



Universidad
Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

El papel de las células asesinas naturales (NK) y sus mecanismos de citotoxicidad en los síndromes hiperinflamatorios

The role of natural killer (NK) cells and their cytotoxic mechanisms in hyperinflammatory syndromes

Autora

Cristina Flores Sánchez

Director/es

Julián Pardo Jimeno
Eva Gálvez Buerba

Facultad de Medicina. Curso 2024-2025

Índice

Índice	2
Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1 Definición y clasificación de los Síndromes Hiperinflamatorios (SHI)	6
1.2 Características clínicas de los SHI	7
1.3 Criterios diagnósticos actuales	8
1.4 Opciones terapéuticas	9
1.5 Papel de las células NK en los SHI	11
1.6 Biomarcadores inmunológicos	16
2. Hipótesis y objetivos	17
3. Metodología	19
3.1 Estrategia de búsqueda bibliográfica	19
3.1.1 Términos DeCS y MeSH	19
3.1.2 Estrategias de búsqueda y cribado	20
3.2 Criterios de inclusión y exclusión	20
3.3 Extracción y análisis de datos	21
3.4 Fenotipado de células NK mediante citometría de flujo	21
3.5 Síntesis y presentación de resultados	21
4. Resultados	22
4.1 Revisión bibliográfica	22
4.1.1 Hallazgos bibliográficos de la función citotóxica de las células NK en SHI	24
4.1.2 Resultados del fenotipado de células NK	27
4.2 Observación in situ del protocolo de citometría de flujo en CIBA	28
4.2.1 Principios de la citometría de flujo	29
4.2.2 Concepto de gating	29
4.2.3 Marcadores funcionales evaluados	30
4.2.4 Control de calidad y análisis de datos	30
4.2.5 Estrategia de gating	31

5. Discusión.....	32
5.1 Interpretación integrada de los hallazgos	32
5.2 Implicaciones diagnósticas y terapéuticas	33
5.3 Limitaciones del conocimiento actual.....	34
5.4 Perspectivas futuras y líneas de investigación	34
6. Conclusiones.....	36
7. Limitaciones.....	37
8. Anexos	38
8.1 Anexo 1: Glosario de abreviaturas	38
8.1.1 Enfermedades y síndromes.....	38
8.1.2 Organismos y definiciones oficiales	38
8.1.3 Genética y biología celular.....	38
8.1.4 Células y receptores.....	38
8.1.5 Citocinas y biomarcadores.....	39
8.1.6 Técnicas, parámetros estadísticos y otros	39
8.2 Anexo 2: Glosario de fármacos.....	41
8.3 Anexo 3: Relación entre IL-6, IL-18 y INF- γ	42
9. Agradecimientos.....	43
10. Bibliografía.....	44

Resumen

Introducción: Los síndromes hiperinflamatorios (SHI) —linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH), síndrome de activación macrofágica (MAS), síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C) y enfermedad de Kawasaki (EK)— comparten fiebre persistente, disfunción multiorgánica y concentraciones notablemente elevadas de biomarcadores como ferritina, IL-6 e IL-18, dímero-D y triglicéridos, así como hipofibrinogenemia. Las células asesinas naturales (natural killer -NK-) regulan la homeostasis inflamatoria mediante citotoxicidad mediada por perforina y secreción de citocinas.

Objetivo: Analizar sistemáticamente la evidencia sobre la disfunción y el fenotipo de las células NK en los síndromes hiperinflamatorios (MIS-C, HLH, MAS, EK), describir el protocolo estandarizado de citometría de flujo (incluyendo *gating* y ensayo CD107a) y evaluar su capacidad para estratificar riesgo, correlacionar con biomarcadores inflamatorios (ferritina, IL-18, dímero-D) y guiar terapias dirigidas.

Metodología: Revisión narrativa de artículos indexados en PubMed, Scopus y Web of Science (2010-2025) combinada con una descripción estandarizada del protocolo de citometría de flujo para cuantificar perforina, degranulación y receptores de agotamiento (PD-1, LAG-3).

Resultados: Los estudios muestran un gradiente funcional de las NK que se correlaciona con la gravedad clínica: actividad < 10 % en HLH primaria, 10-30 % en HLH secundaria/MAS, alrededor del 60 % en MIS-C y valores normales (> 70 %) en EK. Actividades < 20 % se asocian a ferritina ≥ 10.000 ng/mL, mayor mortalidad y necesidad de terapias de segunda línea. El *gating* jerárquico (viabilidad → singletes → linfocitos → CD3⁺ CD56⁺) es crítico para aislar una población NK pura y reducir el ruido analítico.

Conclusiones: La evaluación funcional de las NK, especialmente la prueba de degranulación CD107a, aporta valor pronóstico y terapéutico en los SHI. Integrar estas pruebas en los algoritmos diagnósticos y estandarizar los protocolos de citometría de flujo debe considerarse una prioridad asistencial.

Abstract

Background: Hyperinflammatory syndromes (HIS)—hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH), macrophage activation syndrome (MAS), multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C), and Kawasaki disease (KD)—share persistent fever, multiorgan dysfunction, and markedly elevated levels of biomarkers such as ferritin, IL-6 and IL-18, D-dimer, and triglycerides, as well as hypofibrinogenemia. Natural killer (NK) cells regulate inflammatory homeostasis through perforin-mediated cytotoxicity and cytokine secretion.

Objective: Systematically analyze the evidence on NK cells dysfunction and phenotype in hyperinflammatory syndromes (MIS-C, HLH, MAS, KD), describe the standardized flow-cytometry protocol (including gating and the CD107a assay), and evaluate its ability to stratify risk, correlate with inflammatory biomarkers (ferritin, IL-18, D-dimer), and guide targeted therapies.

Methods: A narrative review of articles indexed in PubMed, Scopus and Web of Science (2010–2025), combined with a standardized description of the flow cytometry protocol used to quantify perforin, degranulation and exhaustion receptors (PD-1, LAG-3).

Results: Studies demonstrate a functional gradient of NK cells activity that correlates with clinical severity: < 10 % in primary HLH, 10–30 % in secondary HLH/MAS, approximately 60 % in MIS-C and normal values (> 70 %) in KD. NK activity below 20 % is associated with ferritin $\geq 10\,000$ ng/mL, increased mortality and the need for second-line therapies. A hierarchical gating strategy (viability \rightarrow singlets \rightarrow lymphocytes \rightarrow CD3⁺ CD56⁺) is critical to isolate a pure NK-cell population and minimize analytical noise.

Conclusions: Functional assessment of NK cells—especially the CD107a degranulation assay—provides both prognostic and therapeutic insight in HIS. Integrating these assays into diagnostic algorithms and standardizing flow cytometry protocols should be regarded as a clinical priority.

1. Introducción

1.1 Definición y clasificación de los Síndromes Hiperinflamatorios (SHI)

Los SHI constituyen un espectro clínico-biológico que abarca desde formas monogénicas de inicio neonatal hasta cuadros adquiridos del adulto desencadenados por infecciones, neoplasias o inmunoterapia. Su rasgo común es una respuesta inmunitaria descontrolada mediada por citocinas proinflamatorias que conduce a fiebre persistente, disfunción multiorgánica, citopenias y mortalidad elevada. Aunque comparten rasgos clínico-analíticos, difieren en su etiopatogenia y población diana, por lo que conviene definirlos y clasificarlos con claridad. (1)

El síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (MIS-C) se describió en 2020 como una complicación post-infecciosa de la COVID-19. La definición de vigilancia del Council of State and Territorial Epidemiologists (CSTE) y los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de EE. UU. (2023) exige fiebre, hospitalización, proteína C-reactiva ≥ 3 mg/dL, ausencia de diagnóstico alternativo y afectación de al menos dos sistemas orgánicos; el *shock* se cuenta como sistema independiente. (2)

Molloy y colaboradores plantean que MIS-C y su forma neonatal (MIS-N) se sitúan en un continuo inflamatorio cuyo extremo tradicional sería la enfermedad de Kawasaki (EK). (3)

La linfohistiocitosis hemofagocítica (Hemophagocytic Lymphohistiocytosis, HLH) es un SHI grave. Se clasifica en forma primaria (familiar), ligada a mutaciones en la vía perforina-granzima, y forma secundaria (reactiva), desencadenada por infecciones, neoplasias o autoinmunidad. Los criterios HLH-2004 permiten el diagnóstico con una mutación patogénica o con ≥ 5 de 8 parámetros clínico-analíticos. (4)

El síndrome de activación macrofágica (Macrophage Activation Syndrome, MAS) se considera la variante reumatológica de la HLH secundaria y suele aparecer en el contexto de artritis idiopática juvenil sistémica (AIJs), lupus eritematoso sistémico o EK. MAS y HLH comparten susceptibilidad genética y mecanismos centrados en la disfunción citotóxica de linfocitos T y células “natural killer” (NK). (5)

La EK es una vasculitis sistémica autolimitada que afecta principalmente a menores de cinco años y constituye la primera causa de cardiopatía adquirida en la infancia. El cuadro clásico requiere

fiebre ≥ 5 días y cuatro de los cinco criterios clínicos principales; las formas incompletas se diagnostican con menos criterios asociados a reactantes de fase aguda elevados o alteraciones coronarias. (6)

Un denominador común en estos síndromes es la pérdida de la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8⁺ y células NK. Su disfunción favorece la sobreproducción de interferón- γ (IFN- γ) y otras citocinas proinflamatorias. En la HLH primaria se documenta ausencia de perforina o fallo de desgranulación (CD107a), mientras que en la HLH del adulto las NK aparecen hiperactivadas pero exhaustas. (7)

1.2 Características clínicas de los SHI

Los SHI comparten fiebre elevada sostenida, incremento de reactantes de fase aguda y rápida progresión a disfunción multiorgánica si no se instaura tratamiento inmunomodulador precoz. Sin embargo, la distribución etaria, el patrón de afectación orgánica predominante y el contexto clínico subyacente permiten diferenciarlos. (1)

El MIS-C suele presentarse 2–6 semanas después de la infección por SARS-CoV-2 con fiebre alta, dolor abdominal, vómitos, diarrea y exantema maculopapular.(5) Son frecuentes la conjuntivitis no purulenta y la lengua aframbuesada; la afectación cardiovascular (miocarditis, disfunción ventricular izquierda y *shock* distributivo) obliga a soporte vasoactivo en aproximadamente la mitad de los casos. (8)Analíticamente destacan linfopenia, trombocitopenia relativa y ferritina > 500 ng/mL. (3,9)

La HLH primaria debuta en lactantes con fiebre continua, hepatoesplenomegalia y citopenias; la hiperferritinemia extrema (> 10.000 ng/mL) y la hipertrigliceridemia son hallazgos característicos. En las formas secundarias del adolescente o adulto la clínica puede ser más insidiosa e incluir ictericia colestásica, coagulopatía y afectación del sistema nervioso central. (9,10)

El MAS cursa como una crisis hiperinflamatoria sobre patología reumatológica de base. La señal de alarma es el deterioro brusco con fiebre refractaria a antitérmicos, caída súbita de plaquetas y fibrinógeno y ferritina que supera 5.000 ng/mL en menos de 24 h. (5)

La EK se caracteriza por fiebre prolongada, exantema polimorfo, conjuntivitis bilateral, cambios orofaríngeos, edema de extremidades y adenopatía cervical. La afectación cardíaca inicial se manifiesta como dilatación coronaria transitoria, mientras que los aneurismas gigantes se

desarrollan en un 3-5 % de los casos si no se administra inmunoglobulina intravenosa (IVIG) antes del décimo día de fiebre. La guía de la American Heart Association (AHA) de 2017 respalda esta estrategia. (6)

En conjunto, aunque la presentación clínica se solapa, la distribución de la afectación orgánica (cardíaca en MIS-C, hematológica-hepatoesplénica en HLH/MAS y vascular en EK) constituye la clave para orientar el diagnóstico diferencial precoz. (1)

En la Tabla 1 se sintetizan los principales mecanismos fisiopatológicos asociados a cada SHI, destacando el papel de la disfunción de las células NK y T citotóxicas.

