacientes con infección por SARS-CoV-2. Preimpresión en <https://doi.org/10.1101/2020.07.19.20157305> (2020).

36.36.

Vogels, CBF y col. Comparaciones analíticas de sensibilidad y eficiencia de los conjuntos de cebadores y sondas de SRAS-CoV-2 RT-qPCR. *Nat. Microbiol.* **5**, 1299-1305 (2020).

[CAS](#) [Artículo](#) [Google Académico](#)

37.37.

Robinson, MD, McCarthy, DJ & Smyth, GK edgeR: un paquete de bioconductores para el análisis de expresión diferencial de datos de expresión génica digital. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).

[CAS](#) [Artículo](#) [Google Académico](#)

38.38.

Amanat, F. et al. Un ensayo serológico para detectar la seroconversión del SARS-CoV-2 en humanos. *Nat. Med.* **26**, 1033–1036 (2020).

[CAS](#) [Artículo](#) [Google Académico](#)

39.39.

Kroeze, WK y col. PRESTO-Tango como recurso de código abierto para el interrogatorio del GPCRome humano drogadicto. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 362–369 (2015).

[CAS](#) [Artículo](#) [Google Académico](#)

[Descargar referencias](#)

Agradecimientos

Agradecemos a todos los miembros de los laboratorios de AMR e AI, así como a E. Meffre, J. Craft y K. O'Connor, por su útil conversación y asistencia técnica; M. Linehan y H. Dong por su asistencia logística; HP Young por su asistencia técnica con la gestión de datos; NK Savalia y TJ Shelby por su discusión sobre técnicas estadísticas; y L. Steinman por sus útiles discusiones sobre autoanticuerpos contra HCRTR2. Este trabajo fue apoyado por la Mathers Family Foundation (para AMR y AI), la Ludwig Family Foundation (para AMR e AI), un suplemento a la Beca de Apoyo del Centro Oncológico de Yale 3P30CA016359-40S4 (para AMR), la Fundación Beatrice Neuwirth, Yale Facultades de Medicina y Salud Pública y beca

NIAID U19 AI08992. IMPACT recibió apoyo del Fondo de Recursos de Investigación COVID-19 de Yale. AMR cuenta además con el apoyo de un Premio a la Independencia Temprana del Director de los NIH (DP5OD023088), un Premio Pew-Stewart y la Fundación Robert T. McCluskey. TM y YD cuentan con el respaldo del Programa de capacitación en inmunología interdisciplinaria de Yale T32AI007019. JK y JRJ cuentan con el apoyo del Programa de formación de científicos médicos de Yale T32GM007205. Esquemas en la Fig. 3a, Datos extendidos Figs. 1a, 7a se crearon con [Biorender.com](https://biorender.com).

Información del autor

Notas del autor

1. Estos autores contribuyeron igualmente: Eric Y. Wang, Tianyang Mao, Jon Klein, Yile Dai

Afiliaciones

- 1. Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Eric Y. Wang, Tianyang Mao, Jon Klein, Yile Dai, John D. Huck, Jillian R. Jaycox, Feimei Liu, Ting Zhou, Benjamin Israelow, Patrick Wong, Carolina Lucas, Julio Silva, Ji Eun Oh, Eric Song, Emily S. Perotti, Neil S. Zheng, Suzanne Fischer, Alice Lu-Culligan, Anjelica Martin, Daniel Kim, Eriko Kudo, Melissa Linehan, Nicole Sonnert, Tyler Rice, William Khoury-Hanold, Yexin Yang, Yiyun Cao, Akiko Iwasaki y Aaron M. anillo
- 2. Centro de Investigación y Evaluación de Resultados, Hospital Yale-New Haven, New Haven, CT, EE. UU.**
Andreas Coppi y Wade L. Schulz
- 3. Departamento de Medicina Interna (Enfermedades Infecciosas), Facultad de Medicina de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Melissa Campbell, John B. Fournier, Camila D. Odio, Rick Martinello, Rupak Datta, Shelli F. Farhadian y Albert I. Ko
- 4. Departamento de Epidemiología de Enfermedades Microbianas, Escuela de Salud Pública de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Anne L. Wyllie, Chantal BF Vogels, Isabel M. Ott, Chaney C. Kalinich, Mary E. Petrone, Anne E. Watkins, Adam J. Moore, Arnau Casanovas-Massana, Christina A. Harden, Cole Jensen, Elizabeth B. White, Kristina Brower, Nathan D. Grubaugh, Albert I. Ko y Akiko Iwasaki

