



Tesis Doctoral:

**CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS NK
EN PACIENTES HOSPITALIZADOS POR
SARS-COV-2 EN PANAMÁ.**

Estudiante MD-PhD

Juan Carlos Batista Mojica

Asesores:

Dr. Rodrigo DeAntonio

Dra. Sandra López

2025

Tabla de contenido

Abreviaturas.....	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Capítulo 1. Planteamiento del problema	¡Error! Marcador no definido.
1.1 Aspectos generales	¡Error! Marcador no definido.
Capítulo 2. Marco Teórico.....	18
2.1 Epidemiología de COVID-19	19
2.2 Respuesta inmune y la enfermedad de COVID-19.....	22
2.3 La respuesta inmune innata y las citocinas	24
2.4 Fenotipos de las células NK y sus funciones	36
2.5 Interacción con otras células del sistema Inmunológico	43
2.6 Citometría de Flujo	44
Capítulo 3. Metodología.....	¡Error! Marcador no definido.
3.1 Diseño	50
3.2 Población de estudio	50
3.3 Cálculo de Muestra	50
3.4 Procedimientos.....	50
3.4.1 Fase 1-	51
3.4.2 Fase 2-	52
3.5 Medición de Citocinas	53
3.6 Citometría de flujo	54
3.7 Gating Strategy propuesto.....	56
3.8 Análisis estadístico	60
Capítulo 4. Resultados.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1 Caracterizar el fenotipo de las células NK para tener una descripción general de la población de linfocitos NK implicados en la respuesta temprana a la infección de los pacientes hospitalizados.....	62
4.1.1 Marcador CD25+	66
4.1.2 Marcador CD38 ⁺	68
4.1.3 Marcador CD57+	71

.....	72
4.1.4 Marcador CD69+	73
4.1.5 Marcador CD95+	74
4.1.6 Marcador CD197+	76
4.1.7 Marcador CD127+	78
4.1.8 Marcador CD314+	80
4.1.9 Marcador CD27+	82
4.1.10 Marcador CD279+	84
4.1.11 Marcador CD57+	86
4.1.12 Marcador CD183+	88
4.2 Determinación de biomarcadores de mayor expresión en las células NK para indicar asociación de severidad de la enfermedad por SARS-COV-2.	91
4.2.11 Marcador CD38+	112
4.3 Comparación de los distintos fenotipos de células NK en las poblaciones de pacientes hospitalizados por COVID-19 permite comparar los eventos de severidad vinculados a la infección.....	117
Capítulo 5. Discusión	¡Error! Marcador no definido.
Capítulo 6. Conclusiones.....	¡Error! Marcador no definido.
7. Referencias	139
8. Anexo	158

Índice de Figuras

Figura 1	Activación descontrolada de cascada inflamatoria en sepsis	26
Figura 2	Interacción entre el virus SARS-CoV-2 y la respuesta inmune	28
Figura 3	Porcentaje de linfocitos en pacientes.....	30
Figura 4	Mecanismo de citotoxicidad por las células NK	34
Figura 5	Desarrollo de las células NK	36
Figura 6	Expresión de marcadores en las células NK.....	38
Figura 7	Células NK, Citocinas y otros grupos de células	44
Figura 8	Células polimorfonucleares en sangre periférica (PBMC)	45
Figura 9	Citometría de Flujo	46
Figura 10	Incidencia del láser muestra el tamaño y complejidad celular	47
Figura 11	Histograma y Dot Plot	48
Figura 12	Análisis de Citocinas	53
Figura 13	Láseres fundamentales	55
Figura 14	Gating Strategy	57
Figura 15	Células población total nk	62
Figura 16	de células NK	63
Figura 17	Concatenación de todas las células NK	64
Figura 18	Concatenación de todas las células NK.....	66
Figura 19	Intensidad de expresión de CD25	67
Figura 20	Concatenación de todas las células NK.....	68
Figura 21	Comparación de células NK CD16+CD56+CD38+.....	69
Figura 22	Comparación de Células NK CD16+ CD56+ dim vs bright CD38	70
Figura 23	Comparación de Células NK CD16+ CD56+ CD57+.....	72
Figura 24	Comparación de Células NK CD16+ CD56+ dim vs bright CD57	72
Figura 25	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD69+.....	73
Figura 26	Células NK CD16+ CD56+CD69+.....	75
Figura 27	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD95+.....	76
Figura 28	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD197+	77
Figura 30	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD197+	78
Figura 31	Células NK TOTAL CD16+ CD56+CD127+	79
Figura 32	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD127+	80
Figura 33	Células NK CD16+ CD56+CD314.....	81
Figura 34	Comparación Células NK CD16+ CD56+CD314+	82
Figura 35	Células NK CD16+ CD56+CD27+.....	83
Figura 36	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD27+.....	84
Figura 37	Células NK CD16+ CD56+CD279+	85
Figura 38	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD279+	86
Figura 39	Células NK CD16+ CD56+CD57+	87
Figura 40	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD57+.....	87
Figura 41	Células NK CD16+ CD56+CD183+	89
Figura 42	Comparación de Células NK CD16+ CD56+CD183+	90

Figura 43	Mapa de calor de clusters celulares Células CD16+CD56+.....	92
Figura 44	UMAP DE CÉLULAS CD16+CD56dim	94
Figura 45	Clústeres de FLOWSOM DE CÉLULAS CD16+CD56dim. Mapa de calor	95
Figura 46	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim CD314 clúster 11.....	96
Figura 47	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim clúster 15.....	97
Figura 48	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim clúster 14 y clúster 1	98
Figura 49	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim clúster 9.....	99
Figura 50	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim CD279.....	101
Figura 51	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim clúster 4.....	102
Figura 52	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim clúster 9.....	104
Figura 53	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim clúster 14.....	105
Figura 54	Comparación UMAP de Células CD16+CD56dim clúster 9	107
Figura 55	mapa de calor CD16+CD56bright clúster 9.....	108
Figura 56	Comparación UMAP de Células CD16+CD56bright.....	109
Figura 57	Comparación UMAP de Células CD16+CD56bright clúster 1,5 y 9.....	110
Figura 58	Comparación UMAP de Células CD16+CD56bright clúster 2 Y 9.....	111
Figura 59	Comparación UMAP de Células CD16+CD56bright clúster 2.....	112
Figura 60	Comparación UMAP de Células CD16+CD56bright clúster 3.....	113
Figura 61	Comparación UMAP de Células CD16+CD56bright clúster 9 y 13.....	115
Figura 62	Comparación UMAP de Células CD16+CD56bright clúster 2 y 9	116

Índice de Tablas

Tabla 2	Subpoblación fenotípicas y funcionales de células NK	32
Tabla 3	Valores de MFI elevados y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos .	119
Tabla 4.	Valores de MFI elevadas y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos .	120
Tabla 5.	Valores de MFI elevados y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos	121
Tabla 6	Valores de MFI elevados y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos	122
Tabla 8	Valores de MFI elevados y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos CD314	127
Tabla 9 .	Valores de MFI elevados y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos .	129
Tabla 10.	Valores de MFI elevados y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos CD95	130
Tabla 11.	Valores de MFI elevados y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos CD57	132

Índice de cuadros

Cuadro 1 Categoría y marcadores de superficie de las células	41
Cuadro 2 Criterios para selección de pacientes	51
Cuadro 3 Resumen de la expresión de CD183 según la severidad	121
Cuadro 4 Resumen de la expresión de CD38	125
Cuadro 5. Resumen sobre la expresión de CD314 (NKG2D)	128
Cuadro 6. Resumen sobre la expresión de CD69	129
Cuadro 7 Resumen sobre la expresión de CD69 en los pacientes hospitalizados con COVID-19	131
Cuadro 9 Resumen de la expresión de CD95 en pacientes con COVID-19	132

Índice de gráfico

Gráfico 1	118
Gráfico 2	128

Abreviaturas

CFR: tasa de letalidad por caso

IFR: tasa de letalidad por infección

NK: Natural Killer

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells

PRR: Pattern Recognition Receptor

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

Resumen

La pandemia por SARS-CoV-2 constituyó uno de los mayores retos sanitarios del siglo XXI, con impacto clínico y socioeconómico global. En este contexto, la respuesta inmune innata desempeñó un papel decisivo en la evolución clínica de los pacientes, destacando las células asesinas naturales (NK) como elementos centrales en el control inicial de la infección y la modulación de la inflamación. Sin embargo, la evidencia científica sobre su participación en la infección por COVID-19 era aún limitada, particularmente en poblaciones latinoamericanas. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar los fenotipos y funciones de las células NK en pacientes hospitalizados por COVID-19 en Panamá, y evaluar su asociación con la severidad clínica de la enfermedad. Se realizó un diseño analítico exploratorio de datos secundarios provenientes de protocolos aprobados por el Comité Nacional de Bioética de Investigación. La cohorte incluyó pacientes hospitalizados en el Hospital Santo Tomás y hospitales de la Caja de Seguro Social, de quienes se obtuvieron muestras de sangre periférica para el aislamiento de PBMC, la medición de citocinas y la caracterización inmunofenotípica mediante citometría de flujo multicolor. Los resultados revelaron alteraciones fenotípicas significativas en las subpoblaciones NK CD56bright y CD56dim, con cambios en la expresión de receptores activadores (como NKG2D/CD314+) así como en marcadores asociados a citotoxicidad y apoptosis (CD95⁺, CD57⁺). Estas modificaciones se correlacionaron con perfiles clínicos de severidad y con niveles elevados de citocinas proinflamatorias, entre ellas IL-6 e IL-8.

