



ORIGINAL

La actividad citotóxica de las células natural killer como herramienta diagnóstica en pacientes pediátricos críticos con sospecha de síndrome hemofagocítico[☆]



I. Martínez^a, L. Fernández^b, J. Valentín^c, C. Castillo^d,
C. Chamorro^e y A. Pérez-Martínez^{f,*}

^a Hospital Montepíncipe, Madrid, España

^b Grupo de Investigación Clínica, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), España

^c Grupo de Inmunidad Innata y Cáncer, Instituto de Investigación de La Paz (IdiPaz), España

^d Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

^e Faculty of Kinesiology, University of Calgary, Toronto, Canadá

^f Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica, Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España

Recibido el 18 de marzo de 2014; aceptado el 29 de mayo de 2014

Disponible en Internet el 28 de julio de 2014

PALABRAS CLAVE

Síndromes hemofagocíticos;
Células natural killer;
Citotoxicidad de las células natural killer;
Fas ligando

Resumen

Objetivo: Determinar el papel de la citotoxicidad de las células natural killer (NK) en pacientes pediátricos críticos con sospecha de síndrome hemofagocítico (SH).

Diseño: Estudio prospectivo realizado en el período comprendido entre septiembre de 2008 y febrero de 2014.

Ámbito: Se ha realizado en el Laboratorio de Onco-Hematología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid.

Pacientes: Se analizaron 30 muestras de sangre periférica de pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos de diferentes centros hospitalarios. Los pacientes, 18 niños y 12 niñas, tenían una media de edad de 4,7 años (rango 0,2-22). La citotoxicidad NK se comparó con un control sano del mismo sexo y similar edad.

Intervención: Determinamos la citotoxicidad in vitro NK frente a la línea celular K562 mediante fluorescencia resuelta en el tiempo (Europium-TDA) en condiciones de reposo, tras estimulación con interleucina 15 y bloqueo con el anticuerpo Fas ligando.

Variable de interés: La citotoxicidad NK.

Resultados: En 20 pacientes la citotoxicidad NK estaba disminuida ($p=0,001$). De ellos, 9 fueron diagnosticados de SH primario y 11 de SH secundario. En 10 pacientes la citotoxicidad fue normal; ninguno fue diagnosticado de SH. La estimulación con interleucina 15 aumentó la

[☆] Parte de este trabajo fue presentado como comunicación oral en el V Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas, celebrado en Pamplona durante los días 24-26 de mayo de 2012.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: aperezmartinez@salud.madrid.org, antonioperezmartinez@yahoo.es (A. Pérez-Martínez).

KEYWORDS

Hemophagocytic lymphohistiocytosis syndromes; Natural killer cells; Natural killer cytotoxicity; Fas ligand

citotoxicidad NK en los SH secundarios, y el bloqueo de Fas ligando la disminuyó en los pacientes con SH primarios ($p=0,001$).

Conclusiones: En nuestra experiencia, la citotoxicidad NK constituye una prueba útil para el diagnóstico de los SH. La estimulación con interleucina 15 y el bloqueo con Fas ligando nos pueden ayudar al diagnóstico diferencial de los SH primarios y secundarios.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. y SEMICYUC. Todos los derechos reservados.

Natural killer cell cytotoxic activity in critical pediatric patients with suspected hemophagocytic syndrome

Abstract

Aim: To determine the role of natural killer (NK) cytotoxic activity in patients with suspected hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome (HLH).

Design: A prospective study was conducted from September 2008 to February 2014.

Scope: The study was carried out in the Hematological Oncology Laboratory of Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid (Spain).

Patients: We analyzed 30 peripheral blood samples from intensive care patients with suspected HLH. There were 18 males and 12 females, with a mean age of 4.7 years (range 0.2-22). NK cell cytotoxicity was compared with healthy controls according to age and sex.

Intervention: In vitro NK cell cytotoxicity against the K562 cell line was determined by time-resolved fluorescence (Europium-TDA) under resting conditions, after interleukin 15 stimulation, and following block with Fas ligand antibody.

Variable of interest: NK cell cytotoxicity.

Results: A total of 20 patients showed a significant decrease of NK cell activity compared with controls ($P=.001$). Nine of these patients were diagnosed with primary HLH. A total of 10 patients were diagnosed with secondary HLH. Cytotoxic activity was normal in 10 subjects. None of them were diagnosed with HLH. Interleukin 15 stimulation increased NK cell cytotoxicity in secondary HLH, and blocking Fas ligand on NK cells decreased cytotoxic activity in primary HLH patients ($P=.001$).

Conclusions: In our experience, NK cell cytotoxic activity measured by time-resolved fluorescence is a simple and useful clinical diagnostic test for HLH. Interleukin 15 stimulation and Fas ligand blocking on NK cells could help differentiate between primary and secondary HLH.

© 2014 Elsevier España, S.L.U. and SEMICYUC. All rights reserved.

Introducción

Los síndromes hemofagocíticos (SH) constituyen un trastorno hematológico caracterizado por la disfunción de la actividad citotóxica de los linfocitos T citotóxicos y de las células natural killer (NK), que origina una proliferación, activación e infiltración de linfocitos y macrófagos en diferentes tejidos, así como una excesiva producción de citocinas, responsable todo ello de un cuadro clínico muy grave. Se clasifican en formas primarias y secundarias. El diagnóstico diferencial es fundamental para el tratamiento, pronóstico y consejo genético. Actualmente, el diagnóstico de SH requiere cumplir al menos uno de los siguientes criterios: i) confirmación genética, y/o ii) al menos 5 de los siguientes datos clínicos: fiebre, esplenomegalia, citopenias, hipertrigliceridemia, hipofibrinogenemia, hemofagocitosis, hiperferritinemia, disminución de la actividad citotóxica NK y elevación del receptor soluble de la interleucina (IL)-2¹. Sin embargo, las alteraciones genéticas solo se encuentran en el 30-70% de los SH primarios, y el resto de criterios clínicos son comunes tanto en las formas primarias como secundarias².