- 5. Departamento de Medicina, Sección de Medicina Pulmonar y Cuidados Intensivos, Facultad de Medicina de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Charles Dela Cruz
- 6. Departamento de Medicina de Laboratorio, Facultad de Medicina de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Wade L. Schulz
- 7. Departamento de Bioestadística, Escuela de Salud Pública de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Shuangge Ma
- 8. Instituto Médico Howard Hughes, Chevy Chase, MD, EE. UU.**
Akiko Iwasaki
- 9. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Aaron M. Anillo
- 10. Facultad de Medicina de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Abeer Obaid, Allison Nelson, Angela Nunez, Bertie Geng, Codruta Todeasa, David McDonald, Denise Shepard, Erin Silva, Giuseppe DeIuliis, Harold Rahming, Hong-Jai Park, Irene Matos, Jessica Nouws, Jordan Valdez, Kadi-Ann Rose, Laura Glick, Lokesh Sharma, Lorenzo Sewanan, Lynda Knaggs, Maksym Minasyan, Maria Batsu, Maura Nakahata, Michael Simonov, Mikhail Smolgovsky, Nida Naushad, Pavithra Vijayakumar, Ryan Handoko, Santos Bermejo, Xiaohua Peng e Yvette Strong
- 11. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina de la Universidad de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Edward Courchaine y Sean Bickerton
- 12. Programa de hepatitis viral de Yale, Facultad de Medicina de la Universidad de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Joseph Lim
- 13. Centro de Investigación Clínica de Yale, Facultad de Medicina de la Universidad de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Kelly anastasio y maxine kuang
- 14. Departamento de Neurología, Facultad de Medicina de la Universidad de Yale, New Haven, CT, EE. UU.**
Michael H. Askenase y Sofia Velázquez

**15. Departamento de Biología Molecular, Celular y del Desarrollo,
Facultad de Medicina de la Universidad de Yale, New Haven, CT,
EE. UU.**

Sarah profeta

Consorticios

Equipo IMPACT de Yale

- Abeer Obaid
- , Adam J. Moore
- , Arnau Casanovas-Massana
- , Alice Lu-Culligan
- , Allison Nelson
- , Ángela Núñez
- , Anjelica Martín
- , Bertie Geng
- , Camila D. Odio
- , Christina A. Harden
- , Codruta Todeasa
- , Cole Jensen
- , Daniel Kim
- , David McDonald
- , Denise Shepard
- Por Edward Courchaine
- , Elizabeth B. White
- , Erin Silva
- , Eriko Kudo
- , Giuseppe DeIuliis
- , Harold Rahming
- , Parque Hong-Jai
- , Irene Matos
- , Jessica Nouws
- , Jordan Valdez
- , Joseph Lim
- , Kadi-Ann Rose
- , Kelly Anastasio
- , Kristina Brower
- , Laura Glick
- , Lokesh Sharma
- , Lorenzo Sewanan
- Por Lynda Knaggs
- , Maksym Minasyan
- , María Batsu
- , Maxine Kuang

- , Maura Nakahata
- , Melissa Linehan
- , Michael H. Askenase
- , Michael Simonov
- , Mikhail Smolgovsky
- , Nicole Sonnert
- , Nida Naushad
- , Pavithra Vijayakumar
- , Rick Martinello
- , Rupak Datta
- , Ryan Handoko
- , Santos Bermejo
- , Sarah Profeta
- , Sean Bickerton
- , Sofia Velázquez
- , Tyler Rice
- , William Khoury-Hanold
- , Xiaohua Peng
- , Yexin Yang
- , Yiyun Cao
- E Yvette Strong