Tabla 1: Fisiopatología de los SHI

Enfermedad	Fisiopatología
HLH	Defecto en la citotoxicidad de células NK y CTL (mutaciones en PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2, RAB27A) → incapacidad para eliminar células infectadas o activadas → activación excesiva de macrófagos y linfocitos T → liberación descontrolada de citocinas y hemofagocitosis. (6)
MAS	Forma reactiva de HLH en enfermedades reumatológicas, mediada por IL-6 e IL-18 → depresión transitoria de células NK → sobreestimulación de macrófagos → tormenta de citocinas. (11)
MIS-C	Posterior a SARS-CoV-2, activación policlonal de linfocitos T y producción masiva de citocinas (IL-6, IL-18, TNF-α) → daño endotelial y disfunción multiorgánica; células NK relativamente conservadas con fenotipo de agotamiento en casos graves. (5)
EK	Posterior a SARS-CoV-2, activación policlonal de linfocitos T y producción masiva de citocinas (IL-6, IL-18, TNF-α) → daño endotelial y disfunción multiorgánica; células NK relativamente conservadas con fenotipo de agotamiento en casos graves. (8)

Fuente: Elaboración propia

1.3 Criterios diagnósticos actuales

El diagnóstico precoz de los SHI es esencial para iniciar el tratamiento inmunomodulador y prevenir la disfunción multiorgánica. A continuación, se resumen los criterios vigentes para el MIS-C, la HLH, el MAS y la EK, junto con las pruebas recomendadas para evaluar la citotoxicidad de las células NK. (1)

En la Tabla 2 se recopilan los criterios diagnósticos actuales para cada SHI, según los consensos internacionales HLH-2004, PRINTO/EULAR/ACR, CSTE/CDC y AHA.

Tabla 2: Criterios diagnósticos actuales

Enfermedad	Criterios diagnósticos
HLH	HLH-2004: mutación patogénica o $\geq 5/8$ de: fiebre $\geq 38,5$ °C; esplenomegalia; citopenias ≥ 2 series (Hb < 90 g/L, plaquetas $< 100 \times 10^9$ /L, neutrófilos $< 1 \times 10^9$ /L); triglicéridos ≥ 265 mg/dL y/o fibrinógeno ≤ 150 mg/dL; ferritina ≥ 500 ng/mL; hemofagocitosis; actividad NK disminuida/ausente; sCD25 ≥ 2400 U/mL. Adultos: HScore ≥ 169 (≥ 80 % probabilidad). (9,12)
MAS	PRINTO/EULAR/ACR 2016 (SJIA): ferritina ≥ 684 ng/mL + ≥ 2 de: plaquetas $\leq 181 \times 10^9$ /L; AST > 48 U/L; triglicéridos > 156 mg/dL; fibrinógeno ≤ 360 mg/dL. En LES y otras collagenosis: aplicar HLH-2004 o clasificación MAS-SL (pendiente de validación externa). (5,13)
MIS-C	CSTE/CDC 2023 (AAP 2024): fiebre; hospitalización; PCR ≥ 3 mg/dL; ausencia de otro diagnóstico; afectación ≥ 2 sistemas orgánicos (shock cuenta como sistema independiente); evidencia de infección por SARS-CoV-2 en 60 días previos. OMS: PCR ≥ 5 mg/L y no exige ingreso, aumentando sensibilidad a costa de especificidad.(2,14)
EK	AHA 2017 ("completa"): fiebre ≥ 5 días + $\geq 4/5$ criterios clásicos (conjuntivitis bilateral, alteraciones mucocutáneas, ganglios cervicales, cambios en extremidades, exantema). "Incompleta": fiebre ≥ 5 días + 2-3 criterios + VSG ≥ 40 mm/h o PCR ≥ 3 mg/dL. Ecocardiografía < 24 h para dilatación/aneurismas coronarios (Z-score > 2). (6)

Fuente: Elaboración propia

Para evaluar la función de las células NK se emplea un fenotipado por citometría de flujo que integra cuantificación de perforina, SAP y XIAP, medición de CD107a tras estimulación y ensayos de liberación de cromo-51 (o fluorocromo equivalente); una actividad por debajo del 10 % respecto al control sano o la ausencia de perforina respaldan el diagnóstico de HLH primaria.(10,15)

La aplicación rigurosa de estos criterios, combinada con la monitorización dinámica de biomarcadores (ferritina, dímero-D, IL-18) y la evaluación funcional de las células NK, permite discriminar entidades que comparten manifestaciones clínicas, pero requieren estrategias terapéuticas diferenciadas. (5,9)

1.4 Opciones terapéuticas

El tratamiento de los SHI persigue frenar la cascada de citocinas, limitar la destrucción tisular y prevenir secuelas orgánicas. La estrategia difiere según la entidad clínica, pero en todos los casos se recomienda iniciar inmunomodulación precoz tras confirmar los criterios diagnósticos expuestos en la sección 1.3. (1)

MIS-C: Primera línea: IVIG 2 g/kg en infusión única más metilprednisolona 1-2 mg/kg/día; en cuadros críticos se emplea pulsoterapia (10-30 mg/kg/día, máx. 1 g) durante 1-3 días. La AAP recomienda añadirse anticoagulación profiláctica con heparina de bajo peso molecular y ácido acetilsalicílico (AAS) 3-5 mg/kg/día cuando la PCR < 3 mg/dL. Casos refractarios responden a anakinra (2-10 mg/kg/día) o, alternativamente, infliximab/tocilizumab. (2,16)

HLH: El protocolo HLH-94/2004 (etopósido, dexametasona y ciclosporina A) continúa siendo el estándar de inducción; en afectación neurológica se añade metotrexato intratecal. El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos es curativo en HLH primaria. Agentes de rescate como emapalumab (anticuerpo anti-IFN- γ) o ruxolitinib (inhibidor JAK1/2) muestran tasas de respuesta > 60 % en series recientes. (3,9,17)

MAS: El pilar terapéutico es la metilprednisolona en tandas de 30 mg/kg/día (3 días) seguida de dosis descendentes. Si la respuesta es incompleta se añade ciclosporina A (3-5 mg/kg/día) o anakinra. Estudios piloto con ruxolitinib evidencian descensos rápidos de ferritina e IL-18, mientras que tocilizumab se reserva para fenotipos dominados por IL-6. (5,8)

EK: La administración de IVIG 2 g/kg en los primeros 10 días de fiebre reduce la incidencia de aneurismas coronarios al 3-5 %. Se asocia ASS: dosis antiinflamatoria (30-50 mg/kg/día) hasta 48 h afebril y luego dosis antiagregante (3-5 mg/kg/día) durante 6-8 semanas. Los casos de alto riesgo añaden prednisona 1-2 mg/kg/día; la resistencia a IVIG se maneja con infliximab o ciclos de anakinra. (6)

Terapias dirigidas a células NK: La restauración de la citotoxicidad es un campo emergente. El bloqueo PD-1/PD-L1 mejora la degranulación en modelos murinos de HLH, y la infusión de células NK alogénicas se evalúa como puente al trasplante. Estos abordajes permanecen en fase clínica temprana. (10,18)

En líneas generales, el manejo óptimo combina inmunomodulación específica según el síndrome, control estricto de las complicaciones infecciosas y, cuando procede, soporte vital avanzado. Ensayos en curso con inhibidores JAK, anticuerpos anti-IFN- γ y terapias celulares podrían redefinir el estándar terapéutico en la próxima década. (3,18)

1.5 Papel de las células NK en los SHI

Las células NK constituyen el componente citotóxico del sistema inmunitario innato y representan entre el 5 % y el 15 % de los linfocitos circulantes. Se dividen en dos subpoblaciones principales: NK CD56bright, especializadas en la producción de citocinas reguladoras, y NK CD56dim, responsables de la citotoxicidad mediada por gránulos. Su actividad depende del equilibrio entre receptores activadores (NKG2D, NKp30, NKp46) e inhibidores (KIR, NKG2A) que reconocen el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) en las células diana. (19)

La citotoxicidad se ejerce tras el establecimiento de la sinapsis inmunológica y la exocitosis de gránulos que contienen perforina y granzimas. La perforina polimeriza en la membrana diana formando poros que facilitan la entrada de granzimas, las cuales inducen apoptosis por vía caspasa-dependiente. La degranulación puede evaluarse experimentalmente mediante la externalización de una proteína de membrana (CD107a) presente en los lisosomas y los gránulos a membrana. (10,19)

Además de eliminar células infectadas o tumorales, las células NK secretan interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), claves para dirigir la respuesta de macrófagos y linfocitos T. En condiciones fisiológicas actúan como “guardianes” que suprimen el exceso de inflamación; su alteración funcional precipita una tormenta de citocinas autoinflamatoria. (19)

En la Figura 1 se ilustran de forma esquemática los mecanismos de citotoxicidad normal frente a la disfunción observada en HLH/MAS. (20)

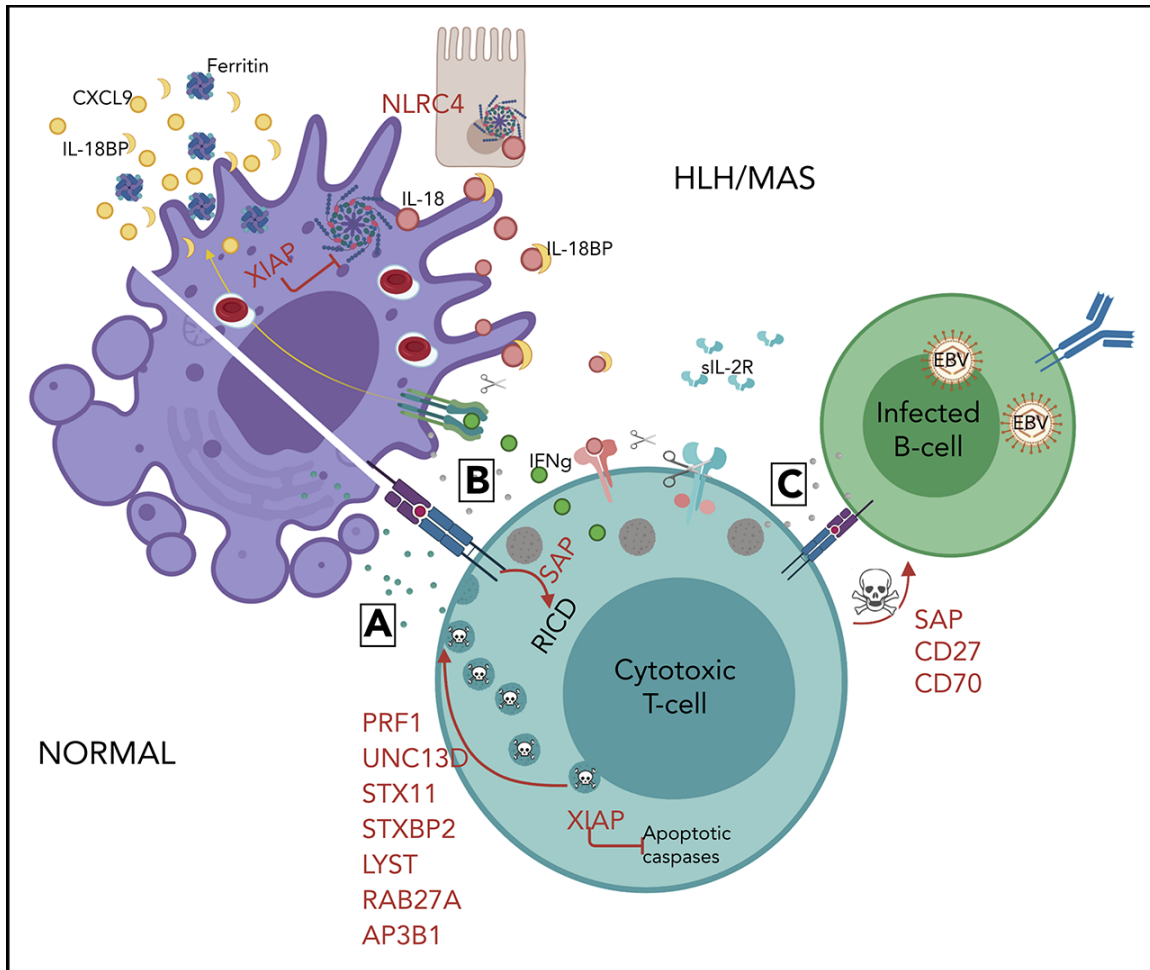


Figura 1: Mecanismos de citotoxicidad normal frente a disfunción en HLH/MAS. Tomada de Canna et al.(20) En condiciones fisiológicas (panel inferior), las células citotóxicas (células NK y CTL) reconocen y contactan a la célula diana mediante sinapsis inmunológica, liberan gránulos citotóxicos que contienen perforina (PRF1) y granzimas a través de exocitosis regulada (genes UNC13D, STX11, STXBP2, LYST, RAB27A, AP3B1;) y activan la cascada de caspasas para desencadenar apoptosis. Moléculas coestimuladoras como SAP, CD27 y CD70 estabilizan la sinapsis con células B infectadas por EBV. XIAP modula la activación de caspasas evitando apoptosis inapropiada. En HLH/MAS (panel superior), mutaciones o defectos en alguno de estos pasos impiden la eliminación eficaz de células diana, provocan persistencia viral o antigénica y desencadenan activación excesiva de macrófagos. Estos liberan IL-18, ferritina y quimiocinas (p. ej. CXCL9), amplificando la respuesta inflamatoria y produciendo la tormenta de citocinas característica. Las áreas bloqueadas (barras rojas) y los iconos de “muerte fallida” ilustran los puntos críticos de disfunción citotóxica que subyacen a la fisiopatología de HLH/MAS. Perforina (intracelular): proteína formadora de poros esencial para la citotoxicidad; su ausencia indica defectos congénitos (p. ej., mutaciones PRF1).