La función citotóxica de los linfocitos T citotóxicos y las células NK se realiza a través de 2 mecanismos: i) una vía

directa relacionada con la secreción de proteínas (sistema perforina-granzimas), y ii) una segunda vía, indirecta, a través de la expresión de señales de apoptosis como la vía Fas ligando de Fas (FasL)³⁻⁷. En los SH primarios está alterada la vía directa, por lo que la vía indirecta adquiere un protagonismo predominante⁸⁻¹⁰.

Clásicamente la citotoxicidad de las células NK se ha explorado en el laboratorio mediante técnicas radioactivas. Actualmente existen métodos más sencillos y seguros^{11,12}.

Nuestros objetivos con este trabajo son: i) comprobar la validez de la actividad citotóxica de las células NK mediante fluorescencia resuelta en el tiempo en el diagnóstico de los SH, y ii) discriminar las formas primarias de las secundarias mediante la estimulación de la actividad citotóxica de las células NK con IL-15 y mediante el bloqueo de la vía indirecta (Fas-FasL).

Pacientes y métodos**Pacientes**

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital Niño Jesús.

Desde septiembre de 2008 hasta marzo de 2014 un total de 30 muestras de sangre periférica de pacientes ingresados en Cuidados Intensivos con sospecha de SH provenientes de 7 centros diferentes fueron analizadas en paralelo con las de controles sanos emparejados para sexo y edad.

Mediante centrifugación con gradiente de Ficoll se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica, dividiéndose en diferentes alícuotas para los estudios de citometría de flujo y de citotoxicidad.

Citometría de flujo para la cuantificación de células natural killer, degranulación y expresión de Fas

Mediante citometría de flujo multiparamétrica, utilizando el citómetro Becton Dickinson FACSCanto™ II, se determinó el porcentaje de células NK utilizando la siguiente combinación de anticuerpos: CD3-PE-Cy7, CD16-APC-Cy7 y CD45-FITC de Becton Dickinson, y CD56-APC de Beckman Coulter. Las células NK se definen mediante citometría de flujo como CD45⁺, CD56⁺ y CD3⁻. Se consideró una cifra disminuida de células NK cuando el valor era inferior al 5% de los linfocitos. La degranulación de las células NK se determinó mediante el incremento de la expresión de la proteína CD107a (Δ CD107a) en situación basal y tras estímulo tras al menos 2 h de cultivo con la línea celular K562 en las muestras de los pacientes con actividad citotóxica disminuida. Se consideró una degranulación patológica cuando Δ CD107a era inferior al 2%. En la línea celular K562 se determinó la expresión y la intensidad media de fluorescencia de Fas utilizando el anticuerpo Fas-APC de BioLegend.

Citotoxicidad de las células natural killer mediante fluorescencia resuelta en el tiempo con Europium-TDA

La determinación de la citotoxicidad de las células NK por fluorescencia resuelta en el tiempo es una técnica no radioactiva, basada en el mismo principio que la técnica convencional de liberación de cromo-51¹³. Para ello, la línea celular leucémica K562, diana (T por «target») de las células NK por carecer de HLA-I, se carga de éster de acetoximetilo de BATDA, sustancia liposoluble que atraviesa adecuadamente las membranas celulares. Dentro de la célula los enlaces éster son hidrolizados para formar un ligando hidrófilo (TDA) que queda atrapado en el interior de la célula. Posteriormente, y durante 2 h, se cocultivan la línea celular con las células mononucleares de sangre periférica donde se encuentran las células NK, los efectores (E). Se establecen diferentes ratios E/T: 8/1, 4/1, 2/1 y 1/1. Las células leucémicas que hayan sido lisadas por las células NK liberarán al sobrenadante el TDA contenido en su interior, que mediante solución de Europio forma un quelante altamente fluorescente y estable (EuTDA). La señal de fluorescencia se midió por triplicado en fluorímetro Tecan Infinite® 200. Se emplearon las siguientes fórmulas para calcular la citotoxicidad específica y espontánea: porcentaje de lisis específica = (lisis experimental – lisis espontánea) / (máxima lisis – lisis espontánea) × 100; porcentaje de lisis espontánea = (lisis espontánea – señal de fondo) / (máxima lisis – señal de fondo) × 100. Esta medida se correlaciona directamente con la cantidad de células

lisadas. La actividad citotóxica se consideró ausente cuando en todas sus ratios sus valores eran iguales o inferiores a 0%, y disminuida cuando en todas sus ratios existía una disminución en comparación con su control sano.

Además de la determinación de la actividad citotóxica NK en situación basal, se realizaron estudios funcionales de citotoxicidad tras estimulación de las células NK con IL-15, R&D Systems, 10 ng/ml durante la noche, y bloqueo en las células NK de la proteína de superficie FasL con Anti-human FasL/THFS6 goat IgG, R&D Systems, a una concentración final de 5 ng/ml.

Estadística

Todos los experimentos se realizaron con un control sano de la misma edad. La actividad citotóxica NK se expresó en porcentajes. El aumento de la citotoxicidad NK tras estimulación con IL-15 y la disminución tras el bloqueo de FasL se expresaron en porcentajes respecto a la actividad citotóxica basal. Se realizaron test no paramétricos para determinar las variables epidemiológicas, así como las diferencias entre las medias de la actividad citotóxica en los diferentes grupos. Se consideraron significativas diferencias inferiores a $p < 0,05$.