Contribuciones

Experimentos diseñados por EYW, TM, JK, YD, JDH, JRJ, AI y AMR. EYW e YD realizaron el ensayo REAP. EYW, YD, JDH, JRJ, FL, ESP y SF realizaron validaciones bioquímicas y funcionales. TM, BI y E. Song realizaron experimentos con ratones. CL, PW, JK, JS, TM y JEO definieron parámetros para experimentos de citometría de flujo y recolectaron y procesaron muestras de células mononucleares de sangre periférica de los pacientes. ALW, CBFV, IMO, CCK, MEP y AEW realizaron los ensayos de concentración de ARN del virus. NDG supervisó los ensayos de concentración de ARN del virus. BI y JK recopilaron datos epidemiológicos y clínicos. Los CDC, SF, AIK, MC y JBF ayudaron en el diseño, reclutamiento y seguimiento de cohortes de pacientes hospitalizados y trabajadores de la salud. AC realizó la agregación y gestión de datos clínicos. WLS agregación y gestión de datos clínicos supervisados. Datos analizados por EYW, TM, JK, NSZ, YD, JDH, JRJ, AI y AMR. SM supervisó el análisis estadístico. EYW, TM, JK, AI y AMR escribieron el artículo. AMR e AI supervisaron la investigación. Los autores del equipo de investigación IMPACT de Yale contribuyeron a la recopilación y almacenamiento de muestras de pacientes, así como a la recopilación de datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes.

Autores correspondientes

Correspondencia a Akiko Iwasaki o Aaron M. Ring.

Declaraciones de ética

Conflicto de intereses

AMR, EYW y YD son inventores de una solicitud de patente estadounidense pendiente (PCT / US21 / 23521) presentada por la Universidad de Yale que describe la tecnología REAP utilizada en este artículo. AMR es el fundador de Seranova Bio, el licenciatario comercial de la tecnología REAP. AI se desempeña como consultor para Spring Discovery, Boehringer Ingelheim y Adaptive Biotechnologies.

Información adicional

Información de la revisión por pares *Nature* agradece a Petter Brodin, Karl Dane Wittrup y los otros revisores anónimos por su contribución a la revisión por pares de este trabajo. Los informes de los revisores pares están disponibles.

Nota del editor Springer Nature permanece neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.

Figuras y tablas de datos ampliados

[Datos extendidos Fig. 1 Pantalla REAP de pacientes con COVID-19.](#)

a, Un esquema simplificado de REAP. Los anticuerpos se incuban con una biblioteca de levadura con código de barras que muestra miembros del exoproteoma. Las levaduras unidas a anticuerpos se enriquecen mediante la clasificación basada en columnas magnéticas y el enriquecimiento se cuantifica mediante la secuenciación de próxima generación. **b**, Mapa de calor de todas las reactividades perfiladas en todas las muestras de pacientes estratificadas por gravedad de la enfermedad y utilizando la misma escala de colores que en la Fig. [1a](#). Los antígenos pegajosos (como se definen en Métodos) se eliminaron del mapa de calor. **c**, Puntuaciones RBD REAP de SARS-CoV-2 para muestras de pacientes con COVID-19 estratificadas por reactividad ELISA RBD positiva o negativa. **D**, Puntuaciones REAP de IL-6R para muestras de pacientes con COVID-19 estratificadas por tratamiento con una terapia biológica anti-IL-6R (tocilizumab o sarilumab). Las muestras recogidas al menos un día después de la infusión se consideraron tratadas. Las muestras recolectadas el día de la infusión se excluyeron del análisis debido a la incertidumbre en el momento de la recolección de la muestra. La significancia en **c**, **d** se determinó usando un modelo lineal mixto (Métodos). En **c**, **d**, *n* los valores incluyen muestras longitudinales del mismo paciente.