En conclusión, la investigación aporta evidencia de que las células NK constituyen un biomarcador potencial de evolución clínica en pacientes hospitalizados con COVID-19, cuyo fenotipo puede reflejar tanto mecanismos de protección como de disfunción inmunológica. Estos hallazgos contribuyen a comprender mejor la inmunopatogénesis del SARS-CoV-2 en la población panameña y podrían orientar futuras estrategias terapéuticas y predictivas basadas en la inmunidad innata.

Abstract

The COVID-19 pandemic posed a major global health challenge with severe clinical and socioeconomic impacts. Innate immunity, particularly natural killer (NK) cells, plays a crucial role in early viral control and inflammatory modulation, yet their contribution to SARS-CoV-2 infection remains poorly described in Latin American populations. This study aimed to characterize NK cell phenotypes and functions in hospitalized COVID-19 patients in Panama and assess their association with disease severity. An exploratory analytical design was conducted using secondary data from approved clinical protocols. Peripheral blood samples from patients admitted to Hospital Santo Tomás and Social Security hospitals were analyzed. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated, cytokines measured, and NK subsets immunophenotyped by multicolor flow cytometry. Results showed marked alterations in NK CD56bright and CD56dim subsets, including changes in activating receptors (NKG2D/CD314⁺) and cytotoxic/apoptotic markers (CD95⁺, CD57⁺). These immune changes correlated with severity and elevated pro-inflammatory cytokines, notably IL-6 and IL-8. In conclusion, NK cells emerge as potential biomarkers of COVID-19 progression, reflecting both protective and dysfunctional responses. These findings improve understanding of SARS-CoV-2 immunopathogenesis in Panama and may inform future predictive and therapeutic strategies targeting innate immunity.

Introducción

A finales del año 2019 surgió un nuevo coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo asociado a neumonía causado por un beta-coronavirus, SARS-CoV-2, en Wuhan, China (*Hou et al., 2020*). El SARS-CoV-2 fue identificado como la causa patogénica de la enfermedad inducida por Coronavirus SARS-CoV-2, COVID-19, caracterizado por su propagación rápida, y ha representado grandes cambios en la salud y a nivel socioeconómico (*Wu et al., 2020*) comparándose con SARS-CoV-1 en el 2003 y MERS en el 2012 (*Coutard et al., 2020*). La infección por COVID-19 provoca una compleja respuesta inmunológica innata, en la que tanto las alteraciones de citocinas proinflamatorias como las alteraciones de las células NK juegan un papel crucial en el avance de la enfermedad. Estos elementos no solo están vinculados, sino que su análisis conjunto es crucial para comprender los procesos que subyacen a la variabilidad en la susceptibilidad y severidad del COVID-19. A pesar de los progresos, todavía existen elementos por aclarar, particularmente en cómo estas modificaciones inmunológicas afectan los diferentes fenotipos de la enfermedad.

La variabilidad en la susceptibilidad al COVID-19 y la gravedad de la enfermedad dependen de factores tanto virales como del huésped, incluyendo características inmunológicas y epigenéticas (*Ovsyannikova et al., 2020*). La estructura del SARS-CoV-2 y sus mecanismos patogénicos como la tormenta de citocinas y el síndrome de dificultad respiratoria aguda explican su rápida propagación y severidad (*X. Li et al., 2024*). El sistema inmunológico, influenciado por factores ambientales y modificaciones epigenéticas, juega un papel central en la respuesta al virus. Alteraciones en este equilibrio pueden llevar a una inflamación descontrolada o a una mayor susceptibilidad a infecciones. Citoquinas como IL-6, IL-17 e IL-23 son clave en la coordinación de la inmunidad innata y adaptativa (*Ruth, 2024*), y su

desregulación contribuye a los fenotipos clínicos heterogéneos del COVID-19 (*Ruth, 2024*). El desarrollo de la enfermedad en cada paciente es distinto, los cambios entre la mayoría de los parámetros clínicos estudiados varían entre cada uno de ellos. En un estudio publicado por Huang, C. et al., 2020; describió las características epidemiológicas, clínicas y de laboratorios en pacientes ingresados en el hospital donde los recuentos sanguíneos de los pacientes al ingreso mostraron leucopenia (recuento de glóbulos blancos menor de $4 \times 10^9 / L$; 10 [25%] de 40 pacientes) y linfopenia. (recuento de linfocitos $<1 \cdot 0 \times 10^9 / L$; 26 [63%] pacientes) (*Huang et al., 2020*). El Desarrollo de la enfermedad en cada paciente es diferente, las variaciones entre la mayoría de los parámetros clínicos analizados difieren entre cada uno. La respuesta inmunitaria del huésped al SARS-CoV-2 parece desempeñar un papel clave en la patogénesis de la enfermedad y las manifestaciones clínicas, y los linfocitos asesinos naturales (NK) se encuentran entre los objetivos de la regulación inducida por el virus y las citocinas. Esto destaca la importancia de entender mejor cómo las células NK responden durante la infección inicial y cómo pueden influir en el curso de la enfermedad en pacientes con SARS-CoV-2 (*Tan et al., 2020*). Las células NK son inhibidas y activadas por receptores que reconocen distintos tipos de proteína, como por ejemplo las moléculas de MHC de clase I expresadas por células sanas, y generalmente están protegidas de lisis (*Ben-Shmuel et al., 2022; Smyth et al., 2005*).

Cómo las células NK impactan la respuesta inmune asociada a la progresión de la enfermedad en los pacientes hospitalizados por SARS-COV- 2. El objetivo es caracterizar el fenotipo y la función de las células NK, y su regulación, en pacientes hospitalizados por COVID-19 en los principales hospitales de la Ciudad de Panamá, para evaluar su asociación con la severidad de la enfermedad. Panamá, como parte de los países afectados por la

pandemia de COVID-19, presentó una tasa de pruebas por habitante elevada y, en consecuencia, se reportó un número más elevado de casos detectados (*Loaiza et al., 2020*). Sin embargo, las investigaciones a nivel nacional fueron limitadas en el contexto clínico y epidemiológico, y no se ha descrito la respuesta inmune innata y el rol de las células NK en la infección por SARS-CoV-2 en pacientes infectados.

A nivel nacional, no existen estudios que abordan la respuesta inmunológica innata en pacientes con COVID-19, especialmente el papel de las células NK, y no poseen una descripción clínica exhaustiva. Esta brecha restringe el entendimiento de cómo estos procesos afectan la evolución de la enfermedad y la diversidad de los resultados clínicos. Por lo tanto, este trabajo de investigación se enfoca en esclarecer el rol de las células NK y su relación con otros elementos de la inmunidad innata (como las citocinas) en pacientes infectados por SARS-CoV-2, con la finalidad de proporcionar pruebas clínicas significativas para la gestión y predicción de la patología.

Capítulo 1. Planteamiento del problema

1.1 Aspectos generales

El SARS-CoV-2, coronavirus humano de origen zoonótico detectado en Wuhan (China) a finales de 2019, provocó la pandemia de COVID-19. A pesar de que se presume que su transmisión inicial tuvo lugar desde un reservorio animal, la cadena precisa de contagio hacia el ser humano aún no ha sido revelada (*Pagani et al., 2020*). El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró una emergencia de salud pública internacional debido a su elevada capacidad de propagación. Este virus es el tercer coronavirus en dos décadas vinculado a síndromes respiratorios severos en seres humanos, destacando su importancia epidemiológica y la exigencia de supervisión constante.