Resultados

Pacientes

Un total de 9 pacientes, 6 niños y 3 niñas, fueron diagnosticados de SH primarios (7 formas familiares y 2 pacientes que presentaron reactivación del cuadro hemofagocítico tras suspender el tratamiento, y con actividad NK disminuida persistentemente). Cuatro de los pacientes con formas familiares presentaron mutaciones en PRF-1 –2 con homocigosis y otros 2 con doble heterocigosis–, otro paciente presentó mutación en homocigosis en UNC13D y un polimorfismo en UNC13D, y otro tenía doble mutación en heterocigosis en UNC13D y STXBP2. Un total de 11 pacientes, 7 niños y 4 niñas, fueron diagnosticados de SH secundarios. En estos pacientes los SH fueron secundarios a una infección grave por VZV en un paciente, 3 estaban asociados a inmunodeficiencias –un paciente tenía enfermedad granulomatosa crónica e infecciones de repetición, otro paciente presentaba síndrome hiper-IgM, y otro, un síndrome de IPEX (ambos cuadros hemofagocíticos aparecieron en el seno de sendas complicaciones postrasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico)–, en 3 pacientes aparecieron como complicaciones tras un trasplante multivisceral –2 complicaciones infecciosas y un paciente diagnosticado de linfoma T periférico–, y un paciente mostraba hemimegaencefalia y encefalopatía epiléptica en tratamiento con fármacos anti-epilépticos. En 3 pacientes no se encontró causa secundaria.

Un total de 10 pacientes, 5 niños y 5 niñas, no reunieron los criterios suficientes para el diagnóstico de SH. En estos pacientes, los diagnósticos fueron relacionados con infecciones en 5 casos (citomegalovirus, leishmaniasis visceral, sepsis estafilocócica en paciente con histiocitosis de células de Langerhans diseminada, tuberculosis pulmonar en paciente con enfermedad granulomatosa crónica y meningitis de repetición en paciente con síndrome de la hendidura

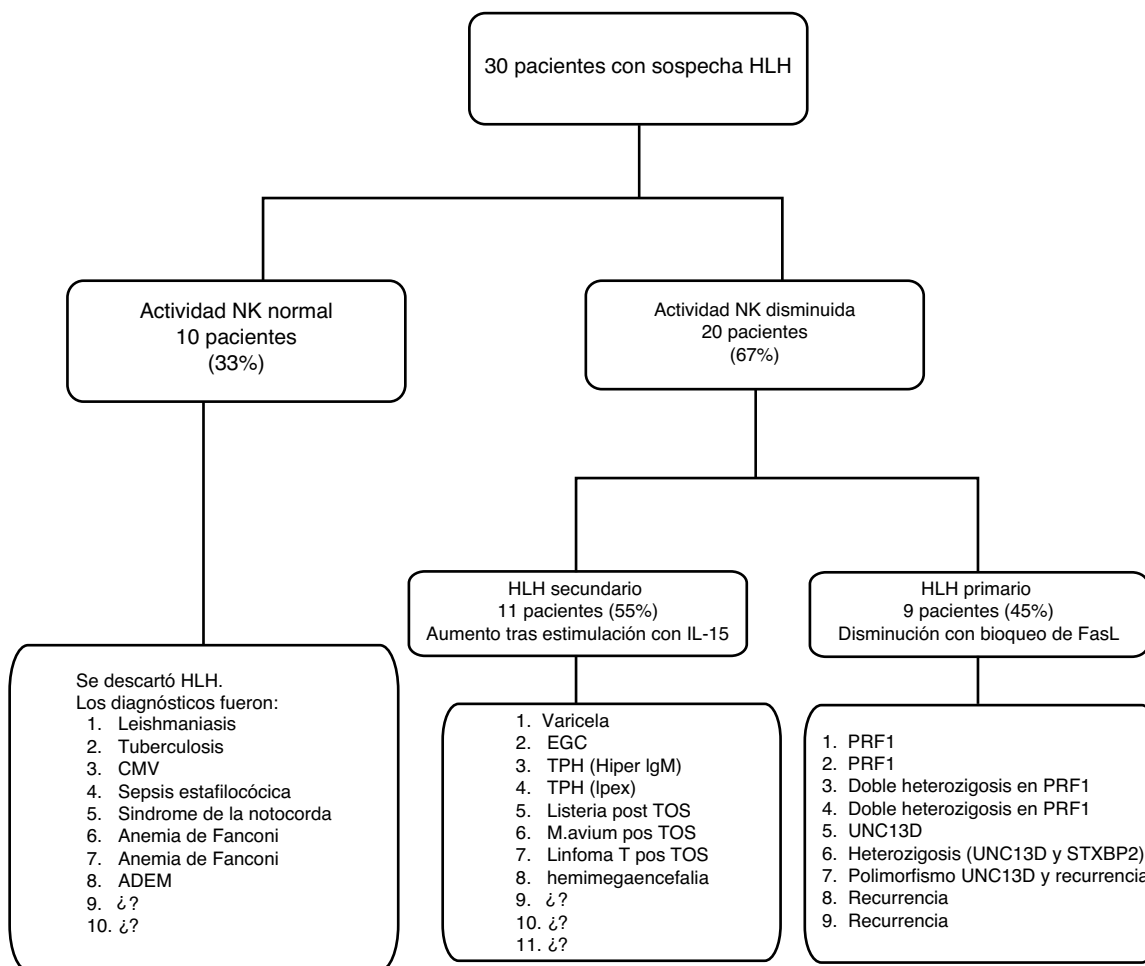


Figura 1 Algoritmo diagnóstico de nuestra serie de pacientes con sospecha de síndrome hemofagocítico.

de la notocorda), en 2 pacientes, con anemia de Fanconi, en otro, con encefalitis aguda diseminada autoinmune, y en 2 pacientes no se encontró la causa (fig. 1). La edad mediana de los pacientes fue de 4 años (rango: 2 meses-22 años). No hubo diferencias en la edad entre los diferentes grupos diagnósticos, sin embargo, sí se encontraron diferencias en cuanto al sexo de los niños, siendo tanto los SH primarios como los secundarios más frecuentes en niños que en niñas (tabla 1).