[Datos fuente](#)

Datos extendidos Fig. 2 Comparaciones de reactividades y parámetros clínicos o inmunológicos entre grupos de pacientes.

a , Número de reactividades positivas por muestra en varios puntos de corte de la puntuación REAP, estratificados por la gravedad de la enfermedad. **b** , Días desde el inicio de los síntomas (DFS0) en muestras de pacientes con COVID-19 grave o moderado. Los datos de días desde el inicio de los síntomas no estaban disponibles para un número limitado de muestras de cada grupo y no estaban disponibles para ninguna muestra de individuos con COVID-19 leve o sin síntomas. Se muestran la mediana (línea continua) y el primer y tercer cuartil (líneas discontinuas). **c** , Número de reactividades positivas por muestra en varios puntos de corte de la puntuación REAP, estratificado por sexo del paciente. **d** , Número de reactividades positivas en muestras de pacientes con COVID-19, LES o APECED en varios puntos de corte. Los pacientes con LES o APECED fueron evaluados como se describió anteriormente.⁷ . Debido al tamaño más pequeño de la biblioteca de exoproteomas de levadura utilizada para cribar las muestras de pacientes con LES o APECED, las reactividades en muestras de pacientes con COVID-19 contra proteínas que no estaban en la biblioteca de exoproteomas de levadura descrita anteriormente se eliminaron de estos análisis. **e** , Número de reactividades positivas dirigidas al sistema inmunológico por muestra en varios puntos de corte de la puntuación REAP, estratificados por la gravedad de la enfermedad. **f** , Porcentajes promedio de células B doble negativas (IgD⁻ CD27⁻) entre leucocitos periféricos en pacientes con COVID-19 estratificados por gravedad de la enfermedad y controles no infectados (neg.). En **a - e** , *n* los valores incluyen muestras longitudinales del mismo paciente. En **f** , los valores *n* indican muestras de pacientes únicos. La significancia se determinó utilizando modelos lineales mixtos (**a - e**) (Métodos) o una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn de dos caras (**f**). Las medianas están representadas por una línea discontinua y el primer y tercer cuartiles están representados por líneas de puntos para todos los gráficos de esta figura.

[Datos fuente](#)

Datos extendidos Fig. 3 Los autoanticuerpos exhiben una cinética de desarrollo variada en pacientes con COVID-19.

a , Porcentaje de reactividades (puntuación REAP mayor que la puntuación de corte) en pacientes con COVID-19 presente dentro de los 10 días posteriores al inicio de los síntomas en varios puntos de corte. **b** , Porcentaje de reactividades en pacientes con COVID-19 que tuvieron una puntuación REAP menor que la puntuación de corte (utilizando varios puntos de corte) en el primer punto de tiempo muestreado y un aumento en la puntuación de REAP de al menos 1 en el último punto de tiempo . **c** , Porcentaje de reactividades en pacientes con COVID-19 que tenían una puntuación REAP mayor que la puntuación de corte (utilizando varios puntos de corte) en el primer punto de

tiempo muestreado y una disminución en la puntuación de REAP de al menos 1 en el último punto de tiempo. Para **a - c**, todos los pacientes con COVID-19 con muestras longitudinales disponibles ($n = 77$ pacientes) se incluyeron en los cálculos. **d - f**, Gráficas de cambios longitudinales en la puntuación REAP para 'probable preexistente' (**d**), 'recién adquirido' (**e**) y 'menguante' (**f**) Reactividades REAP en pacientes individuales junto con valores de ELISA anti-pico S1 escalados en los mismos pacientes. Los valores de ELISA escalados se definen como valores de densidad óptica de ELISA anti-pico S1 (450–570 nm) multiplicados por cuatro. En cada gráfico, los pacientes únicos están representados por líneas de colores únicos. Para un paciente determinado, las líneas continuas conectan las puntuaciones REAP de reactividades contra los antígenos respectivos en varios puntos de tiempo y las líneas de trazos conectan los valores de ELISA S1 anti-picos escalados en esos mismos puntos de tiempo. La línea gris punteada indica el valor de corte de positividad de ELISA escalado (métodos).