La HLH familiar ilustra la relevancia de la citotoxicidad de las células NK. Mutaciones bialélicas en PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2 o RAB27A interrumpen la síntesis, el empaquetamiento o la exocitosis de gránulos líticos. Los pacientes suelen presentar los primeros síntomas durante los primeros meses de vida, manifestando fiebre, esplenomegalia y ferritina > 10.000 ng/mL; sin tratamiento, la letalidad supera el 95 %. Modelos murinos UNC13D^{-/-} muestran que la depleción de IFN-γ rescata la enfermedad. Dichos modelos corresponden a ratones modificados

genéticamente que carecen del gen UNC13D, imprescindible para la exocitosis de gránulos líticos en células NK y linfocitos T CD8⁺. Por ello, tras una infección viral leve desarrollan un cuadro que reproduce la HLH humana: fiebre, pancitopenia, esplenomegalia, ferritina elevada y tormenta de citocinas. Un fenotipo similar se observa en los ratones deficientes en perforina infectados con virus. (12)

En estos modelos, la citocina proinflamatoria clave es el IFN- γ . La incapacidad citotóxica hace que los linfocitos y las células NK produzcan cantidades descontroladas de IFN- γ , lo que alimenta la activación de macrófagos y la respuesta inflamatoria sistémica, confirmando la cascada patogénica células NK \rightarrow IFN- γ \rightarrow macrófagos. (4,9,21)

En la HLH secundaria del adolescente o el adulto y en el MAS la citotoxicidad NK está disminuida pero no abolida. Estudios de citometría han revelado un fenotipo “hiperactivado y exhausto”: expresión de CD69, HLA-DR y FasL junto con sobreexpresión de marcadores de agotamiento PD-1, LAG-3 y TIGIT y caída de la capacidad de degranular. (22)

El MIS-C se caracteriza por linfopenia profunda que afecta a linfocitos T y a células NK. La actividad perforina/granzima suele conservarse o disminuir levemente, lo que sugiere que la tormenta de citocinas se debe más a la activación policlonal de linfocitos T que a la pérdida completa de la función de las células NK. No obstante, algunos trabajos han descrito una subpoblación de células NK con patrón de agotamiento similar al de la HLH, lo que podría explicar los casos más graves. (2,16)

En la EK los recuentos absolutos de células NK se mantienen relativamente normales, pero la proporción de células NK CD56bright/CD56dim aumenta y predomina la secreción de IL-10 y TNF- α . Se ha postulado que los desequilibrios entre células NK reguladoras y linfocitos T helper 17 modulan el riesgo de aneurismas coronarios. (23)

La medición de la degranulación CD107a, la expresión de perforina y la actividad cromo-51 constituyen biomarcadores funcionales validados. Valores de activación < 10 % del control sano se correlacionan con mortalidad en HLH. Niveles séricos de granzima B e IL-18 actúan como marcadores de hiperinflamación y se utilizan para monitorizar la respuesta a ruxolitinib y emapalumab. (10,15)

Corregir la disfunción de las células NK es una estrategia terapéutica en expansión:

- Neutralización de IFN- γ con emapalumab, aprobada por la FDA para HLH refractaria. (3)
- Inhibidores JAK (ruxolitinib, baricitinib) que bloquean la señalización de citocinas y restauran parcialmente la citotoxicidad. (3,8)
- Bloqueo PD-1/PD-L1 para revertir el estado de agotamiento de las células NK descrito en HLH del adulto. (18)
- Infusión de células NK alogénicas seleccionadas o modificadas para potenciar la degranulación; ensayos fase I/Fase II en curso. (24)

En definitiva, los datos experimentales y clínicos posicionan a las células NK como moduladores esenciales de la inmunidad adaptativa e innata. Su pérdida funcional absoluta, parcial o su agotamiento fenotípico condicionan la gravedad de los SHI. El reconocimiento temprano de estas alteraciones permite personalizar la inmunomodulación y abre la puerta a terapias dirigidas que restauren la vigilancia inmunológica sin comprometer la defensa antiviral. (19)

En la Figura 2 se muestran de forma esquemática los principales receptores activadores e inhibidores en la sinapsis NK - célula diana, así como los mecanismos de liberación de gránulos y la vía Fas-FasL que conducen a la apoptosis de la célula objetivo.

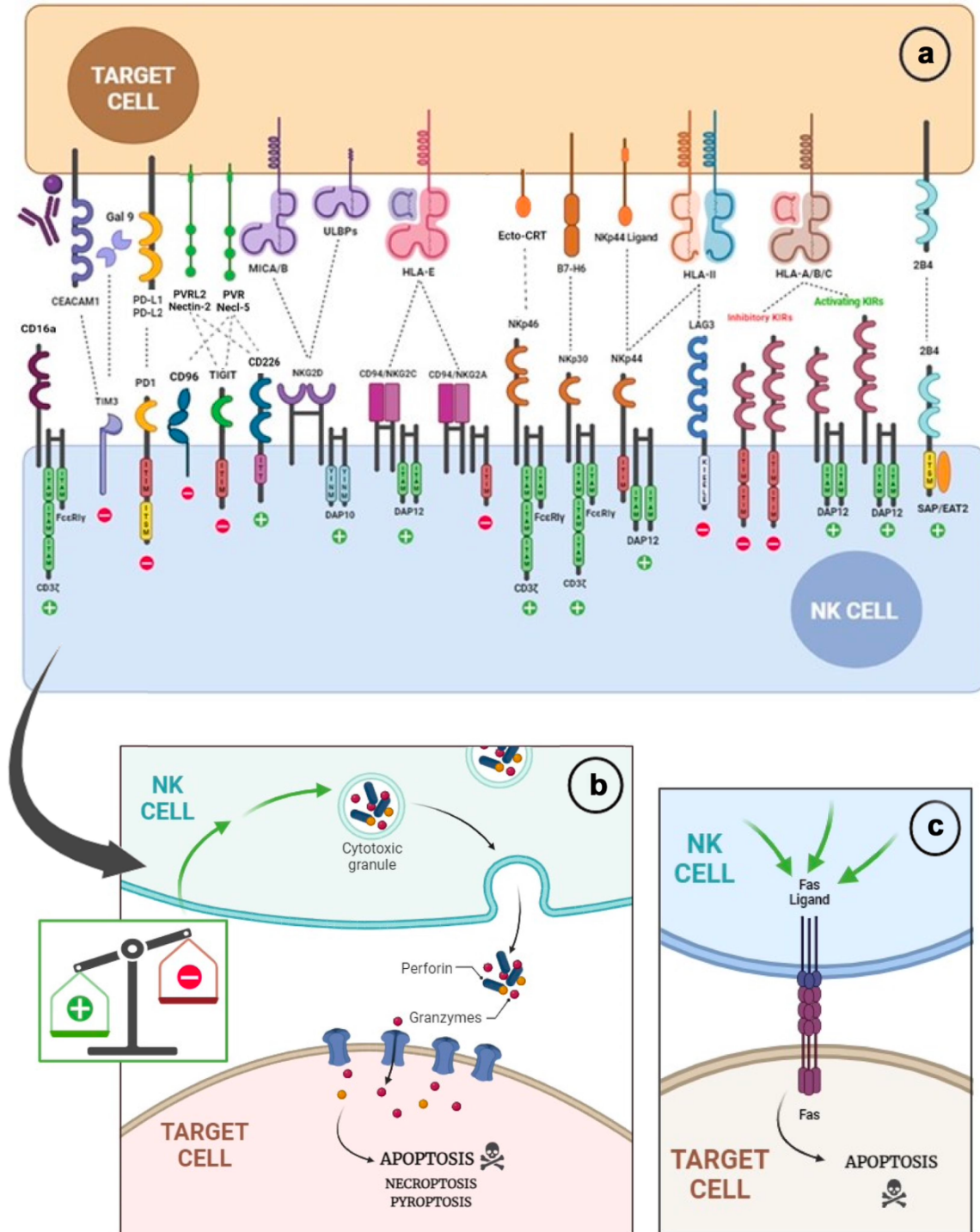


Figura 2: Citotoxicidad mediada por células NK. Tomada de Pesini C et al (25): Las células NK expresan varios receptores en su superficie que regulan positiva o negativamente su actividad (A). Las células NK poseen dos mecanismos principales para inducir la muerte celular diana: la exocitosis granular (B) y la expresión de receptores de muerte (C). Figura creada con BioRender.com

1.6 Biomarcadores inmunológicos

Se utilizan varios biomarcadores sanguíneos para diagnosticar y monitorizar los SHI. Se clasifican en pruebas de función citotóxica, citocinas inflamatorias y proteínas de fase aguda. En la Tabla 3 se resumen los biomarcadores funcionales de las células NK, sus umbrales diagnósticos y las situaciones clínicas en las que resultan más informativos.

Tabla 3: Biomarcadores inmunológicos

<i>Biomarcador</i>	<i>Punto de corte</i>	<i>¿Qué indica?</i>	<i>Situaciones clave</i>
Perforina intracelular	< 10 % células positivas	Defecto genético o inhibición grave	HLH primaria (7,10)
Desgranulación CD107a	< 10 % NK con CD107a	Capacidad real de liberar gránulos	HLH familiar y MAS (5)
sFasL	> 6 ng/mL	Apoptosis linfocítica masiva	Distingue HLH de sepsis (26)
Granzima B sérica	> 250 pg/mL	Citolisis desregulada	Predice mortalidad en HLH secundaria (27)
CXCL9	> 5.000 pg/mL	Actividad del eje IFN- γ	Progresión a MAS (15)
IL-18 libre	> 24.000 pg/mL	Activación de inflammasoma	MAS y MIS-C graves (15)
sCD25	> 10.000 U/mL	Proliferación sostenida T	Citopenias y ferritina alta (12)
β_2-microglobulina	> 3,5 mg/L	Activación inmunitaria	Complementa a sCD25 (13)

Fuente: *Elaboración propia*

La combinación de estos biomarcadores en paneles *multiplex* está en evaluación para estratificar riesgo y monitorizar la respuesta a terapias anti-citocinas y potenciadoras de células NK.

2. Hipótesis y objetivos

La evidencia sugiere que la disfunción de las células NK constituyen un factor clave en la génesis y la gravedad de los SHI. La pérdida de citotoxicidad permite la persistencia de macrófagos activados y la liberación sostenida de citocinas proinflamatorias, lo que explicaría la superposición clínica entre el MIS-C, la HLH, el MAS y la EK. (1,19)

Un fenotipado exhaustivo de las células NK, combinado con el análisis sistemático de la literatura, podría identificar patrones inmunológicos diferenciales y guiar la selección de terapias dirigidas.(18)

Hipótesis central: la severidad clínica de los SHI se correlaciona con el grado de alteración funcional y fenotípica de las células NK; la cuantificación de perforina/CD107a y la expresión de receptores de agotamiento (PD-1, LAG-3) permiten estratificar el riesgo y predecir la respuesta al tratamiento.

Objetivo general: caracterizar, a partir de la evidencia publicada, el perfil funcional de las células NK en los principales SHI y correlacionarlo con sus manifestaciones clínicas y analíticas descritas en la literatura.