De los pacientes con SH primario, 7 (77%) recibieron un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) alogénico de sangre periférica. En un caso el donante fue un

hermano HLA idéntico, en otro caso el donante fue el padre, HLA parcialmente idéntico, en otro caso el donante fue haploidéntico, y en los 4 casos restantes fueron no relacionados HLA idénticos). Un total de 2 (33%) pacientes con diagnóstico de SH primario no pudieron trasplantarse por no presentar remisión clínica del SH. De los pacientes trasplantados, 4 (58%) han fallecido, 2 de ellos por complicaciones derivadas del TPH y 2 por reactivación de la enfermedad, y 3 (42%) pacientes están vivos y sin enfermedad, con quimerismo mixto hematopoyético.

De los pacientes con diagnóstico de SH secundario, 3 (28%) recibieron tratamiento con el protocolo HLH-2004

Tabla 1 Diferencias clínicas y de actividad citotóxica entre los diferentes grupos de pacientes de nuestra serie: síndromes hemofagocíticos primarios, secundarios y sin síndrome

	SH primario (n = 9)	SH secundario (n = 10)	No SH (n = 10)	p
Edad (años)	4	6	5	ns
Relación niño/niña	2	5	1	< 0,05
Disminución porcentaje NK (%)	12	50	40	< 0,05
Citotoxicidad NK (%)	7	8	28	< 0,001
Aumento citotoxicidad NK estimuladas IL-15 (%)	56	276	80	< 0,001
Disminución citotoxicidad NK bloqueando con FasL (%)	48	15	8	< 0,001

FasL: Fas ligando; IL: interleucina; NK: linfocito natural killer; ns: no significativo; SH: síndrome hemofagocítico.

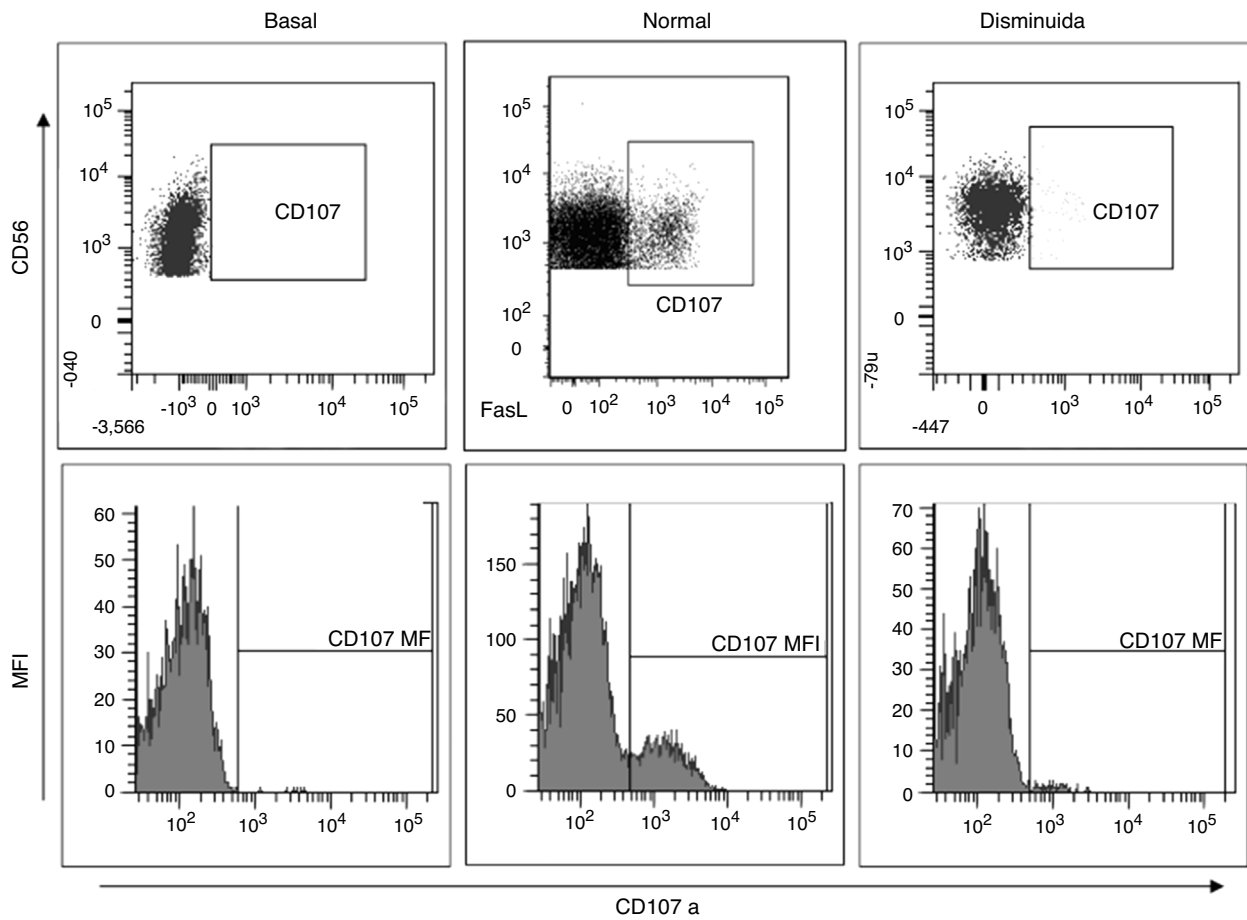


Figura 2 Ensayo de degranulación, expresión de CD107a: situación basal, control normal, paciente con diagnóstico genético de mutación en UNC13D (síndrome hemofagocítico familiar tipo 3).