Antes del SARS-CoV-2, cuatro coronavirus humanos (HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1 y HCoV OC43) causaban síntomas de resfriado. Entre ellos, el HCoV 229E y el HCoV NL63 son alfa-coronavirus, mientras que el HCoV HKU1 y el HCoV OC43 son beta-coronavirus. A diferencia del SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 altamente patógenos, los cuatro llamados HCoV comunes generalmente causan enfermedades leves de las vías respiratorias superiores y contribuyen al 15%–30% de los casos de resfriados comunes en adultos humanos, aunque a veces pueden ocurrir infecciones graves y potencialmente mortales de las vías respiratorias inferiores. Al secuenciar los primeros coronavirus aislados del SARS-CoV-2, se descubrió que las cepas bat-SL-CoVZXC21 y bat-SL-CoVZC45 eran las más próximas, con un genoma que compartía un 88% de similitud con el SARS-CoV-2 (*Sallard et al., 2021*). Dentro de un marco evolutivo más extenso, el SARS-CoV-2 tiene una estrecha relación con otros coronavirus que infectan a murciélagos, pangolines y otros mamíferos carnívoros. Esto indica que el virus surge de las transmisiones entre especies, un fenómeno denominado zoonosis. La repercusión del SARS-CoV-2 en la salud es de múltiples

aspectos, y la gravedad clínica varía en función de la edad, el género y las complicaciones. Los estudios señalan que los adultos mayores, especialmente los varones, muestran índices más elevados de enfermedad grave y mortalidad. Las comorbilidades, como la obesidad, la diabetes y la enfermedad renal, agravan significativamente la gravedad de la COVID-19, lo que lleva a un aumento de las tasas de hospitalización y mortalidad (*Carvacho et al., 2022*). Los grupos de mayor edad, en particular los que tienen más de 65 años, corren mayor incidencia de neumonía grave (el 31% frente al 12,6%) y de enfermedades graves (el 16% frente al 5,8%) en comparación con los pacientes más jóvenes (*Üçsular et al., 2022*). Según el género, los hombres tienen más probabilidades de sufrir enfermedades graves en comparación con las mujeres, y el riesgo aumenta con la edad (*Camacho Moll et al., 2023*). Esta desigualdad podría tener vínculos con variaciones biológicas en la respuesta del sistema inmunológico y la prevalencia de comorbilidad. Las comorbilidades influyen significativamente en las tasas de mortalidad, y los hombres mayores suelen presentar múltiples problemas de salud que agravan situación de COVID-19 (*Sinvani et al., 2021*). Parámetros de laboratorios como la disminución de linfocitos puede predecir la gravedad en COVID-19, al reportar el recuento absoluto de linfocitos pudiese estar correlacionado con mayor riesgo de ingreso a UCI, necesidad de ventilación mecánica y elevada mortalidad hospitalaria (*Tan et al., 2020*). Los mecanismos propuestos que podrían estar relacionados con la regulación directa de los linfocitos, así como su capacidad para destruir el virus mediante respuestas citotóxicas y la apoptosis acelerada inducida por citocinas proinflamatorias, continúan siendo objeto de investigación y debate en la comunidad científica. Se ha observado que, durante la infección por SARS-CoV-2, la disminución significativa de linfocitos, en particular de las células NK, puede estar vinculada a una

respuesta inmunitaria desregulada, lo que contribuye a la progresión de la enfermedad hacia formas más graves. Las citocinas, entre ellas la IL-6, IL-10 y TNF- α , desempeñan un papel crucial en la modulación de la respuesta inflamatoria, y sus niveles elevados han sido asociados con el síndrome de tormenta de citocinas, que agrava el daño pulmonar y sistémico en personas con COVID-19. Además, la apoptosis acelerada de linfocitos inducida por el entorno inflamatorio puede limitar la eficacia del sistema inmunitario para contener la infección viral (*Hasichaolu et al., 2020; Tan et al., 2020*). La complejidad del impacto del SARS-CoV-2 sobre la salud pública radica en la amplia gama de desenlaces clínicos y en cómo la interacción entre factores genéticos, epigenéticos, ambientales y sociales contribuye a la heterogeneidad de la enfermedad.

Por otro lado, la variabilidad observada en la evolución clínica de COVID-19 entre distintas poblaciones resaltó la importancia de incorporar enfoques multidisciplinarios que incluyan la vigilancia epidemiológica, el análisis genético y la caracterización inmunológica de los pacientes (*Romagnoli et al., 2020*). Estos elementos permitieron identificar factores de riesgo, optimizar recursos y diseñar intervenciones más precisas, tanto a nivel individual como comunitario. Esta perspectiva integral es esencial para avanzar hacia una mejor gestión de futuras emergencias sanitarias, fortaleciendo la resiliencia de los sistemas de salud y promoviendo un enfoque preventivo basado en la evidencia científica (*Van Damme et al., 2020*). Aún se exploran estrategias terapéuticas que buscan restaurar el equilibrio inmunológico mediante la regulación de las citocinas y el fortalecimiento de la función de las células NK. Sin embargo, falta comprender cómo estos procesos interactúan y afectan tanto la evolución clínica como el pronóstico en pacientes infectados por SARS-CoV-2. La profundización en estos mecanismos es fundamental para desarrollar intervenciones dirigidas

que mejoren los resultados en personas afectadas por COVID-19, especialmente en grupos vulnerables y con comorbilidades asociadas.

Capítulo 2. Marco Teórico

2.1 Epidemiología de COVID-19

La pandemia de COVID-19 tiene una epidemiología compleja que ha variado significativamente entre países y grupos de población. Comenzó en China en diciembre de 2019 y se extendió rápidamente por todo el mundo. Se observaron conglomerados de brotes en Japón, Corea del Sur, Irán, Italia, España y Estados Unidos (*Di Gennaro et al., 2020*). La transmisión se vio facilitada por los viajes de personas infectadas, principalmente empresarios y turistas. Se extendió a lo largo de las conexiones aéreas de todo el mundo principalmente a países de altos ingresos con conexiones internacionales. La transmisión comunitaria comenzó en Japón, Corea del Sur e Irán, lo que resultó en miles de casos fuera de China. La propagación posterior ocurrió en Europa y la costa este de los Estados Unidos. Se estimó que el número básico de reproducción R_0 estuvo entre 1,4 y 3,8 y que la transmisión en Asia, Europa y América del Norte probablemente precedió a los casos detectados (*Van Damme et al., 2020*). La pandemia mundial por SARS-CoV-2 se caracterizó por un elevado número de casos reportados. Al 31 de enero de 2022, se habían notificado 349,641,119 casos confirmados de COVID-19 en todo el mundo, con una tasa de mortalidad global aún en evaluación. La incidencia acumulada alcanzó los 4,485.72 casos por cada 100.000 habitantes, siendo Europa la región con mayor impacto (14,039.95 por 100.000), seguida de las Américas (12,512.57 por 100,000), lo que reflejó una amplia propagación e impacto en distintas regiones. En comparación con otros coronavirus de relevancia epidemiológica, el SARS-CoV-1 infectó aproximadamente a 8,000 personas, con una letalidad del 9,5% (*De Wit et al., 2016*), mientras que el MERS-CoV registró cerca de 2,500 casos, con una tasa de mortalidad de 34,4% (*WHO, 2022*).

Durante las primeras etapas de la pandemia, al 31 de marzo de 2020, se contabilizaron 693,224 casos confirmados y 33,106 fallecimientos a nivel global. La distribución de los casos en ese momento mostró una predominancia en países de ingresos altos (92%), mientras que solo el 2% se registró en países de ingresos bajos (*Ashmore & Sherwood, 2023*). La propagación del SARS-CoV-2 representó una carga significativa para la salud pública mundial y obligó a muchos países a implementar restricciones en los servicios no esenciales. Estas medidas tuvieron como objetivo reducir la transmisión y la carga de enfermedad, siendo evaluadas mediante modelos matemáticos que analizaron estrategias como el distanciamiento social y la heterogeneidad de contactos entre grupos etarios. En Estados Unidos, por ejemplo, acciones como el cierre temporal de escuelas y negocios, la cancelación de eventos masivos y la migración de reuniones a modalidades virtuales demostraron ser efectivas para limitar la transmisión, especialmente al reducir las interacciones entre distintos grupos de edad (*Lau et al., 2022; De Wit et al., 2016; WHO, 2022*) (tabla 1).

TABLA1 PORCENTAJE DE IFR Y CFR POR REGIÓN SEGÚN OMS (KANDI ET AL., 2021)

Clasificación de la letalidad según OMS	Tasa de letalidad por infección IFR (%)	Tasa de letalidad por casos CFR (%)
Región de las Américas	0,02%	5,3
Región Europea	0,02%	7,3
Región Africana	0,02%	1,9
Región del Sudeste Asiático	0,01%	1,1
Región del Mediterráneo Oriental	0,02%	2,2
Región del Pacífico Occidental	0,01%	1,8

OMS: Organización Mundial de la Salud, IFR: tasa de letalidad por infección, CFR: tasa de letalidad por caso.