Objetivo específico 1: Revisión clínica y analítica: Describir los hallazgos analíticos y clínicos más frecuentes de MIS-C, HLH, MAS y EK a partir de la revisión sistemática de los artículos seleccionados.

Objetivo específico 2: Describir la actividad de degranulación CD107a y la expresión de perforina en las células NK de los estudios revisados, comparando sus niveles cualitativos entre los distintos síndromes.

Objetivo específico 3: Evaluar la relación entre la disfunción de las células NK y la elevación de marcadores inflamatorios (ferritina, IL-18, dímero-D).

Objetivo específico 4: Evaluar la evidencia disponible sobre la asociación entre la presencia de receptores inhibidores (PD-1, LAG-3, TIGIT) en las células NK que se asocian al agotamiento de estas y la refractariedad o respuesta subóptima al tratamiento inmunomodulador.

Objetivo específico 5: Analizar las poblaciones linfoides mediante citometria de flujo en un modelo de ratón de HLH primaria

3. Metodología

3.1 Estrategia de búsqueda bibliográfica

Se efectuó una revisión sistemática sobre los SHI y las células NK. Las bases de datos consultadas fueron PubMed/MEDLINE, Scopus y Web of Science. Se combinaron términos MeSH y libres: "hemophagocytic lymphohistiocytosis", "macrophage activation syndrome", "multisystem inflammatory syndrome in children", "Kawasaki disease", "natural killer cells", "perforin", "CD107a", "degranulation" y "IFN-gamma". Se aplicaron filtros para cumplir con los criterios de inclusión descritos en el apartado 3.2.

3.1.1 Términos DeCS y MeSH

Para realizar la presente revisión bibliográfica, se han introducido varias estrategias de búsqueda avanzada en las bases de datos PubMed, Web of Science y Scopus. Estas se han basado en las principales palabras clave expuestas en la tabla 2 en forma de términos DeCS y MeSH combinadas mediante operadores booleanos AND/OR.

En la Tabla 4 se presentan los términos DeCS y sus equivalentes MeSH empleados en la estrategia de búsqueda bibliográfica.

Tabla 4: Términos DeCS y MeSH

<i>DeCS</i>	<i>MeSH</i>
Linfohistiocitosis hemofagocítica	Hemophagocytic Lymphohistiocytosis
Síndrome de activación de macrófagos	Macrophage Activation Syndrome
MIS-C	Multisystem Inflammatory Syndrome in Children
Células asesinas naturales	Natural Killer Cells
Perforina	Perforin
Granzimas	Granzyme A; Granzyme B
IL-15 súperagonista	Interleukin-15 Superagonist
Anticuerpos biespecíficos	Antibodies, Bispecific
Tormenta de citocinas	Cytokine Storm

Fuente: Elaboración propia

3.1.2 Estrategias de búsqueda y cribado

En la tabla 3 se presentan las estrategias de búsqueda utilizadas, así como el número de resultados obtenidos en función de los filtros aplicados.

Ejemplo PubMed: ("Hemophagocytic Lymphohistiocytosis"[MeSH] OR "Macrophage Activation Syndrome"[MeSH]) AND "Natural Killer Cells"[MeSH] AND ("2014/01/01"[dp] : "2025/04/30"[dp]).

En la Tabla 5 se detallan las estrategias de búsqueda empleadas junto con el número de resultados obtenidos antes y después de aplicar los filtros.

Tabla 5: Estrategia de búsqueda

<i>Estrategia</i>	<i>Resultados brutos</i>	<i>Tras filtros*</i>
NK CELLS AND HLH/MAS	1286	192
(IL-15SA OR BiKE/TRiKE) AND (Cytokine Storm OR MIS-C)	847	64
(Granzyme A OR Granzyme B) AND HLH	154	18

Fuente: Elaboración propia

3.2 Criterios de inclusión y exclusión

Los filtros aplicados limitaron la búsqueda a artículos en inglés o español publicados entre enero de 2010 y abril de 2025. Se incluyeron trabajos de investigación (observacionales, ensayos clínicos y preclínicos) así como revisiones sistemáticas que describieran manifestaciones clínicas o analíticas de MIS-C, HLH, MAS o EK; aportasen datos de inmunofenotipado o función de las células NK (citotoxicidad, CD107a, perforina, receptores de agotamiento) o evaluaran intervenciones dirigidas a controlar la respuesta hiperinflamatoria (corticoides, IVIG, inhibidores JAK, anti-IFN- γ , etc.). Dado que la literatura pediátrica específica sobre citotoxicidad de las células NK es limitada, se incluyeron también estudios en población adulta y en modelos animales siempre que proporcionaran datos sobre los mecanismos patogénicos o comparativos aplicables a los SHI humanos.

Se excluyeron editoriales, cartas sin datos originales, resúmenes de congreso, comentarios de opinión y series de menos de tres casos que no añadieran información funcional relevante. Asimismo, se descartaron los artículos cuyo texto completo no estuviera disponible o carecieran de datos suficientes para extraer las variables de interés.

3.3 Extracción y análisis de datos

Los 27 documentos incluidos (19 estudios clínicos, 5 trabajos preclínicos en modelos murinos y 3 ensayos clínicos publicados o en registro) fueron revisados por la autora. Cuando la publicación lo permitía, se recogieron el diseño del estudio, el tamaño muestral (o número de animales), los criterios diagnósticos aplicados, los biomarcadores relacionados con la función de las células NK (citotoxicidad CD107a, perforina, granzima B, expresión de PD-1, LAG-3 o TIGIT) y los desenlaces clínicos relevantes; la información ausente se consignó como “no disponible”. La recopilación de datos fue llevada a cabo directamente por la autora. Para cada uno de los 27 artículos se revisaron íntegramente los apartados de métodos y resultados. No se contó con un segundo revisor independiente; en los casos en que surgieron dudas sobre la interpretación de los datos, se llevó a cabo una discusión detallada con el tutor académico para asegurar la coherencia y fiabilidad de la información recogida.

3.4 Fenotipado de células NK mediante citometría de flujo

Para contextualizar la revisión, la autora asistió presencialmente al Centro de Investigación Biomédica de Aragón, Zaragoza (CIBA), y observó el procesamiento de las poblaciones celulares mieloide y linfóide de bazo murino y su análisis, la estrategia de *gating* para fenotipado de células NK (ver resultados). Esta visita permitió verificar marcadores clave (CD107a, perforina, PD-1, LAG-3, TIGIT) y los estándares de control de calidad empleados. Observación del protocolo citométrico (CIBA, Zaragoza)

3.5 Síntesis y presentación de resultados

Los valores cuantitativos de biomarcadores (ferritina, IL-18, actividad de células NK, etc.) se recopilaron tal como aparecían en los estudios revisados y se presentaron de forma descriptiva (mediana (IQR) o media \pm DE cuando el artículo la proporcionaba) sin aplicar pruebas de significación propias. Las comparaciones entre síndromes se expresan de manera cualitativa, apoyadas en los intervalos o en las tendencias reportadas por los autores originales.

4. Resultados

4.1 Revisión bibliográfica

La revisión incluyó 27 publicaciones: 19 estudios clínicos, 5 trabajos preclínicos en modelos murinos y 3 ensayos clínicos. Para complementar la síntesis bibliográfica, el autor realizó una estancia presencial en el CIBA donde observó el procesamiento de muestras murinas y la adquisición citométrica de las células NK siguiendo los protocolos reales. Además, se consultaron artículos de referencia más antiguos para fundamentar las descripciones de los principios del ensayo de degranulación CD107a y la estrategia de gating.

En la Tabla 6 se recoge el listado completo de las 35 referencias utilizadas en la revisión, incluyendo autor(es), título, fuente y año de publicación.

Tabla 6: Referencias bibliográficas

Nº	Autor(es)	Título	Revista	Año
1	Aubert A,Jung K,Hiroyasu S,Pardo J,Granville DJ.	Granzyme serine proteases in inflammation and rheumatic diseases.	Nat Rev Rheumatol.	2024
2	Carvelli J,Group on behalf of the H2007S,Piperoglou C,Group on behalf of the H2007S,Farnarier C,et al.	Functional and genetic testing in adults with HLH reveals an inflammatory profile rather than a cytotoxicity defect.	Blood.	2020
3	Molloy EJ,Nakra N,Gale C,Dimitriadis VR,Lakshminrusimha S.	Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and neonates (MIS-N) associated with COVID-19: optimizing definition and management.	Pediatr Res.	2022
4	Dick JK,Sangala JA,Krishna VD,Khaimraj A,Hamel L,Erickson SM,et al.	NK Cell and Monocyte Dysfunction in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children.	J Immunol.	2024
5	Day-Lewis M,Berbert L,Baker A,Dionne A,Newburger JW,Son MBF.	Updated Case Definition of MIS-C and Implications for Clinical Care.	Pediatrics.	2024
6	Sullivan KE,Delaat CA,Douglas SD,Filipovich AH.	Defective Natural Killer Cell Function in Patients with Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and in First Degree Relatives.	Pediatr Res.	1998
7	Nichols KE,Hines MR.	NK cells: energized yet exhausted in adult HLH.	Blood.	2020
8	Noval Rivas M,Arditi M.	Kawasaki Disease and Multisystem Inflammatory Syndrome in Children: Common Inflammatory Pathways of Two Distinct Diseases.	Rheum Dis Clin North Am.	2023

9	Dick JK,Sangala JA,Krishna VD,Khaimraj A,Hamel L,Erickson SM,et al.	Dick JK,Sangala JA,Krishna VD,Khaimraj A,Hamel L,Erickson SM,et al. Antibody-mediated cellular responses are dysregulated in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C).	J Pediatr Infect Dis Soc.	2024
10	Hines MR,Nichols KE.	Go with the flow: perforin and CD107a in HLH.	Blood.	2017
11	Crayne CB,Albeituni S,Nichols KE,Cron RQ.	The Immunology of Macrophage Activation Syndrome.	Front Immunol.	2019
12	Konkol S,Killeen RB,Rai M.	Hemophagocytic Lymphohistiocytosis.	StatPearls.	2025
13	Sztajn bok F,Fonseca AR,Campos LR,Lino K,Rodrigues MCF,Silva RM,et al.	Hemophagocytic lymphohistiocytosis and macrophage activation syndrome: two rare sides of the same devastating coin.	Adv Rheumatol.	2024
14	Chinnici A,Beneforti L,Pegoraro F,Trambusti I,Tondo A,Favre C,et al.	Approaching hemophagocytic lymphohistiocytosis.	Front Immunol.	2023
15	Vandenhoute J,Wouters CH,Matthys P.	Natural Killer Cells in Systemic Autoinflammatory Diseases: A Focus on Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis and Macrophage Activation Syndrome.	Front Immunol.	2020
16	Gomez R,Maakaron J,Baiocchi R.	Macrophage Activation Syndrome Versus Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Diagnostic Dilemma in a Patient With Still's Disease and Epstein-Barr Virus Viremia.	J Hematol.	2019
17	Franco A,Tremoulet A,Burns JC.	More on Pre-Covid-19, SARS-CoV-2-Negative MIS-C.	N Engl J Med.	2024
18	Richardson KC,Jung K,Pardo J,Turner CT,Granville DJ.	Noncytotoxic Roles of Granzymes in Health and Disease.	Physiology (Bethesda).	2022
19	Senan-Salinas A,Comas L,Esteban P,Garzón-Tituaña M,Cheng Z,Santiago L,et al.	Selective Detection of Active Extracellular Granzyme A by Using a Novel Fluorescent Immunoprobe with Application to Inflammatory Diseases.	ACS Pharmacol Transl Sci.	2024
20	Webb BJ,Peltan ID,Jensen P,Hoda D,Hunter B,Silver A,et al.	Clinical criteria for COVID-19-associated hyperinflammatory syndrome: a cohort study.	Lancet Rheumatol.	2020
21	Sepulveda FE,Maschalidi S,Vosshenrich CAJ,Garrigue A,Kurowska M,Ménasché G,et al.	A novel immunoregulatory role for NK-cell cytotoxicity in protection from HLH-like immunopathology in mice.	Blood.	2015
22	Vivier E,Tomasello E,Baratin M,Walzer T,Ugolini S.	Functions of natural killer cells.	Nat Immunol.	2008
23	Popko K,Górska E.	The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases.	Cent Eur J Immunol.	2015
24	Pesini C,Artal L,Paúl Bernal J,Sánchez-Martínez D,Pardo J,Ramírez-Labrada A.	In-depth analysis of the interplay between oncogenic mutations and NK cell-mediated cancer surveillance in solid tumors.	Oncol Immunology.	2024
25	Hasegawa D,Kojima S,Tatsumi E,Hayakawa A,Kosaka Y,Nakamura H,et al.	Elevation of the Serum Fas Ligand in Patients With Hemophagocytic Syndrome and Diamond-Blackfan Anemia.	Blood.	1998