durante 8 semanas, 5 (45%) recibieron tratamiento con corticoides y/o inmunosupresores, 2 (18%), con antibióticos, y uno (9%), tratamiento quimioterápico para su linfoma. En este grupo han fallecido 2 pacientes (síndrome de IPEX y síndrome de hiper-IgM), en el contexto de sendas complicaciones pos-TPH alogénico por su inmunodeficiencia.

Todos los pacientes con otros diagnósticos recibieron tratamiento adecuado a su sospecha clínica, estando todos vivos.

Citometría de flujo del porcentaje de células natural killer y ensayos de degranulación

Todos los pacientes con SH primario y secundario estaban citopénicos. Sin embargo, los porcentajes de células NK variaron entre los diferentes grupos: un paciente (9%) con diagnóstico de SH primario, 5 pacientes (50%) con diagnóstico de SH secundario y 4 (40%) con otros diagnósticos diferentes a SH presentaron un porcentaje de células NK disminuido; estas diferencias fueron estadísticamente significativas (tabla 1). Todos los controles presentaron una cifra normal de células NK. Los ensayos de degranulación se realizaron en los pacientes con actividad NK disminuida, siendo patológica en 3 pacientes (15%). Estas personas posteriormente fueron diagnosticadas de SH primario con mutaciones

en homocigosis UNC13D, polimorfismo en UNC13D y doble heterocigosis en UNC13D y STXBP2 (fig. 2).

Citotoxicidad de las células natural killer

En 20 pacientes (67%) se observó una disminución de la citotoxicidad de las células NK en comparación con sus controles (16 vs. 50%, 10 vs. 38%, 5 vs. 28%, 4 vs. 15%) en las diferentes ratios E/T (fig. 3a y tabla 1). Todos estos pacientes fueron diagnosticados de SH. No hubo diferencias entre las formas primarias y secundarias, ni entre pacientes sin diagnóstico de SH y controles sanos.

En un total de 10 pacientes (33%) la citotoxicidad NK fue normal. Ninguno de estos pacientes fue diagnosticado de SH al no cumplir los criterios diagnósticos.

La estimulación con IL-15 aumentó la actividad citotóxica de las células NK en todos los grupos. Sin embargo, este aumento fue significativamente mayor en los pacientes con formas secundarias respecto a los pacientes con formas primarias, los pacientes sin diagnóstico de SH y los controles sanos (276, 56, 80 y 80%, respectivamente; fig. 3a y tabla 1).

Tras comprobar la expresión de Fas en la línea K562 (fig. 4) se realizaron los experimentos de bloqueo de FasL sobre las células efectoras. El bloqueo de FasL en las células NK disminuyó significativamente la citotoxicidad en los