En Panamá, se estudiaron 18,559 casos sospechosos de COVID-19, de los cuales 4,210 (22,7%) fueron confirmados mediante pruebas PCR. Se registraron 116 fallecimientos y 341 hospitalizaciones, cifras que reflejaron la presión temprana sobre el sistema de salud. Tras la confirmación del primer caso el 9 de marzo de 2020, el país implementó medidas rápidas como el cierre de colegios y la cuarentena obligatoria. Sin embargo, la diseminación inicial reveló una transmisión comunitaria no detectada desde mediados de febrero. El número básico de reproducción (R_0) se estimó en 2,22, lo que evidenció un alto potencial de contagio, mientras que el número de reproducción efectiva (R_t) descendió a 1,08 tras la aplicación de las estrategias de contención, mostrando la efectividad de las restricciones en el control del brote (Franco et al., 2021). La pandemia también expuso las debilidades estructurales de los sistemas de salud en Panamá y la región, resaltando la necesidad de herramientas predictivas

sólidas que permitieran anticipar escenarios y mitigar el impacto clínico y social de la enfermedad (*Nieto-Gutiérrez et al., 2024*).

A pesar de su utilidad, los modelos estocásticos (Calleri et al., 2021) convencionales tienen restricciones al examinar la relación no lineal entre acciones de salud pública (por ejemplo: distanciamiento social, vacunación) y sus impactos en la morbilidad y mortalidad de la población. Por esta razón, se sugiere un enfoque analítico híbrido que fusiona dinámicas epidemiológicas (por ejemplo: tasas de transmisión, R_0) con indicadores de capacidad hospitalaria (por ejemplo: ocupación de la UCI, acceso a terapias), lo que facilita la optimización de estrategias de mitigación y distribución de recursos de salud (*Kokudo & Sugiyama, 2021*). El efecto extendido en la salud pública, como el incremento de comorbilidades y la sobrecarga de servicio, resalta la importancia de adoptar estrategias proactivas para crisis venideras.

2.2 Respuesta inmune y la enfermedad de COVID-19

El sistema inmunitario es esencial en la protección del organismo frente a las infecciones causadas por virus. Un análisis de la respuesta inmunológica establece un fundamento para comprender los intrincados procesos que se activan cuando el cuerpo enfrenta un ataque viral. Es vital entender cómo interactúan los factores virales con los elementos del sistema inmunitario del huésped para poder crear estrategias efectivas de prevención y tratamiento de las infecciones virales (*Tripathi, 2021*). En situaciones severas en el caso de COVID-19, se evidenciaron cambios notables en la expresión de los marcadores superficiales de las células del sistema inmunológico, reflejando una compleja interacción de respuestas inmunitarias que pueden influir en la gravedad de la

enfermedad y evolución de los pacientes (*Berghäll et al., 2022a*); además, de una grave interrupción de la mielopoyesis. En los casos graves se observa una reducción significativa de las poblaciones de monocitos, en monocitos con bajo contenido de HLA-DR, lo que contribuye a la supresión inmunológica (*Berghäll et al., 2022b*). Se ha estudiado la habilidad de diversos subgrupos de células del sistema inmunológico, tales como las células Treg (*Chen et al., 2020*) las células NK, las células madre mesenquimales y las células T, para resguardar a los pacientes con COVID-19 de graves efectos adversos (*Chen et al., 2020*). Los macrófagos M1 (clásicos con fenotipo activado) y M2 (alternativamente con fenotipo activado) controlan la actividad del sistema inmunológico y resultan fundamentales para la protección y la patogénesis de la COVID-19. Previamente se ha comprobado que las células NK muestran un comportamiento particular durante la recuperación de la COVID-19, lo que señala con certeza que estas células regulan la respuesta inicial del sistema inmunológico (*Batista et al., 2025*). El sistema inmune depende de la migración coordinada de las células (mastocitos, basófilos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK (Natural Killer), células T asesinas naturales (NKT), que son componentes vitales del sistema innato de la respuesta inmunitaria (*Guo et al., 2010*), y depende especialmente de las quimiocinas que controlan la migración y el posicionamiento de las células inmunitarias en los tejidos y son fundamentales para la función del sistema inmunitario innato que controla la migración celular y el posicionamiento de las células a lo largo del desarrollo homeostasis e inflamación (*Sokol & Luster, 2015*).

Entre las diversas defensas del huésped se incluyen barreras físicas como el epitelio de la mucosa, la activación de la cascada del complemento, los péptidos y citocinas antimicrobianos circulantes, los leucocitos y la activación del sistema inmunitario adaptativo.

Los organismos que no son reconocidos como propios, aprenden a evadir la respuesta inmune (Hornet *et al.*, 2002). Otros factores que afectan la activación son los cambios que ocurren en el sistema inmune senescente en los seres humanos y tienen un gran impacto en el inicio y activación de la respuesta inmune, inducción y mantenimiento de la memoria inmune (Bender *et al.*, 1991). La inmunobiografía podría explicar el aumento de la heterogeneidad inmunitaria de los individuos ancianos y los cambios relacionados con la edad en el sistema inmunitario; es decir, inmunosenescencia e inflamación. La inmunosenescencia sufre una profunda remodelación con la edad, lo que contribuye a un mayor riesgo de infecciones, cáncer y enfermedades autoinmunes. Esta remodelación afecta tanto a los brazos innatos como adaptativos del Sistema Inmunitario (De Martinis *et al.*, 2005; Ostan *et al.*, 2008).

2.3 La respuesta inmune innata y las citocinas

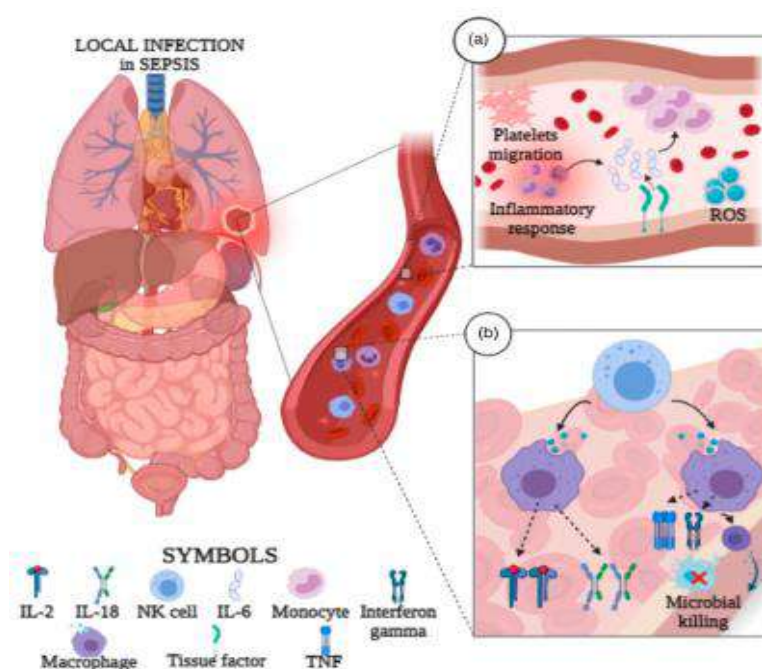
La interacción entre los sistemas inmune innato y posterior respuesta adaptativa de los pulmones, juega un papel crucial en la respuesta a la afección SARS-CoV-2. Ambos sistemas son decisivos para la respuesta a la COVID-19 y evolución de la enfermedad. La respuesta inflamatoria es esencial para determinar la gravedad de enfermedades, vital para el desarrollo, la recuperación y la preservación de tejidos dañados. La activación de la respuesta inflamatoria comienza cuando el virus ingresa al organismo y se relaciona con los receptores en las células objetivo (Meager & Wadhwa, 2013). En las infecciones, los cambios en la fisiología del hospedero inducen la activación de inflamosoma y activación del factor NF-kB desencadenando una serie de mecanismos como: liberación de citocinas, autofagia y muerte celular.

Las citoquinas producidas por la respuesta inmunológica innata pueden provocar la generación de citoquinas características de la inmunidad adaptativa, que también juegan un rol en la eliminación de la infección y en la formación de la memoria inmunológica. Sin embargo, también pueden contribuir a la intensificación de la patogénesis, lo que resulta en un incremento de la severidad clínica o en la perpetuación de la enfermedad. Las respuestas proinflamatorias de tipo Th1 bloquean las respuestas de tipo Th2, y usualmente promueven la expulsión del patógeno y la activación de la inmunidad reactiva. En el marco de la COVID-19, la modificación en la regulación de las respuestas Th1/Th2 puede llevar al conocido síndrome de liberación de citoquinas. En este, altos niveles de varias citoquinas producen un ciclo de *feedback* positivo de inflamación patogénica (Batista *et al.*, 2025; Petrey *et al.*, 2021). Durante varios estudios, alrededor de 11 citoquinas (GRO- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, MIG, FGF-2, IL-5, MDC y MIP-10 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las etapas iniciales y subsiguientes de la infección por COVID-19 (Ling *et al.*, 2021).