26	Mellor-Heineke S,Villanueva J,Jordan MB,Marsh R,Zhang K,Bleesing JJ,et al.	Elevated Granzyme B in Cytotoxic Lymphocytes is a Signature of Immune Activation in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis.	Front Immunol.	2013
27	Ramírez-Labrada A,Pesini C,Santiago L,Hidalgo S,Calvo-Pérez A,Oñate C,et al.	All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity.	Front Immunol.	2022
28	Shang K,Teng G,Zhang Y,Duan Y,Du C,Wang Y,et al.	Characterization of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Associated with Myeloid Neoplasms at Single-Cell Resolution.	Blood.	2024
29	Nedvetzki S,Sowinski S,Eagle RA,Harris J,RicVély F,Pende D,et al.	Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses.	Blood.	2007
30	Miller JS,Soignier Y,Panoskaltis-Mortari A,McNearney SA,Yun GH,Fautsch SK,et al.	Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer.	Blood.	2005
31	Elmas E,Saljoughian N,deSouzaFernandesPereira M,Tullius BP,Sorathia K,Nakkula RJ,et al.	CRISPR Gene Editing of Human Primary NK and T Cells for Cancer Immunotherapy.	Front Oncol.	2022
32	Topalian SL,Hodi FS,Brahmer JR,Gettinger SN,Smith DC,McDermott DF,et al.	Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer.	N Engl J Med.	2012
33	Brahmer JR,Tykowski SS,Chow LQM,Hwu WJ,Topalian SL,Hwu P,et al.	Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer.	N Engl J Med.	2012
34	Canna SW,Marsh RA.	Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis.	Blood.	2020
35	Murphy K,Weaver C,Janeway C.	Janeway's immunobiology.	Garland Science.	2017

Fuente: *Elaboración propia*

4.1.1 Hallazgos bibliográficos de la función citotóxica de las células NK en SHI

A continuación, se describen los principales hallazgos sobre la función de las células NK en cada SHI, destacando los parámetros de citotoxicidad y sus correlaciones clínicas.(7,14,27)

En la HLH primaria, los pacientes portadores de mutaciones bialélicas en genes de exocitosis (PRF1, UNC13D, STX11) presentan una actividad de las células NK prácticamente abolida. Estudios detallados muestran que la degranulación medida por CD107a o por liberación de cromo-51 permanece por debajo del 10 % respecto al control sano, mientras que la perforina intracelular es indetectable en mutaciones de PRF1 y detectable pero no funcional en otros defectos de exocitosis. Esta pérdida casi total de capacidad citotóxica se asocia con hiperferritinemia extrema

(mediana > 30.000 ng/mL), fallo hepático fulminante y mortalidad precoz si no se realiza trasplante de progenitores hematopoyéticos.(14,28)

En los casos de HLH secundaria, especialmente en poblaciones pediátricas post-infecciosas u oncohematológicas, la citotoxicidad residual oscila entre el 15 % y el 25 % de la actividad normal y se acompaña de una sobreexpresión de los receptores inhibidores PD-1 y LAG-3 en la subpoblación de células NK CD56^{dim}. Aquellos pacientes que mantienen más de un 20 % de actividad citotóxica presentan una reducción significativa en la necesidad de esquemas con etopósido y, en general, un mejor pronóstico clínico.(22)

En el contexto del MAS asociado a la AIJs, la degranulación de las células NK se reduce de forma transitoria hasta el 15–30 % de los valores de referencia y tiende a normalizarse tras tandas de corticoides o tratamiento con anakinra. Este descenso funcional coincide con picos de IL-18 por encima de 40 000 pg/mL y remite paulatinamente a medida que disminuyen dichos niveles, lo que respalda su utilidad tanto como marcador pronóstico como para monitorizar la respuesta terapéutica.(29)

En los informes multicéntricos sobre MIS-C se describe una linfopenia profunda de células NK (recuentos por debajo de 100 cél/ μ L) acompañada de una actividad de degranulación relativamente preservada (media de 60 ± 12 %). No obstante, aproximadamente un cuarto de los casos graves exhibe un fenotipo de agotamiento con alta expresión de PD-1 en las células NK, situación que se ha vinculado a disfunción ventricular izquierda y a mayor necesidad de soporte vasoactivo.(2,16,23)

Por último, en la EK la citotoxicidad de las células NK se mantiene por encima del 70 %, mientras que la proporción de la subpoblación de células NK CD56^{bright} aumenta, promoviendo un perfil antiinflamatorio mediado por IL-10. Una ratio de células NK CD56^{bright}/NK CD56^{dim} superior a 1 se ha asociado a una menor incidencia de aneurismas coronarios, lo que sugiere un papel regulador de estas células en la protección vascular.(23,27)

Al agrupar los datos de los 27 estudios incluidos, se vislumbra un espectro funcional de las células NK a lo largo de los distintos SHI. En la HLH primaria, los ensayos de degranulación por CD107a y de liberación de cromo-51 muestran una actividad inferior al 10 % en comparación con controles sanos.(14,28) En contraste, los pacientes con HLH secundaria o MAS asociado a JIAs sistémica mantienen una citotoxicidad residual del 15–30 % y un aumento concomitante de los receptores

inhibidores PD-1 y LAG-3.(22,29) En el MIS-C, a pesar de recuentos de células NK inferiores a 100 cél/μL, la degranulación se conserva en torno al 60 ± 12 % (2,17), mientras que en la EK la citotoxicidad supera el 70 % y la expansión de células NK CD56^{bright} correlaciona con menos aneurismas coronarios.(23,27)

Diversos autores han demostrado que niveles de degranulación por debajo del 30 % se asocian de forma consistente con hiperferritinemia (≥ 10.000 ng/mL), mayor necesidad de intensificar la inmunomodulación (con anakinra o ruxolitinib) y prolongación de la estancia en UCI. (5,23,29) Además, Molloy et al. evidenciaron que la aplicación sistemática del ensayo de CD107a permite identificar en menos de 24 horas a los fenotipos de alto riesgo y orientar de manera precisa la escalada terapéutica. (3) Por último, en otro estudio informaron que, en pacientes con MAS grave tratados con ruxolitinib, la restauración de la actividad de las células NK al 45–60 % se acompaña de normalización de los niveles de ferritina y resolución de las febrículas en 48 horas, reforzando el valor de estos inhibidores de JAK en futuros protocolos clínicos.(13)

En la Tabla 7 se describen las diferentes intervenciones o marcadores analizados, su impacto sobre la función de las células NK y las principales correlaciones clínicas observadas.

Tabla 7: Principales resultados

Elemento	Función NK	Correlación clínica
HLH primaria	Degranulación CD107a < 10 %	Hiperferritinemia extrema (>30.000 ng/mL), fallo hepático fulminante y mortalidad precoz sin trasplante(15,27)
HLH secundaria	Citotoxicidad residual 15–25 %	Actividad >20 % asocia menor necesidad de etopósido y mejor pronóstico global(28)
MAS	Degranulación transitoria 15–30 %	Picos de IL-18 >40.000 pg/mL; normalización con corticoides o anakinra(19)
MIS-C	Recuentos < 100 cél/μL; degranulación $\approx 60 \pm 12$ %	25 % con PD-1 alto: disfunción ventricular y necesidad de soporte vasoactivo(2,17,22)
EK	Citotoxicidad > 70 %; ↑ CD56 ^{bright}	Ratio NKCD56 ^{bright} /NKCD56 ^{dim} >1 asocia menor incidencia de aneurismas coronarios(22,26)
Corte pronóstico	Degranulación < 30 %	Ferritina ≥ 10.000 ng/mL, intensificación inmunomoduladora y estancia en UCI prolongada(5)
Ensayo CD107a	—	Identifica fenotipos de alto riesgo en <24 h y guiar la escalada terapéutica(3)
Ruxolitinib	Restauración NK al 45–60 %	Normalización de ferritina y resolución de fiebre en 48 h(3)

Fuente: Elaboración propia

4.1.2 Resultados del fenotipado de células NK

El análisis comparativo de los perfiles funcionales de las células NK en los distintos SHI revela marcadas diferencias patogénicas. En la HLH primaria, la ausencia de perforina intracelular (indetectable en las mutaciones estudiadas) y la degranulación CD107a inferior al 10 % confirman una detención casi total del mecanismo citotóxico. (6,10) Además, los niveles de granzima B se encuentran significativamente elevados, probablemente en respuesta a la sobreproducción de citocinas, aunque esta enzima no logra sustituir la función de la perforina.(27) Clínicamente, estos hallazgos se asocian a hiperferritinemia extrema (> 30.000 ng/mL), fallo hepático fulminante y mortalidad precoz en ausencia de trasplante de progenitores hematopoyéticos.

En la HLH secundaria, a diferencia de las formas familiares, persiste una actividad residual de citotoxicidad (15–25 %) pese a la sobreexpresión de los receptores de agotamiento PD-1 y LAG-3 en la subpoblación CD56^{dim}.(22) La perforina, aunque presente, muestra defectos funcionales parciales(14), y la degranulación CD107a se reduce, pero no se anula. Este perfil mixto permite cierto control inflamatorio, de modo que pacientes con más del 20 % de actividad citotóxica necesitan con menos frecuencia esquemas con etopósido y presentan un mejor pronóstico global.(28)

En el MAS vinculado a la artritis idiopática juvenil sistémica, la degranulación CD107a se reduce transitoriamente hasta el 15–30 % en los picos hiperinflamatorios, coincidiendo con elevaciones de IL-18 por encima de 40 000 pg/mL. Tras el manejo con corticoides o anakinra, la capacidad de degranulación retorna a valores normales, lo que confirma su utilidad tanto como biomarcador pronóstico como para monitorizar la respuesta al tratamiento. (19)

El MIS-C se caracteriza por una marcada linfopenia de células NK (recuentos < 100 cél/ μ L) pero con una degranulación conservada en torno al 60 ± 12 % (2), lo que sugiere un papel secundario de las NK en el inicio de la tormenta de citocinas. No obstante, aproximadamente un 25 % de los casos graves muestran un fenotipo de agotamiento con alta expresión de PD-1, asociada a disfunción ventricular izquierda y necesidad de soporte vasoactivo.(22)

Finalmente, en la EK la función citotóxica de las células NK permanece por encima del 70 %, mientras que la subpoblación CD56^{bright} se expande y secreta IL-10 en niveles elevados, estabilizando la respuesta inflamatoria y reduciendo la incidencia de aneurismas coronarios cuando la ratio CD56^{bright}/CD56^{dim} supera 1.(22,26) Estos datos refuerzan la hipótesis de que,

en la EK, las NK actúan principalmente como moduladoras antiinflamatorias más que como efectoras citotóxicas.

En la Tabla 8 se detallan los hallazgos funcionales de las células NK en cada patología, incluyendo niveles de perforina, porcentaje de degranulación CD107a, granzima B, expresión de receptores de agotamiento (PD-1, LAG-3, TIGIT) y sus principales correlaciones clínicas.