[Datos fuente](#)

[Datos extendidos Fig. 4 Validación bioquímica y funcional de autoanticuerpos en pacientes con COVID-19.](#)

a, ELISA de autoanticuerpos pan-IgG de **un** solo punto realizado con una dilución de plasma 1:25 o 1:50 (indicado en los títulos de los gráficos). La línea punteada representa el promedio del individuo no infectado (trabajador de la salud) más 3 sd. Para los controles, los resultados (promedios de duplicados técnicos) de muestras biológicamente independientes se muestran en la misma columna (n indicado debajo de cada columna). Para los pacientes con COVID-19, los resultados de un paciente se muestran en cada columna y los duplicados técnicos se representan como puntos distintos. **b - d**, GM-CSF (**b**), CD38 (**c**) e IL-18R β (**d**) ELISA de autoanticuerpos pan-IgG realizados con diluciones seriadas de plasma de pacientes con COVID-19 o individuos no infectados. Los resultados son promedios de dos réplicas técnicas. Las curvas se ajustaron utilizando una curva logística sigmoidea de cuatro parámetros. Los experimentos en **a - d** se realizaron una vez. **e**, Porcentaje de varianza explicada para componentes principales a partir del análisis de componentes principales en la figura [1d](#). **f**, Puntuaciones del segundo componente principal de muestras de pacientes con COVID-19 estratificadas por puntuación clínica. Las líneas negras continuas representan las medias del grupo. **g**, El modelo de efectos fijos se ajusta a un modelo lineal generalizado de efectos mixtos con la puntuación del segundo componente principal como variable dependiente (Métodos). **h**, **i**, puerta de citometría de flujo para el ensayo de fagocitosis de macrófagos Raji (**h**) y Jurkat (**i**) en la Fig. [2c](#). Ensayo de señalización de **j**, **k**, IFN α 2 (**j**) e IFN ω (**k**) realizado con IgG de pacientes con COVID-19 que dieron positivo al autoanticuerpo anti-IFN α 2 o anti-IFN ω o de individuos no infectados. Los resultados son promedios de dos réplicas técnicas de un experimento. **l**, Ajustes del modelo de efectos fijos para el modelo lineal generalizado de efectos mixtos de la

figura [2d](#) (Métodos). **metro**, Duración de la estancia hospitalaria en pacientes con y sin autoanticuerpos dirigidos a los IFN de tipo I, estratificados por gravedad de la enfermedad. La significancia en **m** se determinó usando una prueba de suma de rangos de Wilcoxon de dos lados. En **f**, los valores de *n* incluyen muestras longitudinales del mismo paciente. Todos los demás valores de *n* en esta figura indican muestras de pacientes únicos.

[Datos fuente](#)

Datos ampliados Fig. 5 Efectos de los autoanticuerpos anti-citoquinas sobre las correspondientes concentraciones plasmáticas de citoquinas.

a - t, concentración promedio de plasma CCL11 (**a**), CCL15 (**b**), CCL2 (**c**), CCL26 (**d**), CCL8 (**e**), CXCL1 (**f**), CXCL12 (**g**), CXCL13 (**h**), FLT3LG (**i**), IFN α 2 (**j**), IL-1A (**k**), IL-1B (**l**), IL-13 (**m**), IL-16 (**n**), IL-21 (**o**), IL-22 (**p**), IL6 (**q**), PDGFA (**r**), TGF α (**s**) y TSLP (**t**) medido mediante un ensayo Luminex en pacientes estratificados por la gravedad de la enfermedad COVID-19 y la reactividad REAP (autoanticuerpo positivo) (puntuación REAP ≥ 2 en cualquier momento) frente a la citocina correspondiente. Los datos se presentan como diagramas de caja con el primer cuartil, mediana, tercer cuartil, bigotes (valores mínimo y máximo dentro del primer y tercer cuartil $\pm 1,5 \times$ el rango intercuartílico) y los puntos de datos individuales indicados. La significancia se determinó utilizando pruebas de suma de rangos de Wilcoxon de dos lados. Todos los valores de *n* en esta figura indican muestras de pacientes únicos.