En pacientes con COVID-19 grave, se han identificado niveles elevados de diversas citocinas proinflamatorias que actúan como mediadores clave en la progresión de la enfermedad. Entre ellas, destacan la interleucina-6 (IL-6), cuya elevación se asocia al pico de síntomas (Hutcheon *et al.*, 2016; Afrin & Sharmin, 2024) que se ha señalado como un marcador fiable de severidad y pronóstico clínico (Ling *et al.*, 2021). Asimismo, se ha reportado un incremento de interleucina-1 β (IL-1 β) (Bertoni *et al.*, 2022) y de otras moléculas inflamatorias como MCP-1, IP-10 y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (Ling *et al.*, 2021; Petrey *et al.*, 2021). Estos mediadores reflejan una respuesta inflamatoria exacerbada que favorece la progresión clínica hacia formas graves de la enfermedad. Se ha propuesto que los niveles elevados de citocinas proinflamatorias pueden

desencadenar complicaciones severas, como shock, insuficiencia respiratoria o fallo multiorgánico, lo que ha motivado múltiples estudios dirigidos a caracterizar los principales mediadores inflamatorios (Doganyigit et al., 2022). Un fenómeno similar ocurre en la sepsis, donde la activación descontrolada de factores tisulares induce una producción elevada de IL-6 en el foco de infección. Este proceso se acompaña de la migración de monocitos al tejido afectado y de la exacerbación de la cascada inflamatoria. En paralelo, las células NK contribuyen liberando interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que potencian la eliminación de patógenos (Doganyigit et al., 2022b).

FIGURA 1 ACTIVACIÓN DESCONTROLADA DE CASCADA INFLAMATORIA EN SEPSIS



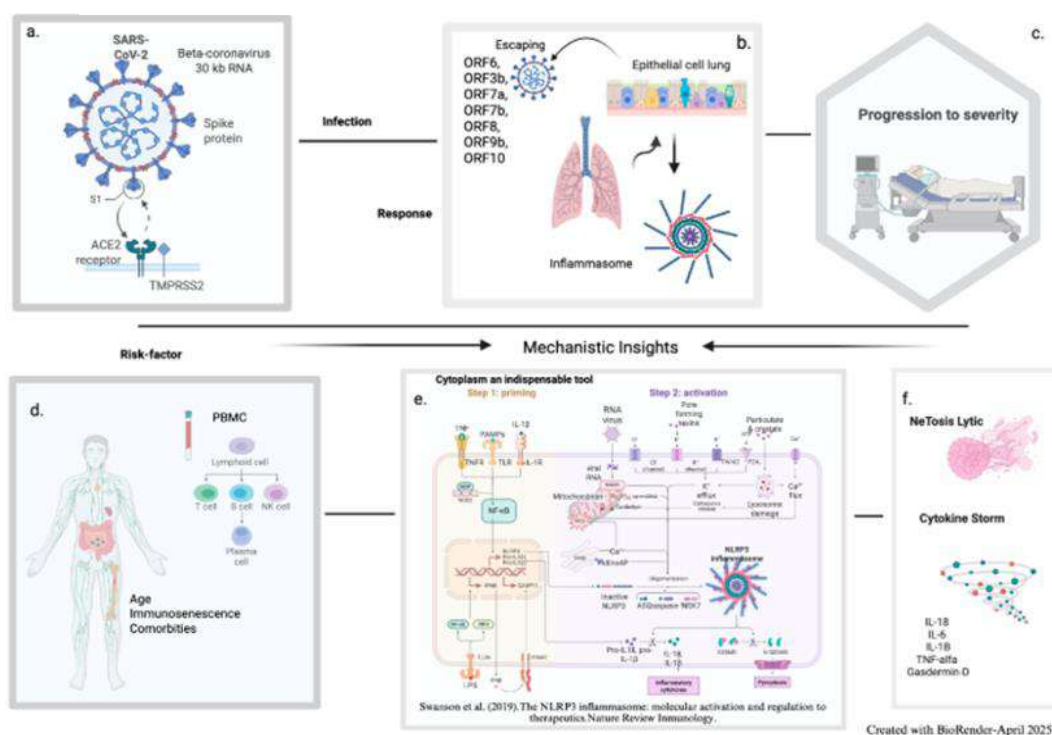
En sepsis:

- la activación descontrolada de factores tisulares induce una producción elevada de Interleucina-6 (IL-6), citocina proinflamatoria. En la cascada inflamatoria se ubica en el sitio de la infección, en el que existe migración de monocitos al tejido afectado y posterior exacerbación de la respuesta.
- Las células asesinas naturales (NK) desempeñan un papel adicional liberando mediadores como interferón gamma (IFN- α) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que promueven la eliminación de patógenos. (Doganyigit et al., 2022b).

En COVID-19, la desregulación del equilibrio entre respuestas Th1 y Th2 favorece el denominado síndrome de liberación de citocinas, caracterizado por un ciclo de retroalimentación inflamatoria patogénica (*Batista et al., 2025; Petrey et al., 2021*). En los casos graves, se ha observado un marcado incremento de IL-6 durante el pico de síntomas (*Hutcheon et al., 2016*) y de IL-8, cuya elevación se correlaciona de forma consistente con la severidad y permite predicciones clínicas más precisas (*L. Li et al., 2021*). Además, se detectan concentraciones aumentadas de IL-1 β , MCP-1, IP-10, G-CSF y otras citocinas, lo que refuerza la hipótesis de que la inflamación sistémica descontrolada impulsa la disfunción orgánica. En conjunto, estudios recientes han documentado diferencias estadísticamente significativas en un panel de al menos once citocinas entre ellas GRO- α , IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, MIG, FGF-2, IL-5, MDC y MIP-1 α entre las fases iniciales y avanzadas de la infección, lo que sugiere su utilidad como biomarcadores pronósticos (*Ling et al., 2021*). Las respuestas proinflamatorias de la clase Th1 bloquean las respuestas de la clase Th2, y usualmente promueven la eliminación del patógeno y la activación de la inmunidad. Dentro del marco de la COVID-19, la modificación en el control de las respuestas Th1/Th2 puede llevar al conocido síndrome de liberación de citocinas. Con estos altos niveles de citocinas se produjeron un ciclo de *feedback* positivo de inflamación patogénica. (*Batista et al., 2025; Petrey et al., 2021*) . Comprender la reacción inflamatoria y la función de estas citocinas durante la infección podría contribuir a la identificación de biomarcadores pronósticos. En los pacientes con casos graves de COVID-19 se mostró un aumento notable de IL-6 durante el pico de sus síntomas (*Hutcheon et al., 2016*). Asimismo, se observó que niveles elevados de IL-8 que se correlacionan de forma fiable con la severidad de la enfermedad, permitiendo mejores predicciones clínicas (*L. Li et al., 2021*). La mayoría de los pacientes gravemente

afectados por COVID-19 presentaron niveles altos de citocinas proinflamatorias tales como IL-6, IL-1 β , MCP-1, IP-10, G-CSF y otras más. Se ha sugerido que estas concentraciones elevadas podrían inducir shock, insuficiencia respiratoria o incluso fallo multiorgánico, razón por la cual se han llevado cabo estudios para evaluar los principales mediadores inflamatorios. Aproximadamente citoquinas. Aproximadamente citoquinas como GRO- α , IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, MIG, FGF-2, IL-5, MDC y MIP-1 α han mostrado diferencias estadísticamente significativas entre las fases iniciales y posteriores de la infección por SARS-CoV-2, según varios estudios (Ling *et al.*, 2021).

FIGURA 2 INTERACCIÓN ENTRE EL VIRUS SARS-CoV-2 Y LA RESPUESTA INMUNE



Compleja interacción entre el virus-SARS-CoV-2 y la respuesta inmune en los pacientes vinculan los mecanismos relacionados a una respuesta inflamatoria descontrolada relacionados a los siguientes componentes: a. Estructura y entrada viral, b. Evasión Inmune, c. Factores del Huésped, d. Activación de inflamosoma (NLRP3), e. Daños de tejidos, f. Tormenta de citocinas (Batista *et al.*, 2025).

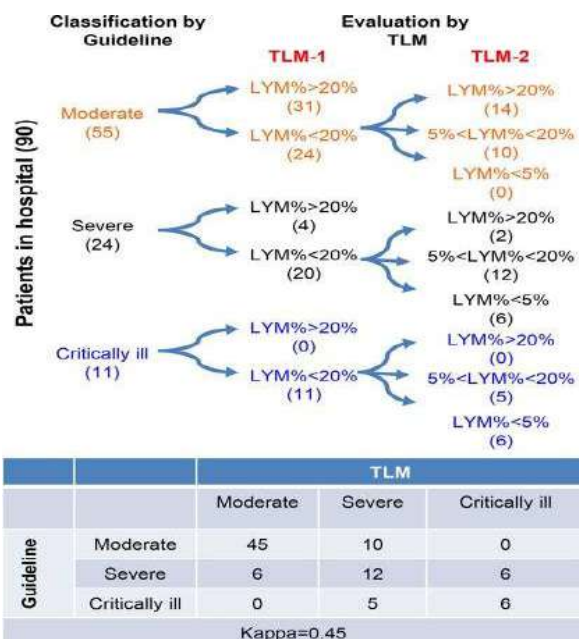
Aún es restringido el entendimiento de los mecanismos inmunológicos que respaldan la gravedad de la COVID-19 y cuánto varían en comparación con las respuestas inmunológicas detectadas en otros virus respiratorios. Las citoquinas producidas por la respuesta inmunológica innata tienen la capacidad de generar citoquinas características de la inmunidad adaptativa, que también juegan un papel en la eliminación de infecciones y en el desarrollo de la memoria inmunológica. Sin embargo, también pueden contribuir a la intensificación de la patogénesis, lo que resulta en una gravedad clínica aumentada o en la cronificación de la enfermedad (*Obeagu, 2024*).