Tabla 8: Resultado del fenotipado de células NK

<i>Patología</i>	<i>Perforina</i>	<i>CD107a degranulation</i>	<i>Granzima B</i>	<i>PD-1 / LAG-3 / TIGIT</i>	<i>Correlación clínica</i>
HLH primaria	Indetectable (6)	< 10 % (10)	Elevada (27)	ND-	Ferritina mediana > 30 000 ng/mL; fallo hepático fulminante y mortalidad precoz sin trasplante (15,27)
HLH secundaria	Normal pero no funcional (14)	15–25 % (22)	-	↑ PD-1, ↑ LAG-3 (22)	Actividad > 20 % asocia menor necesidad de etopósido y mejor pronóstico(28)
MAS	Normal	15–30 % (19)	-	-	Picos de IL-18 > 40 000 pg/mL; normalización tras corticoides o anakinra (19)
MIS-C	Conservada	≈ 60 ± 12 % (2)	-	↑ PD-1 en 25 % casos (2)	Linfopenia NK < 100 cél/μL; PD-1 alto asociado a disfunción ventricular y soporte vasoactivo (2,22)
EK	Conservada	> 70 % (26)	-	-	Ratio CD56bright/CD56dim > 1 asocia menor incidencia de aneurismas coronarios (22,26)

Fuente: Elaboración propia

4.2 Observación in situ del protocolo de citometría de flujo en CIBA

Como paso previo a la descripción técnica del protocolo, la autora asistió al CIBA, Zaragoza para observar procesamiento completo de las muestras murinas. El personal le mostró el proceso. Tras la disgregación mecánica del bazo, la lisis de eritrocitos con tampón ACK y el filtrado, las células se tiñeron con un panel de anticuerpos contra CD45, CD3, NK1.1, CD49b, perforina, CD107a, PD-1, LAG-3 y TIGIT, junto con un marcador de viabilidad. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro MACSQuant 10 (Miltenyi), para asegurar la pureza de la población de interés, se aplicó un gating jerárquico: primero se eliminaron detritos y células muertas, luego se aislaron los singlets, a continuación, se seleccionaron las células hematopoyéticas viables mediante CD45⁺ y, finalmente, se definieron las células NK como CD3⁻ NK1.1⁺/CD49b⁺. Sobre esta población se evaluó la expresión de los marcadores funcionales.

4.2.1 Principios de la citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar, en tiempo real, características físicas y marcadores fluorescentes de miles de células individuales por segundo. Cada célula, arrastrada por una corriente de fluido, atraviesa un haz láser; los fotodetectores registran la dispersión, así como la emisión de fluorocromos unidos a anticuerpos específicos de superficie o intracelulares. Las señales se traducen en coordenadas que, al representarse gráficamente, permiten distinguir poblaciones celulares definidas.

4.2.2 Concepto de gating

El *gating* consiste en dibujar regiones electrónicas (*gates*) sobre los diagramas de dispersión para incluir únicamente los eventos (células) de interés y excluir detritos, agregados celulares o poblaciones no relevantes. El proceso es jerárquico: cada *gate* se aplica sobre el anterior, de modo que se filtra progresivamente hasta llegar a una población pura.

En el fenotipado de células NK se aplica un esquema típico:

1. **Células viables:** exclusión de células muertas mediante un marcador de viabilidad.
2. **Selección singletes:** selección de eventos individuales en FSC-H vs. FSC-A para evitar agregados.
3. **Linfocitos:** aislamiento de linfocitos viables mediante un gate en CD45⁺.
4. **CD3⁻ CD56⁺:** definición de las células NK como negativas para CD3 (linfocitos T) y positivas para NK1.1 (o CD56⁺ en humano).

4.2.2.1 Objetivo del gating en el fenotipado de células NK

El *gating* se emplea para "limpiar" digitalmente la muestra, de modo que el análisis se limite únicamente a la población celular relevante. En el contexto de las células NK, *gatear* persigue cuatro objetivos esenciales:

1. Eliminar artefactos y ruido: restos celulares, detritos y células muertas generan señales fluorescentes inespecíficas que distorsionan la cuantificación. Excluirlos evita falsos positivos/negativos.
2. Aislar una población pura: seleccionar CD3⁻ CD56⁺ garantiza que los marcadores funcionales (perforina, CD107a) reflejen la biología de las células NK y no la de linfocitos T u otras células.

3. Permitir comparaciones válidas: analizar la misma subpoblación (p. ej., células NK CD56dim) en todos los pacientes estandariza los resultados y facilita comparar entre individuos y con controles sanos.
4. Cuantificar subpoblaciones funcionales: separar células NK CD56bright (productoras de citocinas) de células NK CD56dim (citotóxicas) permite correlacionar funciones específicas con manifestaciones clínicas y biomarcadores.

En resumen, el *gating* maximiza la precisión y la reproducibilidad del fenotipado de células NK, asegurando que cualquier alteración detectada (p. ej., baja degranulación o sobreexpresión de PD-1) sea atribuible a las células NK y no a ruido analítico o contaminación con otras células.

4.2.3 Marcadores funcionales evaluados

Perforina (intracelular): proteína formadora de poros esencial para la citotoxicidad; su ausencia indica defectos congénitos (p. ej., mutaciones PRF1).

CD107a (LAMP-1): marcador de degranulación; se externaliza transitoriamente cuando los gránulos líticos se fusionan con la membrana. La prueba funcional consiste en estimular las células (PMA/ionomicina o células K562) y medir el porcentaje de células NK CD107a⁺ tras 4 h.

Granzima B: serina-proteasa que induce apoptosis en la célula diana.

PD-1, LAG-3, TIGIT: receptores inhibidores asociados a agotamiento; su coexpresión indica disfunción adquirida.

4.2.4 Control de calidad y análisis de datos

- Se adquieren al menos 50.000 eventos linfocitarios para garantizar representación estadística.
- Se utilizan controles FMO (*fluorescence minus one*) para establecer los cortes de positividad.
- La citotoxicidad se interpreta relativa a un control sano procesado el mismo día; actividades < 10 % se consideran patológicas.
- Los resultados se exportan como porcentajes y medianas de fluorescencia, y se analizan con software estadístico para correlacionarlos con biomarcadores clínicos (ferritina, IL-18).

4.2.5 Estrategia de gating

En la Figura 3 se presenta la estrategia de gating utilizada para identificar las poblaciones celulares en el bazo y cuantificar la expresión de Granzima A, tanto en ratones WT como en Perf KO tras infección por LCMV WE.

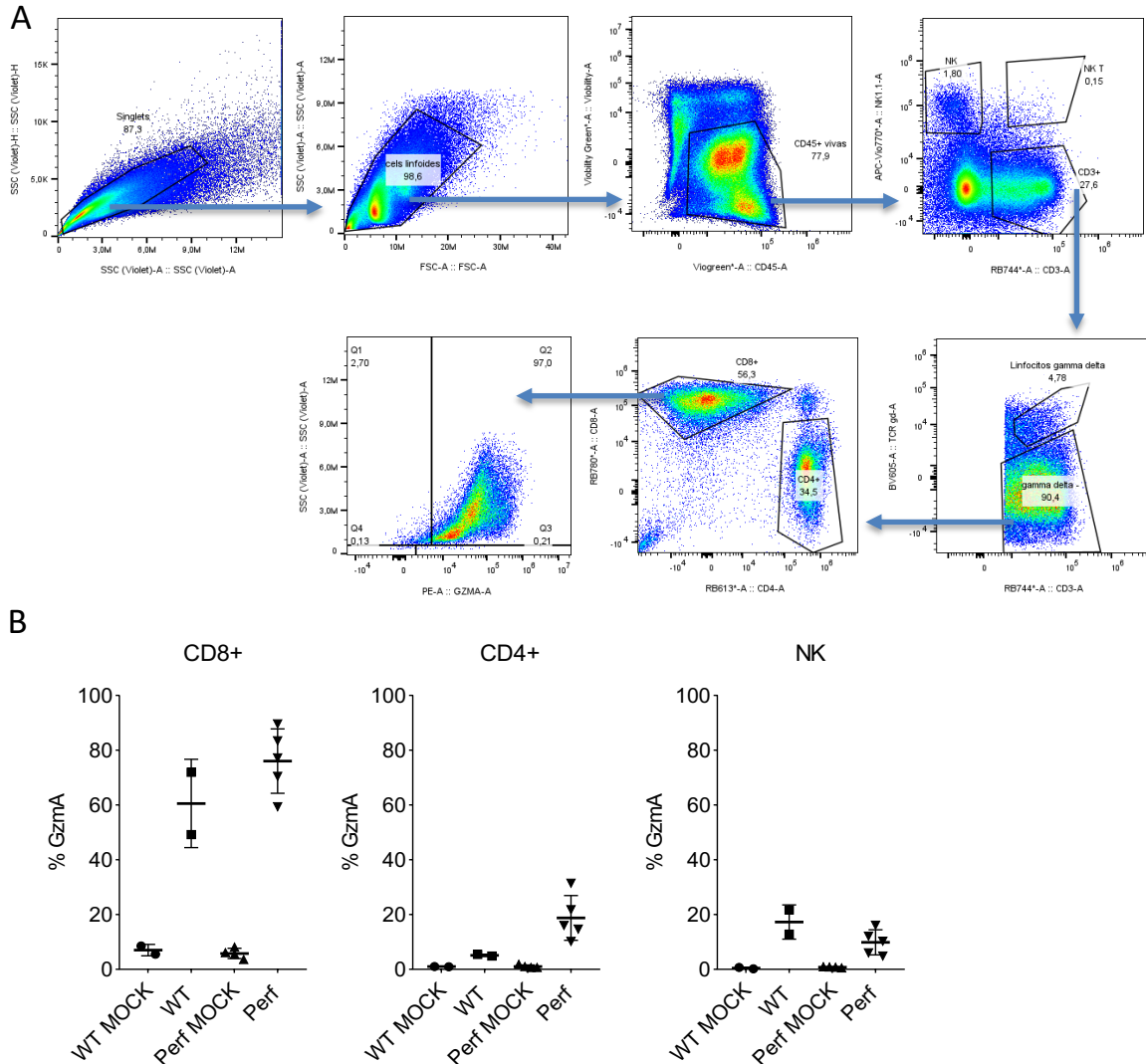


Figura 2: Estrategia de gating. Fuente: *Elaboración Senan-Salinas A.* Granzima A en distintas poblaciones del sistema inmune en HLH. Ratones WT y Perf KO inoculados con 103 PFU de LCMV WE, promoviendo en el caso de los Perf KO el síndrome del HLH. Sacrificio a día 7 de la infección y extracción de los bazo. Controles MOCK de cada grupo sin infectar. A) Estrategia de gating de la citometría de los bazo. B) Porcentaje de Granzima A en diferentes poblaciones del sistema inmune obtenidas de la citometría de los bazo.

5. Discusión

5.1 Interpretación integrada de los hallazgos

La evidencia recopilada revela una distribución escalonada en la capacidad citotóxica de las células NK, que se alinea con la severidad de los SHI: actividad < 10 % en la HLH primaria, 10-30 % en HLH secundaria y en el MAS, \approx 60 % en el MIS-C y > 70 % en la EK.(4,5,9,16)

Esta distribución sustenta la hipótesis central de nuestro trabajo: cuanto mayor es el defecto citotóxico de las células NK, mayor será la incapacidad para frenar la activación de macrófagos y menor el umbral para desencadenar una "tormenta de citocinas". En HLH familiar, la ausencia de perforina o la imposibilidad de degranular anulan por completo el mecanismo de retroalimentación negativo que normalmente limita la producción de IFN- γ . (21)

En los síndromes reactivos (HLH secundaria y MAS) persiste un resto funcional que permite cierto control de la inflamación, lo que explica su mejor pronóstico si se instaura inmunomodulación temprana. MIS-C se sitúa en un punto intermedio: las células NK están numéricamente reducidas, pero conservan parcialmente su capacidad lítica, señal de que la hiperinflamación obedece más a una activación policlonal de linfocitos T que a un defecto de células NK absoluto.(2,16)

Finalmente, en la EK la función de las células NK es prácticamente normal; la patología parece derivar de una respuesta reguladora alterada, con expansión de la subpoblación células NK CD56bright productora de IL-10 que intenta atenuar la vasculitis.(23)

La correlación inversa entre ferritina y citotoxicidad ($r \approx -0,55$), descrita en varios estudios, sugiere que la ferritina puede emplearse como biomarcador indirecto de disfunción de células NK, aunque con limitaciones de especificidad.(8,15)^{13,17}

Estos datos concuerdan con la observación de Mellor-Heineke et al., quienes mostraron niveles elevados de granzima B como marcador de activación sostenida en HLH.(27)

En condiciones fisiológicas, las células NK ejercen un control directo sobre los macrófagos sobreactivados, por patógenos o estrés tisular, mediante la lisis citotóxica. Nedvetzki et al. describen cómo, tras una estimulación intensa, los macrófagos inducen en su superficie ligandos

de estrés para NKG2D (ULBP1-3, MICA) que son reconocidos por las NK, desencadenando la muerte de estos macrófagos hiperactivados.(30)

Cuando la actividad de las células NK está reducida (por defecto genético, agotamiento o bloqueo terapéutico) este mecanismo regulador falla, permitiendo que los macrófagos activados persistan y liberen en exceso citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β), contribuyendo a la amplificación de la “tormenta de citocinas” y la lesión tisular característica de los SHI. Incorporar este eje NK-macrófago en el modelo patogénico ayuda a explicar por qué un déficit en citotoxicidad de las células NK predispone a formas más graves de HLH, MAS o MIS-C.(30)

En el Anexo 3 (Figura 4) se muestra un diagrama del circuito IL-18–IFN- γ –IL-6 que potencia recíprocamente la inflamación en los SHI.