[Datos fuente](#)

Datos extendidos Fig. 6 Correlaciones adicionales entre autoanticuerpos dirigidos a proteínas de superficie de células inmunes.

a, Reactividad media de IgM anti-SARS-CoV-2 RBD medida por ELISA en pacientes estratificados por la gravedad de la enfermedad COVID-19 y la reactividad REAP contra las proteínas mostradas en células B (como se define en la Fig. [2e](#)). **b**, Porcentaje medio entre los monocitos totales de monocitos clásicos, monocitos intermedios y monocitos no clásicos en pacientes estratificados por la gravedad de la enfermedad COVID-19 y la reactividad REAP frente a proteínas que se muestran preferentemente en los monocitos clásicos e intermedios (como se define en la Fig. [2f](#)). **c**, Porcentaje medio de células T CD8⁺, células T asesinas naturales (NKT) y células asesinas naturales entre los leucocitos periféricos en pacientes estratificados por la gravedad de la enfermedad COVID-19 y la reactividad REAP contra CD3 ϵ . **d**, proporción media de células T CD4⁺a células asesinas naturales, relación de células T CD8⁺a células asesinas naturales y relación de células T asesinas naturales a células asesinas naturales entre los leucocitos periféricos en pacientes estratificados por la gravedad de la enfermedad COVID-19 y reactividad REAP contra CD3 ϵ . Células T entre leucocitos periféricos en pacientes estratificados por gravedad de la enfermedad COVID-19 y reactividad REAP contra CD38. **g**, diagrama de flujo representativo de

células B (CD19⁺ HLA-DRe , Diagrama de flujo representativo de células T (CD3⁺), células asesinas naturales (CD56⁺) y células T asesinas naturales (CD3⁺ CD56⁺) para **c**, **d**, **f**, Porcentaje medio de células B, células asesinas naturales, células T CD4⁺ activadas y CD8⁺ activadas para **f**, **h**, Gráfico de flujo representativo de células T CD8⁺ activadas (CD38⁺ HLA-DR⁺) para **f**. La significancia en **a** se determinó usando una prueba de suma de rangos de Wilcoxon de dos lados. Todos los valores de esta figura indican muestras de pacientes únicos. Todos los diagramas de caja se presentan con la mediana, el primer y tercer cuartil, los bigotes (valores mínimo y máximo dentro del primer y tercer cuartil $\pm 1,5 \times$ el rango intercuartílico) y los puntos de datos individuales indicados.

[Datos fuente](#)

Datos ampliados Fig. 7 Caracterización inmunológica y clínica adicional de los efectos de los autoanticuerpos en un modelo de ratón de COVID-19.

a - n, esquema del experimento (**a**) en el que ratones K18-hACE2 fueron infectados intranasalmente con una dosis subletal (**b - f**) o letal media (**g - n**) de SARS-CoV-2 (aislado USA-WA1 / 2020) y tratados con los anticuerpos indicados. **b**, **c**, frecuencia relativa (**b**) y el número absoluto (**c**) de pulmón Ly6C⁺ CD11b⁺ CD64⁺ macrófagos de simulacro infectadas, SARS-CoV-2-infectado y tratado con PBS, y-infectado-CoV-2 SARS y Ratones K18-hACE2 tratados con anti-IFNAR. **d**, Expresión de CD64 en CD11b infiltrante de pulmón⁺ Monocitos^{altos} Ly6C⁺. **e**, **f**, frecuencia relativa (**e**) y número absoluto (**f**) de linfocitos CD44⁺ CD69⁺ (linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos NK1.1⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$). **g**, **h**, cargas de ARN viral (**g**) y títulos infecciosos (**h**) de homogeneizados de tejido pulmonar de personas infectadas de forma simulada, infectadas con SARS-CoV-2 y tratadas con PBS, e infectadas con SARS-CoV-2 y anti-IL-18 ratones tratados medidos por qPCR de transcripción inversa y ensayo de placa, respectivamente. **yo**, **j**, Frecuencia relativa (**i**) o número absoluto (**j**) de células CD11b⁺ y KLRG1⁺ NK1.1⁺ en tejidos pulmonares de ratones tratados con PBS- y anti-IL-18. **k - n**, peso corporal normalizado de anti-IL-18- (**k**), anti-IL-1 β - (**l**), anti-IL-21R- (**m**), anti-GM-CSF- (**n**) y PBS- ratones K18-hACE2 tratados, infectados con SARS-CoV-2 desde el día 1 al 14 después de la infección. La significancia se determinó mediante un análisis de varianza de una vía seguido de la corrección de Tukey (**b - f**, **g**) y pruebas *t de* dos colas no apareadas (**yo**, **j**). Todos los valores de *n* en esta figura representan ratones biológicamente independientes examinados en dos experimentos independientes.