2.4 Células asesinas naturales (NK)

La respuesta inmune del huésped al SARS-CoV-2 tiene un rol crucial en la patogénesis de la enfermedad y sus síntomas clínicos. Los linfocitos en particular la línea linfóide de las células asesinas naturales (NK) están entre las metas de la regulación provocada por el virus, un tema que ha sido de interés para este estudio. En la fase inicial de la respuesta inmunológica, los monocitos, macrófagos, células dendríticas y células linfoides innatas (ILCs) (tales como células NK, ILC1, ILC2, ILC3 y células LT α) reaccionan ante los patrones moleculares de los agentes patógenos liberando interferones y citoquinas antiinflamatorias (*Barbon et al., 2024; Di Vito et al., 2022a*). Las células NK, esenciales para la respuesta inmunológica cuentan con receptores que envían señales de activación, además de receptores inhibitorios, que controlan dichas respuestas. Estas señales provocan la lisis directa de células infectadas por virus mediante la generación de perforina y granzima B, lo que favorece la producción de citoquinas inflamatorias, citotoxicidad celular basada en anticuerpos e interacciones con células del sistema inmunológico como los monocitos (*Batista et al., 2025*). Algunos datos

sugirieron que la actividad y el fenotipo de estas células pueden tener un impacto significativo en el pronóstico y la evolución de la enfermedad en pacientes hospitalizados (Di Vito *et al.*, 2022b). Por ello, resulta fundamental profundizar en la caracterización de estas células y sus interacciones con otros componentes del sistema inmunológico. Li Tan, et al 2020, describió que la disminución de linfocitos es un marcador que predice la gravedad en COVID-19 al reportar el recuento absoluto de linfocitos se correlaciona con mayor riesgo de ingreso a UCI, necesidad de ventilación mecánica y elevada mortalidad hospitalaria (Figura 3). Los mecanismos propuestos pudiesen deberse a destrucción directa de linfocitos por el virus y apoptosis acelerada inducida por citocinas proinflamatorias.

FIGURA 3 PORCENTAJE DE LINFOCITOS EN PACIENTES



Porcentaje de linfocitos en pacientes con COVID (TLM= Time LYM% Model) según severidad clínica (Tan et al., 2020) .

Las células NK son células efectoras del sistema inmunológico innato que controlan varios tipos de infecciones microbianas y tumores al limitar su propagación y el daño tisular posterior (*Abel et al., 2018*), a su vez se conocen como células respondedoras de primera línea capaces de estar involucrada en la fase aguda de infección al encontrar células transformadas o infectadas regulando a su vez la respuesta inmunitaria adaptativa. Son reconocidas por su capacidad para eliminar células infectadas viralmente y cancerosas, sin afectar a las células no infectadas. Los pacientes con niveles insuficientes de células NK tienen infecciones virales recurrentes (*Hart et al., 2005*). En la fase inicial de la infección sobreviene la proliferación del virus, con posterior muerte celular y liberación del virus; y seguido por el reclutamiento de células inmune, y finalmente la activación de dos sistemas asociados a inmunidad la cual pudiese ser activados por infección por SARS-CoV-2 (*Anka et al., 2021*). Son la tercera población de linfocitos, diferentes a los linfocitos B y linfocitos T y pertenecen al sistema inmune innato (SII). Proviene de la médula ósea y depende de las interacciones CXCL12/CXCR4 que se encuentran en la sangre y tejidos linfáticos, especialmente el bazo. Se caracterizan morfológicamente por ser mayoritariamente linfocitos grandes y representan aproximadamente el 5–15% de los linfocitos en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas (*Chiossone & Vivier, 2018*). Las células NK constituyen una población heterogénea dentro de la inmunidad innata y se dividen en dos subgrupos principales con perfiles fenotípicos y funcionales bien definidos (*Castriconi et al., 2018*). El subconjunto CD56^{bright}/CD16^{dim}/– se caracteriza por una elevada expresión de NKG2A⁺ y la ausencia de receptores de tipo inmunoglobulina de células asesinas (KIR[–]), lo que le confiere un rol predominantemente inmunorregulador. En contraste, el subconjunto CD56^{dim}/CD16^{bright} presenta proporciones variables de

NKG2A⁺ y NKG2C⁺, asociadas a distintos grados de maduración y a una mayor capacidad citotóxica (Marquardt *et al.*, 2017). Estas diferencias fenotípicas y funcionales son brevemente la Tabla 2 (Castriconi *et al.*, 2018).

TABLA 1 SUBPOBLACIÓN FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE CÉLULAS NK

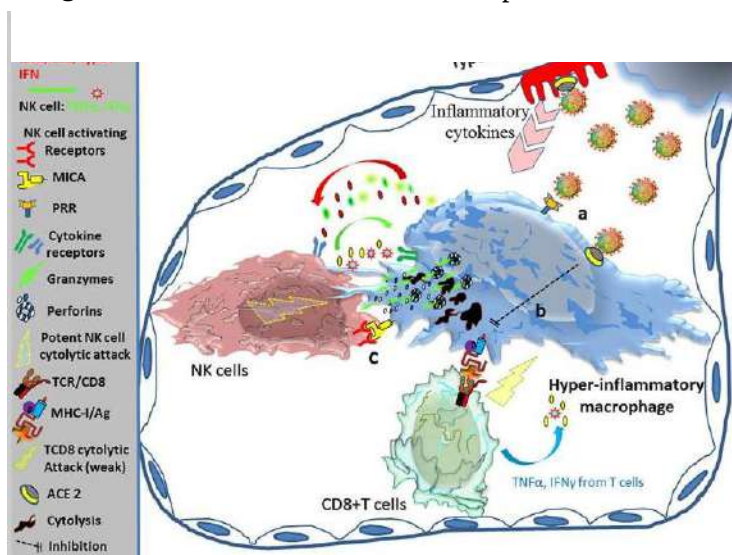
Subpoblación	Características fenotípicas	Marcadores principales	Función predominante
CD56 ⁺ bright CD16 ⁻	Alta expresión de CD56 ⁺ y baja o nula de CD16 ⁺	Alta expresión de NKG2A ⁺ y ausencia de KIR ⁻	Baja citotoxicidad basal. Alta producción de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-10). Rol inmunorregulador y de cooperación con células T y dendríticas
CD56 ⁺ dim CD16 ⁺	Baja expresión de CD56 ⁺ y alta de CD16 ⁺	Expresión heterogénea de NKG2A ⁺ y NKG2C ⁺	Elevada citotoxicidad mediada por perforinas y granzimas. Eliminación de células infectadas o tumorales

La gran mayoría (casi el 90%) de las células NK humanas en la sangre periférica expresan marcador CD56⁺ a niveles bajos (CD56^{dim}) y CD16⁺ (FcRIII) a altos niveles ejerciendo así una fuerte función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Mace, 2023; Smyth *et al.*, 2005). Las células NK responden eficazmente a la estimulación de citocinas y se caracterizan por un repertorio de receptores de quimiocinas que les da el potencial de colonizar tejidos linfoides y no linfoides en respuesta a un medio de quimiocinas adecuado (Abel *et al.*, 2018; Mercier *et al.*, 2012). Cuando estas células NK CD56^{dim}, entran en

contacto en el caso de las células tumorales in vitro, se vuelven citotóxicas y liberan IFN(Ravetch & Lanier, 2000). Cuando los receptores activadores e inhibidores están activados al mismo tiempo por sus respectivos ligandos, el resultado neto está determinado por la fuerza relativa de estas señales opuestas (van Eeden et al., 2020a) . Estas células NK constituyen la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos, en especial los virus. Su efecto citotóxico se produce por mecanismos, entre los cuales se encuentran la producción de perforina e hiperperforina, así como la liberación de granzimas, ocasionando apoptosis o muerte de la célula blanco. Las células NK se distinguen por la ausencia de muchos de los marcadores de superficie característicos de las poblaciones linfocitarias convencionales, pero poseen una amplia gama de receptores de distinto origen que sustentan tanto su función citotóxica como su papel inmunorregulador (Lanier, 2016). De manera concordante, también se ha señalado que estas células carecen de los marcadores propios de los linfocitos tradicionales, lo que refleja su naturaleza singular dentro del sistema inmune (Diefenbach, 2013). La singularidad fenotípica de las células NK, caracterizada por la ausencia de marcadores típicos de linfocitos convencionales y la presencia de un amplio repertorio de receptores de origen diverso (Lanier, 2016; Diefenbach, 2013), se traduce directamente en su capacidad funcional. En este contexto, los receptores activadores e inhibidores desempeñan un papel central al regular su actividad, permitiendo la identificación y eliminación de células infectadas por virus o transformadas tumoralmente, al tiempo que contribuyen a mantener el equilibrio inmunológico. Cuando una célula NK entra en contacto con un blanco potencial, se establece un delicado balance entre señales de activación e inhibición que determinará si la célula diana será lisada. En particular, las células que carecen de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I), o aquellas que

expresan ligandos para receptores activadores como NKG2D entre ellos las moléculas humanas MIC y ULBP, suelen ser reconocidas como alteradas y susceptibles de destrucción (Raulet & Vance, 2006). De esta manera, las células NK combinan mecanismos de auto tolerancia con la capacidad de detectar variaciones en la expresión de MHC-I durante procesos de infección, transformación o estrés celular, asegurando un control preciso de sus funciones efectoras (ver Figura 4) (Raulet & Vance, 2006).