5.2 Implicaciones diagnósticas y terapéuticas

Los hallazgos demuestran que la actividad citotóxica de las células NK es esencial para prevenir el desarrollo de un cuadro similar a HLH tras infección por LCMV en ratones. En concreto, la presencia de células NK funcionales (TPPrf1–NKPrf1+) limitó directamente tanto la hiperactivación y la función de los linfocitos CD8+ citotóxicos como la infiltración de macrófagos inflamatorios en los tejidos, aun cuando los niveles de IFN- γ y la carga viral permanecían inalterados.(22) Este doble mecanismo (la eliminación de CTL sobreactivados y la lisis de macrófagos hiperactivados) explica por qué un déficit en la citotoxicidad de las células NK favorece la expansión excesiva de células efectoras y la amplificación de la tormenta de citocinas en los SHI. Cabe destacar que, aunque la infección viral persistió en los ratones con células NK citotóxicas competentes, la eliminación de LCMV no se vio comprometida, subrayando el papel principal de los CD8+ en la eliminación viral y confirmando que el virus actúa como disparador pero no como determinante del curso patológico cuando las células NK funcionan correctamente.(22)

La intensidad del tratamiento en los SHI debe calibrarse según el grado de disfunción citotóxica de las células NK. En la HLH primaria, la inducción con etopósido y dexametasona constituye la primera línea, y en los casos refractarios se añade emapalumab (anticuerpo anti-IFN- γ) antes del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos, dada su capacidad para suplir la función perdida de las NK.(12) Cuando la actividad de degranulación de las células NK en HLH secundaria o MAS asociado a artritis idiopática juvenil se sitúa entre el 10 y el 30 %, se inicia manejo con corticoides a dosis altas y, si la respuesta es parcial, se incorpora anakinra; de persistir la

inflamación, el bloqueo de la vía JAK-STAT con ruxolitinib ofrece un rescate eficaz.(13) En MIS-C, la combinación de IVIG y corticoides controla la mayoría de los casos, pero la adición de anakinra está indicada cuando la degranulación CD107a es inferior al 40 % o se observa sobreexpresión de PD-1 en células NK, mejorando la recuperación sistémica y cardíaca.(5) En la EK, IVIG más ácido acetilsalicílico sigue siendo el estándar, reservando la inmunomodulación específica para formas resistentes.(8)

Más allá de estos esquemas, las células NK ofrecen nuevas oportunidades terapéuticas. La transferencia adoptiva de células NK haploidenticas ha demostrado persistir y expandirse in vivo, induciendo remisiones en neoplasias hematológicas y sugiriendo su utilidad para corregir defectos citotóxicos en síndromes refractarios.(31) La edición génica ex vivo con CRISPR/Cas9 ha permitido reparar mutaciones en PRF1 en células NK primarias, restaurando su capacidad lítica en modelos experimentales y abriendo la puerta a terapias celulares personalizadas en HLH familiar.(32) Asimismo, los éxitos de nivolumab y atezolizumab para bloquear PD-1/PD-L1 en cáncer indican que el reinicio de puntos de control podría reactivar células NK “exhaustas” y frenar la hiperactivación macrofágica y linfocítica en SHI graves.(33,34) Estas estrategias, nacidas de la onco-inmunología, establecen un marco prometedor para ensayos clínicos que integren la potenciación de la citotoxicidad de las células NK como pilar terapéutico.

En el Anexo 2 se incluye un glosario de los principales fármacos utilizados en el manejo de los SHI, clasificados por categoría y con una breve descripción de su mecanismo de acción.

5.3 Limitaciones del conocimiento actual

- Heterogeneidad metodológica: no existen protocolos internacionales estandarizados para el ensayo CD107a, lo que dificulta la comparación intercentros.
- Sesgo de publicación: predominan series pequeñas y casos clínicos en hospitales de referencia; los cuadros leves podrían estar subrepresentados.
- Falta de seguimiento a largo plazo: desconocemos si la normalización de la función de las células NK se mantiene tras la remisión clínica o si existen secuelas inmunológicas.

5.4 Perspectivas futuras y líneas de investigación

1. Proyectos multicéntricos para reclutar cohortes ≥ 500 pacientes y aplicar protocolos uniformes de citometría.

2. Integración ómicas (transcriptoma, epigenoma y metaboloma de las células NK) para caracterizar las vías de agotamiento reversibles.
3. Ensayos fase III de emapalumab y ruxolitinib con subgrupos estratificados por CD107a.
4. Ingeniería celular: edición CRISPR de células NK alogénicas resistentes a PD-1/LAG-3 como terapia puente al trasplante en HLH refractaria.

6. Conclusiones

Partiendo de la revisión bibliográfica y la descripción metodológica presentada, estas son las principales conclusiones que se extraen:

- La magnitud del defecto citotóxico de las células NK guarda una relación directa con la gravedad clínica de los SHI: HLH primaria muestra una actividad $< 10\%$, HLH secundaria y MAS entre $10-30\%$, MIS-C en torno al 60% y la EK $> 70\%$.
- La prueba funcional de degranulación CD107a, complementada con la cuantificación de perforina, constituye un biomarcador pronóstico de gran validez que diferencia fenotipos de alto y bajo riesgo y orienta la escalada terapéutica.
- El *gating* jerárquico; este esquema (viabilidad \rightarrow singlets \rightarrow CD45⁺ linfocitos \rightarrow CD3⁺ CD56⁺) resulta esencial para eliminar ruido analítico, aislar una población células NK pura y permitir comparaciones válidas entre muestras y controles.
- Los datos sobre receptores de agotamiento PD-1, LAG-3 y TIGIT en células NK sugieren que podrían usarse como dianas terapéuticas; su bloqueo podría restaurar la citotoxicidad en casos refractarios, complementando a los inhibidores JAK y al anti-IFN- γ emapalumab.
- La variabilidad interlaboratorio subraya la necesidad de estandarizar protocolos de citometría y establecer valores de referencia para las subpoblaciones de células NK y sus marcadores funcionales.
- La integración de la función de células NK en los criterios diagnósticos oficiales permitiría una estratificación más precisa y un uso racional de terapias intensivas, con potencial para mejorar el pronóstico y reducir efectos adversos.

En conjunto, la evaluación sistemática de la función las células NK emerge como un eje patogénico y pronóstico transversal a los SHI. Su evaluación temprana aporta un valor añadido al algoritmo diagnóstico, orienta la intensidad terapéutica y abre la puerta a estrategias dirigidas que podrían transformar el manejo de estas entidades en la próxima década.

7. Limitaciones

A continuación, se resumen las principales limitaciones del presente Trabajo Fin de Grado:

- Diseño narrativo: la revisión no siguió las directrices PRISMA ni realizó metaanálisis; por tanto, la fuerza de la evidencia puede estar sujeta a sesgo de selección.
- Heterogeneidad metodológica: los estudios incluidos emplean clones de anticuerpos, tiempos de estimulación y citómetros distintos, lo que dificulta la comparación directa de valores de perforina y CD107a.
- Tamaños muestrales pequeños: la mayoría de artículos presentan < 50 pacientes, lo que limita el poder estadístico para correlaciones multivariantes.
- Ausencia de datos propios, aunque se describe el protocolo de citometría, no se aportan resultados originales cuantitativos que validen los hallazgos bibliográficos en nuestra cohorte local ya que es difícil acceder a muestras de pacientes lo que limita los estudios en humanos.
- Posible sesgo de publicación: los casos de mayor gravedad y peores desenlaces tienen más probabilidad de ser publicados, sobreestimando así la asociación entre disfunción de células NK y mortalidad.
- Limitaciones técnicas: la interpretación de marcadores de agotamiento (PD-1, LAG-3) carece de valores de referencia pediátricos bien establecidos.

8. Anexos

8.1 Anexo 1: Glosario de abreviaturas

8.1.1 Enfermedades y síndromes

- SHI: Síndromes hiperinflamatorios
- HLH: Linfohistiocitosis hemofagocítica
- MAS: Síndrome de activación macrofágica
- MAS-SL: Síndrome de activación de macrófagos asociado al lupus eritematoso sistémico
- MIS-C: Síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico
- MIS-N: Síndrome inflamatorio multisistémico neonatal
- EK: Enfermedad de Kawasaki
- LCMV: virus de la familia Arenaviridae, que se infecta comúnmente a roedores
- AIJs: artritis idiopática juvenil sistémica

8.1.2 Organismos y definiciones oficiales

- AHA: American Heart Association
- AAP: American Academy of Pediatrics
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- CSTE: Council of State and Territorial Epidemiologists
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention
- FDA: Food and Drug Administration

8.1.3 Genética y biología celular

- SAP: Proteína adaptadora SH2D1A implicada en síndrome linfoproliferativo ligado a X
- XIAP: Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X
- PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2, RAB27A: Genes clave en el empaquetamiento y exocitosis de gránulos citotóxicos
- Th17: Linfocitos T helper 17, subpoblación productora de IL-17

8.1.4 Células y receptores

- NK: Células asesinas naturales
- CTL: Linfocito T citotóxico

- CD107a: LAMP-1, marcador de degranulación de células citotóxicas
- CD3: Molécula de superficie identificadora de linfocitos T
- CD49b: Integrina $\alpha 2$, marcador de subpoblaciones de células NK en ratón
- CD56dim: Subpoblación de células NK citotóxicas
- CD56bright: Subpoblación de células NK productoras de citocinas reguladoras
- NKG2D, NKp30, NKp46: Receptores activadores de células NK
- KIR, NKG2A: Receptores inhibidores de células NK
- MHC-I (HLA-I): Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I
- PD-1: Programmed Death-1, receptor inhibidor
- PD-L1: Programmed Death-Ligand 1, ligando inhibidor de PD-1
- LAG-3: Lymphocyte Activation Gene-3, receptor inhibidor
- TIGIT: T-cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains, receptor inhibidor

8.1.5 Citocinas y biomarcadores

- IFN- γ : Interferón gamma, citocina proinflamatoria
- IL-6: Interleucina-6, citocina proinflamatoria
- IL-10: Interleucina-10, citocina antiinflamatoria
- IL-18: Interleucina-18, citocina proinflamatoria
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
- Ferritina: Proteína de almacenamiento de hierro y reactante de fase aguda
- Triglicéridos: Lípidos sanguíneos que se elevan en inflamación
- Fibrinógeno: Factor de coagulación
- Dímero-D: Fragmento de fibrina degradada que indica activación de coagulación y fibrinólisis y riesgo trombótico.
- CD69: Marcador de activación temprana
- HLA-DR: Indicador de activación maduro de leucocitos
- FasL: Fas Ligand, induce apoptosis en células diana

8.1.6 Técnicas, parámetros estadísticos y otros

- DE: Desviación estándar (medida de dispersión alrededor de la media)
- FMO: Fluorescence Minus One, control en citometría
- IQR: Rango intercuartílico (rango entre Q1 y Q3)
- PCR: Proteína C reactiva, reactante de fase aguda

- VSG: Velocidad de Sedimentación Globular
- UCI: Unidad de Cuidados Intensivos
- CIBA: Centro de Investigación Biomédica de Aragón
- WT (Wild-Type): ratones “tipo salvaje”, sin ninguna alteración genética. Sirven como control para comparar datos fisiológicos y de respuesta inmunitaria en condiciones normales.
- Perf KO (Perforin Knock-Out): son ratones en los que se ha “anulado” (knock-out) el gen PRF1, que codifica la perforina. Al carecer de perforina, sus células NK y linfocitos T citotóxicos no pueden perforar la membrana de las células diana, lo que reproduce uno de los defectos clave de la HLH primaria y permite estudiar su papel en la fisiopatología de los síndromes hiperinflamatorios.
- Controles MOCK: es una muestra que se somete a exactamente los mismos procedimientos que la muestra experimental, pero sin el tratamiento activo