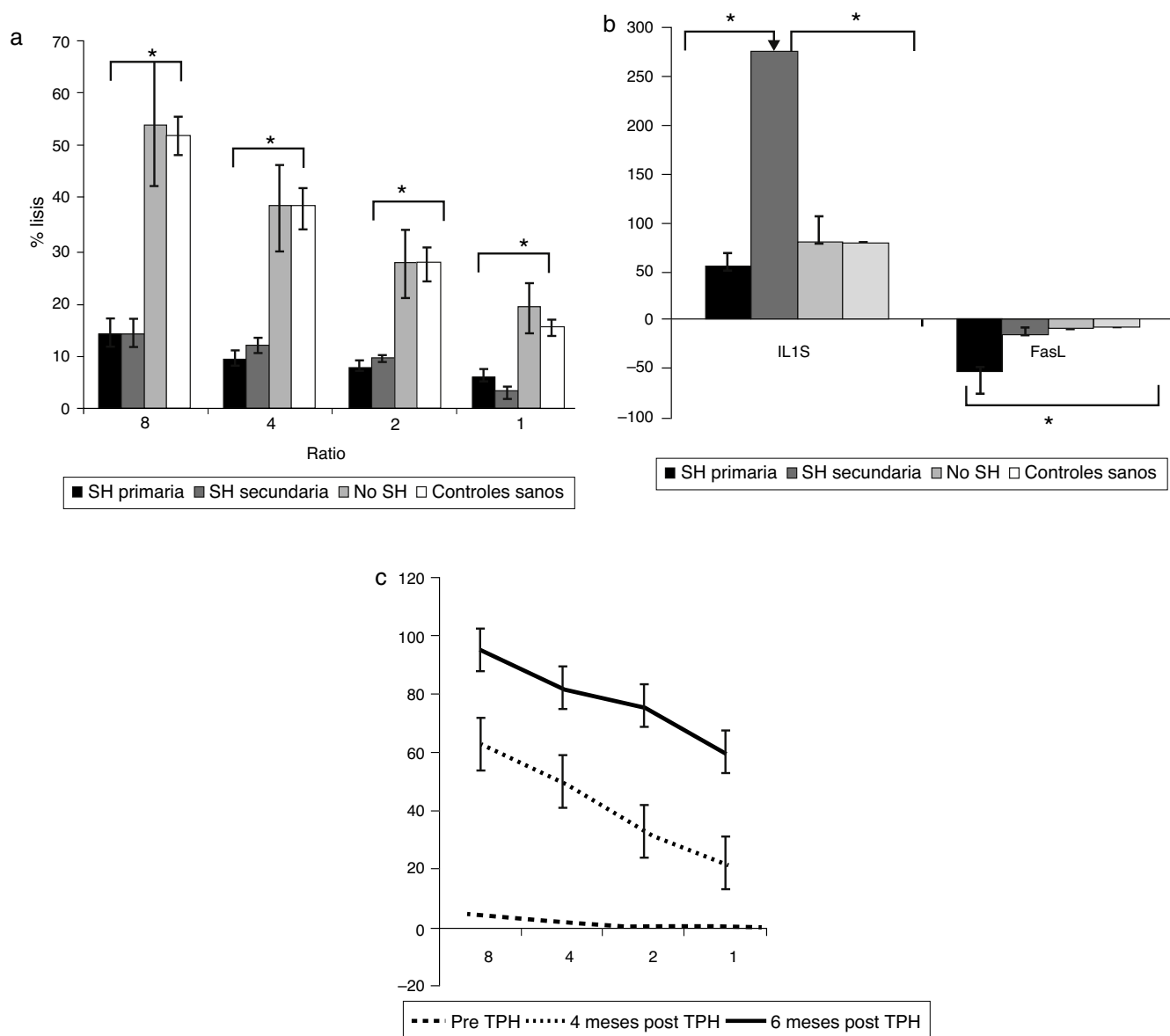


Figura 3 Actividad citotóxica de las células NK frente a la línea celular K562 en los pacientes con diagnóstico de síndrome hemofagocítico primario, secundario, sin diagnóstico de síndrome hemofagocítico y sus controles sanos en: a) situación basal, a ratio E/T 8/1, 4/1, 2/1 y 1/1; b) tras estimulación con IL-15, ratio E/T 8:1, y tras el bloqueo de FasL, ratio E/T 8:1, y c) evolución postrasplante, 4 y 6 meses, de la actividad citotóxica de las células NK en 2 pacientes trasplantados con síndrome hemofagocítico familiar tipo 2.

pacientes con diagnóstico de SH primario respecto a los pacientes con SH secundario, los pacientes sin diagnóstico de SH y los controles sanos (48, 15 y 8 y 5%, respectivamente) (fig. 3b y tabla 1).

En 2 pacientes que recibieron TPH comprobamos, además, cómo la actividad NK se recuperaba progresivamente tras el TPH (fig. 3c). Ambos pacientes presentaban quimismo mixto hematopoyético.

Discusión

La disminución de la actividad citotóxica de las células NK constituye una herramienta diagnóstica importante en el

diagnóstico de los SH. En nuestra serie todos los pacientes con SH tuvieron esta prueba alterada, y todos los pacientes sin diagnóstico de SH tuvieron la citotoxicidad NK normal. Este hallazgo pone de manifiesto cómo en presencia de síntomas evidentes de SH la actividad citotóxica NK permite corroborar el diagnóstico, tal y como describen otras series recientes^{14,15}. Sin embargo, nuestros datos además muestran que ante la sospecha diagnóstica de SH una actividad citotóxica normal excluye este diagnóstico, estableciendo un gradiente de inflamación entre diferentes entidades nosológicas en el que los SH y la actividad citotóxica NK constituyen su estadio final¹⁶. A pesar de la importancia de la actividad citotóxica de las células NK es llamativo cómo todavía muchas series en la literatura no incluyen

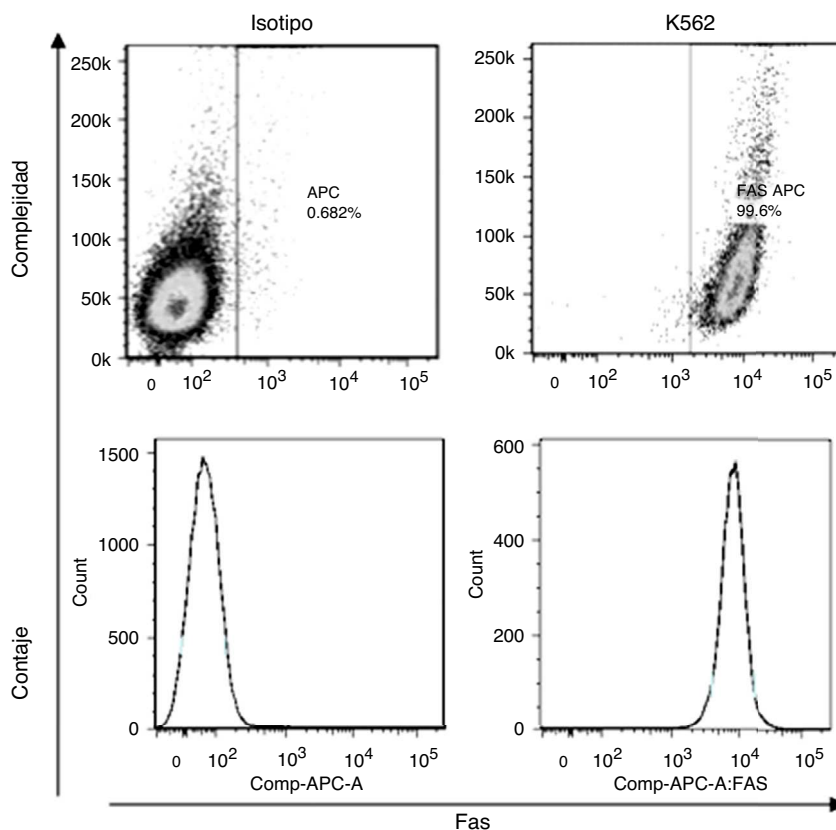


Figura 4 Expresión de Fas en la línea celular K562 y FasL en células NK estimuladas con IL-15.