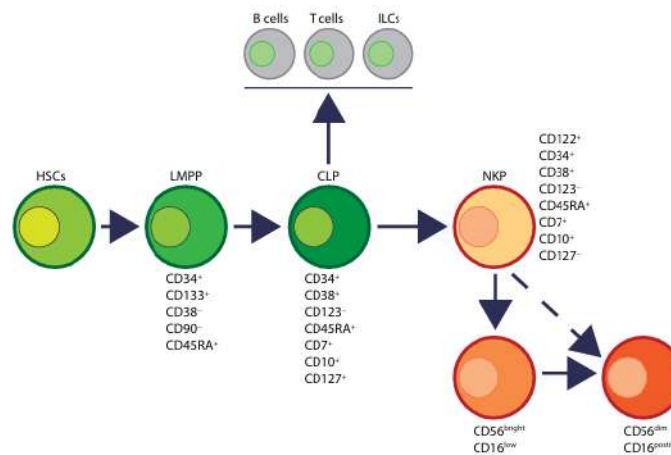
Figura 4 Mecanismo de citotoxicidad por las células NK



Citotoxicidad catalizada por células NK en macrófagos infectados hiperactivados: a) El macrófago identifica antígenos de SARS-CoV-2 mediante receptores PRR. El virus también tiene la capacidad de ingresar al macrófago mediante la interacción con ACE2. b) Los macrófagos infectados muestran niveles disminuidos de la molécula MHC-I, contribuyendo a eludir la identificación de las células T CD8+ y sus efectos citolíticos. c) Aunque la expresión de la molécula MHC-I ha disminuido en los macrófagos, las células NK continúan identificando diversos ligandos en las células infectadas mediante sus receptores activadores. Sus interacciones potencian los potentes efectos citolíticos de las células NK en contra de los macrófagos infectados, disminuyendo la carga viral y las tormentas de citoquinas. ACE; Enzima que transforma angiotensina, MHC; Complejo de histocompatibilidad superior, NK; Células asesinas naturales, PRR; Receptores que reconocen patrones, SARS-CoV; Coronavirus asociado al síndrome respiratorio agudo severo.

Las citocinas desempeñan un papel fundamental en la maduración de las células NK, siendo la interleucina-15 (IL-15) crucial para el compromiso, la supervivencia y la transición de las células NK inmaduras (iNK) a maduras (mNK), a través de su presentación por IL-15R α en células dendríticas y macrófagos, lo cual las prepara para la citotoxicidad (Woelk *et al.*, 2025a). Además, otras citocinas como IL-7, el stem cell factor (SCF) y el ligando FLT3 (FLT3L) contribuyen en las etapas tempranas del desarrollo, regulando la generación de progenitores CD122⁺ a partir de células madre hematopoyéticas (Bi & Wang, 2020). El desarrollo y la función de las células NK dependen de una red finamente regulada de factores de transcripción que controlan la expresión génica. Entre ellos, STAT5 se reconoce como un mediador esencial de la señalización inducida por IL-15, desempeñando un papel crítico en la supervivencia, proliferación y maduración de estas células, ver Figura 5 (Lin *et al.*, 2017; Wang & Zhao, 2021). Otro regulador clave es NR2F6, un receptor nuclear huérfano que actúa como represor del receptor activador NKp46. En modelos murinos, la deficiencia de NR2F6 se asocia con una maduración incompleta de las células NK en tejidos periféricos, lo que pone de manifiesto su función reguladora en la homeostasis del compartimento NK (Woelk *et al.*, 2025b). Por otro lado, Fox1 funciona como un regulador negativo de la respuesta efectora, ya que su ausencia incrementa la citotoxicidad y la producción de citocinas. Estos hallazgos sugieren que Fox1 participa en el mantenimiento del equilibrio entre señales de activación e inhibición durante la diferenciación y maduración de las células NK (Figura 5) (Deng & Yu, 2015).

FIGURA 5 DESARROLLO DE LAS CÉLULAS NK



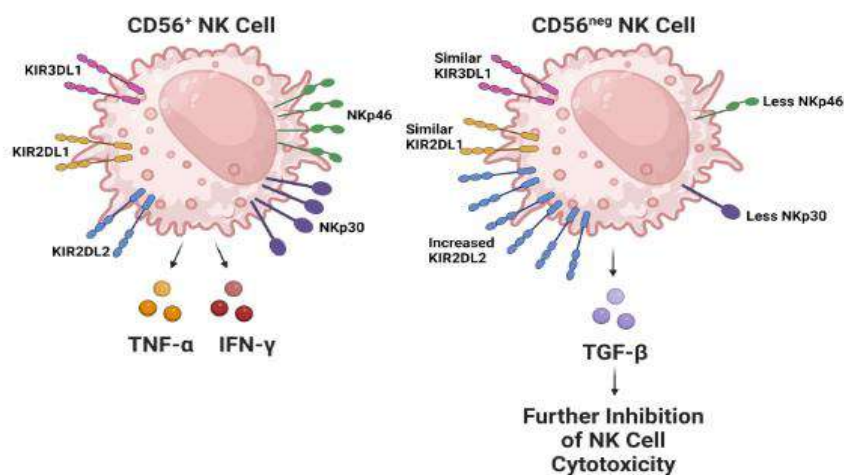
La maduración de las células NK inicia a partir de células madre hematopoyéticas (HSCs) Lin-34⁺, que se diferencian en progenitores CD45RA⁺. Posteriormente, adquieren la expresión de CD56 y progresan hacia estados de maduración definidos como CD56^{bright} (inmunorreguladoras y productoras de citocinas) y CD56^{dim} (altamente citotóxicas), lo que refleja la transición funcional hacia células NK maduras (Abel et al., 2018).

2.4 Fenotipos de las células NK y sus funciones

En los humanos, los marcadores más comunes y relevantes utilizados en citometría de flujo para identificar células NK se basan en la expresión de marcadores de superficie CD56⁺ y CD16. A menudo se describen dos subconjuntos funcionales maduros principales: CD56^{+/bright} CD16^{-/dim} y CD56^{dim} CD16^{+/bright}. Las células CD56^{+/bright} CD16⁻ (que representan el 5-10% de las células NK circulantes) son agranulares con baja actividad citotóxica, ya que carecen de actividad de perforina, y se consideran principalmente productoras de citocinas y quimiocinas, (Lenart et al., 2024; Venglar et al., 2022). Producen citocinas, particularmente IFN- γ en respuesta a la estimulación con citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18, aumentando

su función efectora (Foltz et al., 2023; van Eeden et al., 2020b). La mayoría ($\approx 90\%$) de las células NK humanas en la sangre periférica tienen una expresión de baja densidad de CD56⁺ (CD56^{dim}) y expresan altos niveles de Fc γ Receptor III (Fc γ RIII, CD16), un receptor que reconoce la región constante Fc de anticuerpos IgG. Estas células NK CD56^{dim} son citotóxicas y producen IFN- γ tras la interacción in vitro con células tumorales (Cooper, 2001; Lanier, 1998). Las células NK expresan un amplio abanico de receptores, tanto activadores como inhibidores, cuyo equilibrio decidirá qué tipo de actividad ejerce ese linfocito. Los receptores inhibidores, en las células NK, son a menudo del tipo NKG2A⁺ o reaccionan con los HLA de clase I (Beelen et al., 2023; Sivori et al., 2019) como los KIRs en humanos (Ver Figura 6). Esto implica que, si una célula blanca presenta un alto nivel de expresión de HLA, que podría suceder en un proceso de transmisión viral, esa célula no será lisada por la célula NK. Por otro lado, si la familia de “Leucocyte Ig-Like receptors” (LILRs) ha sido alterada de algún modo por un virus, el receptor activador NKG2D reaccionará con los MIC (MHC class I chain-related molecules) y algunas ULBP (UL16-binding protein) que provocan el estrés (Mariuzza et al., 2025; Parry et al., 2016).