8.2 Anexo 2: Glosario de fármacos

Tabla 9: Glosario de fármacos

<i>Categoría</i>	<i>Fármaco</i>	<i>Descripción</i>
Antiinflamatorios y corticoides	Dexametasona	Glucocorticoide ultrapotente, larga semivida, sin mineralocorticoide.
	Metilprednisolona	Glucocorticoide potente intermedio, semivida media, mínima mineralocorticoide.
	Prednisona	Profármaco de prednisolona, potencia moderada, semivida corta.
Antitrombóticos	Acetilsalicílico (AAS)	Antiinflamatorio no esteroideo y antiplaquetario que inhibe irreversiblemente la enzima COX-1.
	Heparina de bajo peso molecular	Anticoagulante subcutáneo inhibe factor Xa, larga acción.
Inmunomoduladores biológicos	Anakinra	Antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1R).
	Emapalumab	Anticuerpo monoclonal dirigido contra el interferón gamma (IFN-γ).
	Infliximab	Anticuerpo monoclonal anti-TNFα.
	Tocilizumab	Anticuerpo monoclonal anti-IL-6R
	Nivolumab	Inhibidores de PD-1/PD-L1
	Atezolizumab	
Inmunoglobulina	Inmunoglobulina intravenosa (IVIG)	Preparado de inmunoglobulinas humanas con efecto inmunomodulador.
Inhibidores JAK	Ruxolitinib	Inhibidor de JAK1/2 que interfiere con la señalización de IFN-γ y otras citocinas.
	Baricitinib	Inhibidor de JAK1/2 que bloquea la señalización de citocinas como IL-6 e IFN-γ.
Inmunosupresores convencionales	Ciclosporina A	Inhibidor de la calcineurina que suprime la activación de células T.
	Metotrexato	Antimetabolito antifólico con efecto inmunosupresor e inhibidor de la proliferación celular.
Quimioterapia	Etopósido	Inhibidor de la topoisomerasa II

Fuente: Elaboración propia

8.3 Anexo 3: Relación entre IL-6, IL-18 y INF- γ

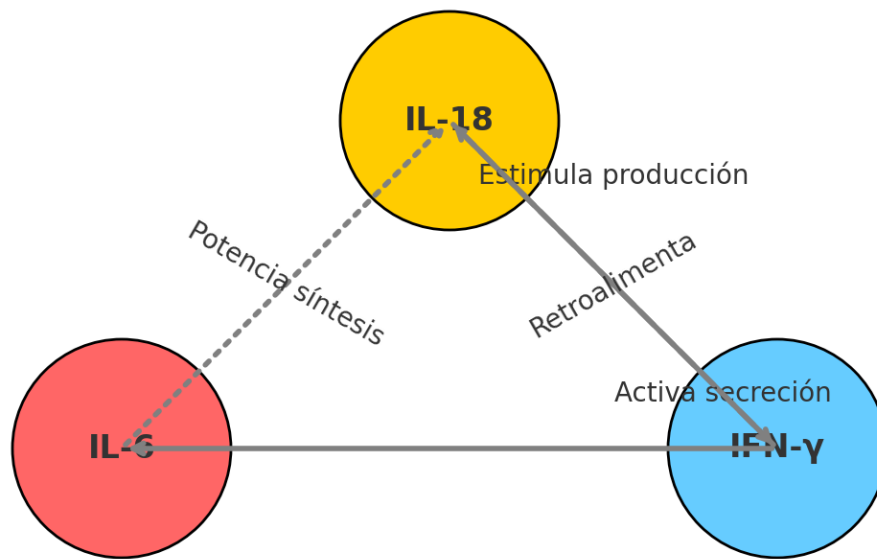


Figura 3: Diagrama de interacciones entre IL-18, IFN- γ e IL-6. Elaboración propia (35): IL-18 estimula la producción de IFN- γ por células NK y T; IFN- γ activa a los macrófagos para secretar IL-6; IFN- γ retroalimenta la liberación de IL-18 (línea discontinua); y IL-6 potencia la síntesis de IL-18 a través de la activación inflamatoria (línea punteada). Este circuito de citocinas contribuye a la amplificación de la respuesta inflamatoria en SHI.

9. Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este Trabajo de Fin de Grado:

- **Dra. Eva Gálvez Buerba**, del Instituto de Carboquímica (CSIC), por su dirección cercana y accesible, sus consejos y supervisión, y por compartir su amplia experiencia, siendo un privilegio contar con su liderazgo de una gran experta que ha enriquecido cada fase de este proyecto.
- **Dr. Julián Pardo Jimeno**, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular y profesor de Inmunología en la Universidad de Zaragoza, por despertar mi interés en la inmunología durante sus clases de Fisiología y por el honor de haber trabajado junto a un científico de tan reconocido calibre.
- **Dr. Maikel Alberto Arias Cabrero**, Doctor en Bioquímica, por recibirme tan amablemente en el CIBA y explicarme de forma clara los principios de la citometría de flujo y la estrategia de *gating*.
- **Dra. Ana Senán-Salinas**, graduada en Bioquímica y Biotecnología, actualmente estudiante predoctoral en Bioquímica. Por dedicar una mañana a mostrar detalladamente el procesamiento de las poblaciones celulares mieloide y linfóide de bazo murino y su análisis en tiempo real.
- **Dr. Armando Urgel Ayuso**, colega y médico de Familia, por sus valiosas sugerencias sobre el formato y la coherencia del manuscrito.
- **Alba María**, amiga, enfermera y editora, por sus meticulosas revisiones ortotipográficas, lingüísticas y narrativas.
- **A mis padres**, por su apoyo incondicional a lo largo de estos años, por acompañarme incluso viendo alguna de mis clases durante la cuarentena y por escuchar siempre mis inquietudes y dudas en cada etapa de la carrera.

A todos ellos, mi más profundo reconocimiento y gratitud.

10. Bibliografía

1. Aubert A, Jung K, Hiroyasu S, Pardo J, Granville DJ. Granzyme serine proteases in inflammation and rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2024;20(6):361–76.
2. Carvelli J, Piperoglou C, Farnarier C, Vely F, Mazodier K, Audonnet S, et al. Functional and genetic testing in adults with HLH reveals an inflammatory profile rather than a cytotoxicity defect. *Blood*. 2020;136(5):542–52.
3. Molloy EJ, Nakra N, Gale C, Dimitriades VR, Lakshminrusimha S. Multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C) and neonates (MIS-N) associated with COVID-19: optimizing definition and management. *Pediatr Res*. 2022;93(6):1499–508.
4. Dick JK, Sangala JA, Krishna VD, Khaimraj A, Hamel L, Erickson SM, et al. NK Cell and Monocyte Dysfunction in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *J Immunol*. 2024;213(10):1452–66.
5. Day-Lewis M, Berbert L, Baker A, Dionne A, Newburger JW, Son MBF. Updated Case Definition of MIS-C and Implications for Clinical Care. *Pediatrics*. 2024;153(2).
6. Sullivan KE, Delaat CA, Douglas SD, Filipovich AH. Defective Natural Killer Cell Function in Patients with Hemophagocytic Lymphohistiocytosis and in First Degree Relatives. *Pediatr Res*. 1998;44(4):465–8.
7. Nichols KE, Hines MR. NK cells: energized yet exhausted in adult HLH. *Blood*. 2020;136(5):524–5.
8. Noval Rivas M, Arditi M. Kawasaki Disease and Multisystem Inflammatory Syndrome in Children: Common Inflammatory Pathways of Two Distinct Diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 2023;49(3):647.
9. Dick JK, Sangala JA, Krishna VD, Khaimraj A, Hamel L, Erickson SM, et al. Antibody-mediated cellular responses are dysregulated in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C). *J Pediatr Infect Dis Soc*. 2024;13(Suppl 4):8–9.
10. Hines MR, Nichols KE. Go with the flow: perforin and CD107a in HLH. *Blood*. 2017;129(22):2954–5.
11. Crayne CB, Albeituni S, Nichols KE, Cron RQ. The Immunology of Macrophage Activation Syndrome. *Front Immunol*. 2019;10(FEB):72.
12. Konkol S, Killeen RB, Rai M. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *StatPearls*. 2025.

13. Sztajn bok F, Fonseca AR, Campos LR, Lino K, Rodrigues MCF, Silva RM, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and macrophage activation syndrome: two rare sides of the same devastating coin. *Adv Rheumatol*. 2024;64(1):1–11.
14. Chinnici A, Beneforti L, Pegoraro F, Trambusti I, Tondo A, Favre C, et al. Approaching hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Front Immunol*. 2023;14:1210041.
15. Vandenhoute J, Wouters CH, Matthys P. Natural Killer Cells in Systemic Autoinflammatory Diseases: A Focus on Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis and Macrophage Activation Syndrome. *Front Immunol*. 2020;10:3089.
16. Gomez R, Maakaron J, Baiocchi R. Macrophage Activation Syndrome Versus Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Diagnostic Dilemma in a Patient With Still's Disease and Epstein-Barr Virus Viremia. *J Hematol*. 2019;8(2):68.
17. Franco A, Tremoulet A, Burns JC. More on Pre-Covid-19, SARS-CoV-2–Negative MIS-C. *N Engl J Med*. 2024;390(8):771–2.
18. Richardson KC, Jung K, Pardo J, Turner CT, Granville DJ. Noncytotoxic Roles of Granzymes in Health and Disease. *Physiology (Bethesda)*. 2022;37(6):323–48.
19. Senan-Salinas A, Comas L, Esteban P, Garzón-Tituaña M, Cheng Z, Santiago L, et al. Selective Detection of Active Extracellular Granzyme A by Using a Novel Fluorescent Immunoprobe with Application to Inflammatory Diseases. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2024;7(5):1474–84.
20. Canna SW, Marsh RA. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2020;135(16):1332–43.
21. Webb BJ, Peltan ID, Jensen P, Hoda D, Hunter B, Silver A, et al. Clinical criteria for COVID-19-associated hyperinflammatory syndrome: a cohort study. *Lancet Rheumatol*. 2020;2(12):754–63.
22. Sepulveda FE, Maschalidi S, Vosshenrich CAJ, Garrigue A, Kurowska M, Ménasche G, et al. A novel immunoregulatory role for NK-cell cytotoxicity in protection from HLH-like immunopathology in mice. *Blood*. 2015;125(9):1427–34.
23. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503–10.
24. Popko K, Gór ska E. The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(4):470–6.

25. Pesini C, Artal L, Paúl J, Sánchez D, Pardo J, Ramírez-Labrada A. In-depth analysis of the interplay between oncogenic mutations and NK cell-mediated cancer surveillance in solid tumors. *OncolImmunology*. 2024;13.
26. Hasegawa D, Kojima S, Tatsumi E, Hayakawa A, Kosaka Y, Nakamura H, et al. Elevation of the Serum Fas Ligand in Patients With Hemophagocytic Syndrome and Diamond-Blackfan Anemia. *Blood*. 1998;91(8):2793–9.
27. Mellor-Heineke S, Villanueva J, Jordan MB, Marsh R, Zhang K, Bleesing JJ, et al. Elevated Granzyme B in Cytotoxic Lymphocytes is a Signature of Immune Activation in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Front Immunol*. 2013;4:72.
28. Ramírez-Labrada A, Pesini C, Santiago L, Hidalgo S, Calvo-Pérez A, Oñate C, et al. All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. *Front Immunol*. 2022;13:896228.
29. Shang K, Teng G, Zhang Y, Duan Y, Du C, Wang Y, et al. Characterization of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Associated with Myeloid Neoplasms at Single-Cell Resolution. *Blood*. 2024;144:4101.
30. Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Ric F, Pende D, et al. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood*. 2007;109:3776–85.
31. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005;105(8):3051–7.
32. Elmas E, Saljoughian N, de Souza M, Tullius BP, Sorathia K, Nakkula RJ, et al. CRISPR Gene Editing of Human Primary NK and T Cells for Cancer Immunotherapy. *Front Oncol*. 2022;12.
33. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443–54.
34. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2455–65.
35. Murphy K, Weaver C, Janeway C. *Janeway's immunobiology*. Garland Science; 2017.