[Datos fuente](#)

Datos extendidos Fig. 8 Estrategias de activación de citometría de flujo para experimentos de inmunofenotipificación.

a , estrategia de activación para identificar las células B descritas en la figura [2e](#) , los monocitos descritos en la figura [2f](#) , datos extendidos de la figura [6b](#) , y células T, células T asesinas naturales y células asesinas naturales descritas en la figura [2g](#) , datos extendidos Fig. [6c, d, f](#) , en células mononucleares de sangre periférica humana. **b** , Estrategia de apertura para identificar monocitos CD11b⁺ Ly6C^{altos} y linfocitos Ly6C⁺ CD11b⁺ CD64⁺ en tejidos pulmonares de ratón descrita en Datos extendidos Fig. [7b–d](#) . **c** , estrategia de puerta para identificar CD44⁺ CD69⁺ linfocitos en tejidos pulmonares de ratón descritos en Datos extendidos Fig. [7e, f](#) . **d** , Estrategia de activación para identificar las células asesinas naturales KLRG1⁺ y CD11b⁺ descritas en Datos extendidos Fig. [7i, j](#) .

[Datos extendidos Fig. 9 Los autoanticuerpos asociados al tejido se correlacionan con los parámetros clínicos en pacientes con COVID-19.](#)

Mapa de calor de los valores de proteína *P* de REAP transformados en $-\log_{10}$ por pares a partir de ajustes de modelos lineales generalizados que tienen en cuenta la edad, el sexo y la puntuación máxima de REAP en la estimación de los valores clínicos promedio o mínimos de la admisión hospitalaria. En este análisis se incluyeron un total de 135 muestras de pacientes únicos ($n = 135$). La intensidad representa los valores *P* y el color indica la direccionalidad de los pares gen-parámetro (el rojo indica un cambio positivo, el azul indica un cambio negativo. Las columnas grises indican genes excluidos del análisis debido a un número insuficiente de pacientes ($n < 2$). Los asteriscos denotan relaciones por pares que fueron significativas después de la corrección para comparaciones múltiples (tasa de descubrimiento falso). Los detalles específicos de los modelos lineales generalizados se pueden encontrar en los Métodos. Las proteínas se clasificaron como en la Fig. [4a](#) .

[Datos fuente](#)

Tabla de datos ampliados 1 Características demográficas y clínicas de los pacientes de la cohorte IMPACT

[Mesa de tamaño completo](#)

Información suplementaria

[Información suplementaria](#)

Este archivo contiene los métodos complementarios.

[Resumen de informes](#)

[Cuadro complementario 1](#)

La lista completa de antígenos.

[Archivo de revisión por pares](#)

Datos fuente

[Fuente de datos Fig.1](#)

[Fuente de datos Fig.2](#)

[Fuente de datos Fig.3](#)

[Fuente de datos Fig.4](#)

[Datos de origen Datos ampliados Fig.1](#)

[Datos de origen Datos extendidos Fig.2](#)

[Datos de origen Datos ampliados Fig.3](#)

[Datos de origen Datos ampliados Fig.4](#)

[Datos de origen Datos ampliados Fig.5](#)

[Datos de origen Datos extendidos Fig.6](#)

[Datos de origen Datos extendidos Fig.7](#)

[Datos de origen Datos extendidos Fig.9](#)

Derechos y permisos

[Reimpresiones y permisos](#)

Acerca de este artículo

Citar este artículo

Wang, EY, Mao, T., Klein, J. *et al.* Autoanticuerpos funcionales diversos en pacientes con COVID-19. *Nature* **595**, 283–288 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03631-y>

[Descargar cita](#)

- Recibió 04 diciembre 2020
- Aceptado 11 de mayo de 2021
- Publicado 19 de mayo de 2021
- Fecha de asunto 08 de julio de 2021
- DOI <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03631-y>