esta prueba diagnóstica en las series de SH¹⁷⁻¹⁹. La explicación probablemente se encuentre en la limitación que las pruebas de citotoxicidad con radioactividad representan para la mayoría de los grupos clínicos. En nuestra experiencia la actividad citotóxica NK puede determinarse de una manera rápida, sencilla y segura mediante fluorescencia resuelta en el tiempo, permitiendo universalizar esta técnica en los laboratorios de la mayoría de los centros hospitalarios¹¹⁻¹³. La sencillez de esta técnica es extrapolable a la recientemente reportada mediante citometría de flujo multiparamétrica^{20,21}.

En nuestro trabajo, además, describimos un comportamiento fenotípico y funcional diferente entre las formas primarias y secundarias de los SH. En nuestra serie, la mayoría de los pacientes con SH primario presentaron un porcentaje de células NK en sangre periférica normal, con una actividad citotóxica disminuida incluso tras estimulación con IL-15, y donde la vía alternativa Fas-FasL fue muy importante ya que al bloquearla disminuyó drásticamente la citotoxicidad residual. Estos datos contrastan significativamente con el perfil hallado en los pacientes diagnosticados de SH secundarios, donde en la mayoría de los pacientes el porcentaje de células NK en sangre periférica y la citotoxicidad NK estuvieron disminuidos, recuperándose esta última tras la estimulación con IL-15, y donde el bloqueo de FasL sobre las células NK no afectó la citotoxicidad final. Este hecho pone de manifiesto diferentes mecanismos fisiopatológicos implicados en la regulación de la citotoxicidad de las células NK en los SH, algunos de ellos descritos recientemente^{22,23}. El predominio de la vía

alternativa observada en nuestra serie en los pacientes con SH primarios podría relacionarse con la elevada presencia en el suero de estos pacientes de la proteína FasL, tal y como está reportado¹⁰. La fisiopatología de los SH secundarios es menos conocida. La disminución del porcentaje de las células NK en sangre periférica muestra cómo esta población persigue algún estímulo fuera del torrente sanguíneo, donde son retenidas, reverberando el estímulo inflamatorio, que finalmente energiza su capacidad citotóxica²³. Cuando realizamos la actividad citotóxica NK in vitro desaparecen estos estímulos reguladores, y la estimulación con IL-15 incrementó la citotoxicidad, en ausencia de defecto genético^{23,24}.

Las limitaciones de los estudios genéticos han impulsado el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas para diferenciar las formas primarias de las secundarias²⁵⁻²⁷. A este respecto nuestro trabajo aporta nuevos datos basándose en los defectos funcionales de los SH. Además, en las formas primarias la alteración de la citotoxicidad NK está presente incluso antes de que aparezcan los síntomas, y no se recupera después de iniciado el tratamiento, incluso con mejoría clínica. Solo el TPH normalizará la actividad citotóxica de las células NK, tal y como mostramos en nuestro trabajo²⁷⁻³⁰. Sin embargo, la disminución de la actividad citotóxica NK en las formas secundarias de SH mejorará progresivamente al iniciar el tratamiento, acompañado de la mejoría clínica. Por lo tanto, la monitorización de la citotoxicidad NK mediante técnicas funcionales puede ayudarnos también al diagnóstico diferencial^{9,30}.

Pese a que en nuestra serie constituye una prueba muy consistente para el diagnóstico de los SH, la

actividad citotóxica de las células NK tiene algunas limitaciones diagnósticas³⁰. Por ejemplo, existen otras enfermedades que se caracterizan por tener alterada la actividad NK, como el cáncer y enfermedades autoinmunes³¹. En este sentido, en nuestro trabajo no presentamos ningún paciente con SH secundario a enfermedades reumáticas. También hay formas primarias con actividad citotóxica NK normal, fundamentalmente en sus estadios iniciales, asintomáticos, o con genéticas no clásicas, como la observada en pacientes adultos^{30,32,33}.

A pesar de las limitaciones mencionadas, con este trabajo proponemos la actividad citotóxica NK como una herramienta diagnóstica sencilla y eficaz cuando existe sospecha clínica de SH, y mostramos cómo una adecuada interpretación de esta prueba funcional puede ayudarnos a diagnosticar y diferenciar las formas primarias de las secundarias mientras esperamos a obtener el diagnóstico genético, además de permitirnos valorar la evolución y la respuesta al tratamiento.

Conflicto de intereses

Los autores no presentan ningún conflicto de interés.

Agradecimientos

A los pacientes y sus familias.

Bibliografía

- Henter JI, Horne A, Arico M, Egeler RM, Filipovich AH, Imshuku S, et al. HLH 2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48:124–31.
- Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, Schneppenheim R, Kabisch H, Janka G, et al. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: Molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11 and RAB27A. *Hum Mutat*. 2006;27:62–8.
- Ohadi M, Lalloz MR, Sham P, Zhao J, Dearlove AM, Shiach C, et al. Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3-22 by homozygosity mapping. *Am J Hum Genet*. 1999;64:165–71.
- Henter JI, Samuelsson-Horne A, Arico M, Egeler RM, Elinder G, Filipovich AH, et al. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation. *Blood*. 2002;100:2367–73.
- Johnson TS, Villanueva J, Filipovich AH, Marsh RA, Bleesing JJ. Contemporary diagnostic methods for hemophagocytic lymphohistiocytic disorders. *J Immunol Methods*. 2011;364:1–13.
- Montel AH, Bochan MR, Hobbs JA, Lynch DH, Brahma Z. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol*. 1995;166:236–46.
- Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL. Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol*. 1999;163:5358–66.
- Chen M, Felix K, Wang J. Critical role for perforin and Fas-dependent killing of dendritic cells in the control of inflammation. *Blood*. 2012;119:127–36.
- Fadeel B, Orrenius S, Henter JI. Induction of apoptosis and caspase activation in cells obtained from familial haemophagocytic lymphohistiocytosis patients. *Br J Haematol*. 1999;106:406–15.
- 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;91:2793–9.
- Borella P, Bargellini A, Salvioli S, Medici CI, Cossarizza A. The use of non-radioactive chromium as an alternative to ⁵¹Cr in NK assay. *J Immunol Methods*. 1995;186:101–10.
- Nagao F, Yabe T, Xu M, Yokoyama K, Saito K, Okumura K. Application of non-radioactive europium (Eu³⁺) release assay to a measurement of human natural killer activity of healthy and patient populations. *Immunol Invest*. 1996;25:507–18.
- Blomberg K, Hautala R, Lövgren J, Mukkala VM, Lindqvist C, Akerman K. Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J Immunol Methods*. 1996;193:199–206.
- Dapena Díaz JL, Díaz de Heredia Rubio C, Bastida Vila P, Lloret Sales A, Elorza Alvarez I, Olivé Oliveras T, et al. [Haemophagocytic syndrome: A common pathogenic mechanism of various aetiologies]. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71:110–6.
- Wang LL, Hu YX, Chen WF, Xu J, Zhang W, Wu YJ, et al. [Significance of soluble interleukin-2 receptor and NK cell activity in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2012;20:401–4.
- Jessen B, Kögl T, Sepulveda FE, de Saint Basile G, Aichele P, Ehl S. Graded defects in cytotoxicity determine severity of hemophagocytic lymphohistiocytosis in humans and mice. *Front Immunol*. 2013;4:448.
- Karapinar B, Yilmaz D, Balkan C, Akin M, Ay Y, Kvakli K. An unusual cause of multiple organ dysfunction syndrome in the pediatric intensive care unit: Hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Crit Care Med*. 2009;10:285–90.
- Siminas S, Caswell M, Kenny SE. Hemophagocytic lymphohistiocytosis mimicking surgical symptoms and complications: Lessons learned from four cases. *J Pediatr Surg*. 2013;48:1514–9.
- Giri PP, Pal P, Ghosh A, Sinha R. Infection-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: A case series using steroids only protocol for management. *Rheumatol Int*. 2013;33:1363–6.
- Chung HJ, Park CJ, Lim JH, Jang S, Chi HS, Im HJ, et al. Establishment of a reference interval for natural killer cell activity through flow cytometry and its clinical application in the diagnosis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2010;32:239–47.
- Popko K, Malinowska I, Gorska E, Stelmaszczyk-Emmel A, Demkow U. Flow cytometry in detection of abnormalities of natural killer cell. *Adv Exp Med Biol*. 2013;756:303–11.
- Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:515–25.
- Meeths M, Chiang SC, Löfstedt A, Müller ML, Tesi B, Henter JI, et al. Pathophysiology and spectrum of diseases caused by defects in lymphocyte cytotoxicity. *Exp Cell Res*. 2014;325:10–7.
- Pérez-Martínez A. Síndromes hemofagocíticos (I): concepto, clasificación, fisiopatología y clínica. *An Pediatr Contin*. 2013;11:237–44.
- Chiang SC, Theorell J, Entesarian M, Meeths M, Mastafa M, Al-Herz W, et al. Comparison of primary human cytotoxic T-cell and natural killer cell responses reveal similar molecular requirements for lytic granule exocytosis but differences in cytokine production. *Blood*. 2013;121:1345–56.
- Bryceson YT, Pende D, Maul-Pavicic A, Gilmour KC, Ufheil H, Vraetz T, et al. A prospective evaluation of degranulation assays in the rapid diagnosis of familial hemophagocytic syndromes. *Blood*. 2012;119:2754–63.
- Pérez-Martínez A. Síndromes hemofagocíticos (II): diagnóstico y tratamiento. *An Pediatr Contin*. 2013;11:245–53.
- Cooper N, Rao K, Gilmour K, Hadad L, Adams S, Cale C, et al. Stem cell transplantation with reduced-intensity

- conditioning for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2006;107:1233-6.
29. Risma K, Jordan MB. Hemophagocytic lymphohistiocytosis: Updates and evolving concepts. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24:9-15.
30. Janka GE, Lehmborg K. Hemophagocytic lymphohistiocytosis : Pathogenesis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:605-11.
31. Valentín Quiroga J, Fernández Casanova L, Génesis Martín I, Nuñez Martín F, Pérez Martínez A. Kill the killers: terapia con células natural killer en pacientes pediátricos con cáncer refractario. *Sanid Mil*. 2012;68:141-6.
32. Sieni E, Cetica V, Piccin A, Gherlinzoni F, Sasso FC, Rabusin M, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis may present during adulthood: Clinical and genetic features of a small series. *PLoS One*. 2012;7:e44649.
33. Shabbir M, Lucas J, Lazarchick J, Shirai K. Secondary hemophagocytic syndrome in adults: A case series of 18 patients in a single institution and a review of literature. *Hematol Oncol*. 2011;29:100-6.