FIGURA 6 EXPRESIÓN DE MARCADORES EN LAS CÉLULAS NK



El subconjunto de células NK CD56⁻ se expande en infecciones crónicas (VIH, VHC, EBV, CMV), mostrando menor citotoxicidad por pérdida de receptores activadores (NKp30/NKp46) y aumento del inhibidor KIR2DL2. En VIH, produce más TGF-β, agravando la inmunosupresión. Su disfunción favorece la persistencia viral, siendo una diana terapéutica clave (Bjorgen et al., 2023).

El sistema de detección de células NK incluye una variedad de receptores de superficie celular, tanto activadores como inhibidores, cuya interacción regula la actividad celular. La activación de las células NK se produce a través de receptores como NKG2D⁺, DNAM-1⁺, CD94-NKG2C⁺, NKp46⁺, entre otros. Esta activación permite la secreción de diversas citocinas (Diefenbach et al., 2014; Quatrini et al., 2021a), incluyendo: Interferón-γ (IFN-γ), Factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), Quimiocinas: CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 y CXCL8. Estas citocinas pueden modular la función de otras células inmunes, tanto innatas como adaptativas. En conjunto, estas moléculas son cruciales para una respuesta inmune efectiva y para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo (Meager & Wadhwa, 2013). La expresión de receptores clásicos en las células NK como el fenotipo CD56^{dim} CD16⁺, se ha

observado en diversos estudios de pacientes que han logrado curarse de infecciones víricas, que expresan una cantidad significativamente mayor de receptores, entre ellos los NKG2A⁺, KIR2DL1⁺, KIR2DL2/KIR2DL3⁺ y KIR3DL1⁺ (*Lenart et al., 2024, González, 2022*).

Esta observación sugiere que estos receptores juegan un papel crucial en la respuesta inmune efectiva contra los virus, lo que podría tener importantes implicaciones para entender mejor la inmunidad y el diseño de terapias futuras. La expresión de genes como el del receptor activador KIR2DS4⁺ se correlaciona con elevada respuesta de las células NK hacia SARS-CoV-2, sugiriendo que marcadores específicos pueden influenciar en la efectividad de la inmunidad mediada por las células NK (*Graninger et al., 2024*). En un estudio experimental en primates, publicado por Balachandran et al. 2024, indicó que la depleción de células NK conduce a una mayor carga viral y daño pulmonar; durante este hecho hubo un aumento significativo de citocinas proinflamatorias en pulmones lo cual exacerbó la inflamación (*Balachandran et al., 2024*). La respuesta inmunitaria a la infección por SARS-CoV-2, en particular la que afecta a las células asesinas naturales (NK), varía entre los diferentes grupos de personas. Esta variabilidad es evidente en la activación, la función y el fenotipo de las células NK observadas en diferentes poblaciones y afecciones. Las células NK se activan durante la infección por el SARS-CoV-2, pero su función puede verse comprometida en casos graves, en los casos graves de COVID-19, muestran una mayor activación, pero una menor citotoxicidad celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) debido a la pérdida del receptor activador NKG2D en pacientes críticos (*Fernández-Soto et al., 2024*). Los factores ambientales, incluida la exposición a patógenos y el estilo de vida, también influyen significativamente en la variabilidad inmunológica (*Brodin & Davis, 2017*). Estos hallazgos sugieren la importancia de los receptores en la regulación y control de la compleja respuesta

inmune del organismo que existen entre los diferentes fenotipos de las células NK y su desarrollo son de gran relevancia e interés para la comunidad científica. Junto a esto, la asociación que se presenta entre la duración de las infecciones víricas y el mantenimiento, así como la adquisición de los fenotipos de las células NK, se han convertido en un tema de estudio reciente muy pertinente, el cual ha brindado importantes aportaciones que son fundamentales para el desarrollo de nuevos modelos determinantes que puedan explicar de manera efectiva la respuesta eficaz frente a infecciones víricas. Los mecanismos moleculares de activación e inhibición comparten una característica fundamental: ligar o unir los ligandos de receptor sobre las células infectadas y tumorales en a las células NK. Los ligandos de receptor que activan a las células se han denominado ligando de receptor activadores; por otro lado, los ligandos de receptor que inactivan a las células se han denominado ligandos de receptor inhibitor (*Kwon et al., 2017*). Comprender estos mecanismos de regulación y expresión de los ligandos-receptores, es crucial para el desarrollo de nuevas terapias basadas en células NK.

Interacción Ligando-Receptor: Las células NK poseen una variedad de receptores activadores e inhibidores que regulan su actividad. Los ligandos pueden ser reguladores que actúan sobre varios cuando se combinan con un co-regulador a nivel de un receptor determinado permitiendo el reconocimiento simultáneo de dos ligandos sobre un mismo receptor. La estructura de los complejos de ligando receptor, como el KIR/HLA y NKG2D/ligandos, es fundamental para entender entender las actividades regulatorias de las células NK (*Finton & Strong, 2012*). Los receptores activadores, como NKG2D⁺, reconocen ligandos específicos en células estresadas o infectadas, desencadenando una respuesta citotóxica. Por otro lado, los receptores inhibidores, como KIR, reconocen moléculas de

MHC clase I en células normales, previniendo la destrucción de células sanas (*Lenart et al., 2024c*). A continuación, en la tabla 3 se presentan algunos de los marcadores para el estudio de la población células NK:

CUADRO 1 CATEGORÍA Y MARCADORES DE SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS

Categoría	Marcadores de Superficie	Mecanismos
Activación	CD69 ⁺ , CD25 ⁺	CD69 ⁺ : Proliferación de linfocitos; transmisión de señales en células NK y plaquetas.(Moretta et al., 1991) CD25 ⁺ : Subunidad B del receptor de IL-2, que participa en la endocitosis mediada por el receptor y en la transducción de señales mitogénicas de la IL-2 (Rudnicka et al., 2015)
Inhibidor	PD-1 ⁺	PD-1 ⁺ : es un receptor inhibidor expresado en células inmunitarias, como linfocitos T, células NK y algunas células B. Su función principal es regular negativamente la respuesta inmunitaria para evitar daño tisular excesivo y autoinmunidad.(Moebius et al., 2020)
Receptores activadores	CD56 ⁺ , CD16 ⁺ , CD314 ⁺ (NKG2D)	CD56 (NCAM) está involucrado en la adhesión celular y también se menciona en el contexto de la plasticidad neuronal(Martinez et al., 2023) CD16 ⁺ : marcador mediador para proliferación y citotoxicidad(Grier et al., 2012) CD314 ⁺ : receptor para el reconocimiento de las moléculas de HLA-E de CHM de clase I(Prinz et al., 2020)
Memoria	CCR7 (CD197), CD45RA, CD27	CCR7 ⁺ : marcador de función de adhesión(De Colvenaer et al., 2011) CD45RA ⁺ : puede ayudar a identificar distintos estadios de activación y diferenciación celular(Braakman et al., 1990) CD27 ⁺ : marcador que juega un rol de activación y respuesta de células NK(De Colvenaer et al., 2011)

Identificación	CD3 ⁻ , CD8 ⁺ , CD14 ⁺	CD3 ⁻ : no expresa CD3 en su superficie. El contexto de células NK son típicamente CD3 ⁻ y CD56 ⁺ (Moingeon et al, 1990) CD8 ⁺ : en células NK puede estar asociada con su capacidad citotóxica, pero se expresa mayormente en células NK (Vargas-Inchaustegui et al., 2011) CD14 ⁺ : Marcador de células mononucleares, especialmente macrófagos y monocitos(Devitt et al., 1998)
Proliferación	CD38 ⁺ , CD127 ⁺	CD38 ⁺ : expresión de CD38 ⁺ puede indicar su estado de activación y función(Gars et al., 2018) CD127 ⁺ : puede ayudar a identificar subpoblaciones de células NK con diferentes capacidades funcionales(Sathe et al., 2017).
Inmunoregulación	CD95 ⁺ (Fas)	CD95 ⁺ : puede participar en la limitación de la respuesta inmune al inducir la apoptosis después de la activación(Lavrik, 2011).

La regulación de la función de las células NK está gobernada por un equilibrio entre los receptores activadores e inhibidores. Los receptores activadores, como NKp46⁺ y NKG2D⁺ (Prinz et al., 2020), reconocen los ligandos inducidos por el estrés en las células diana, lo que desencadena respuestas citotóxicas. Los receptores inhibidores, incluidos los KIR⁺ y los NKG2A⁺, reconocen las moléculas del MHC clase I, lo que previene la autoinmunidad.

Durante la infección por COVID-19, los receptores activadores como NKG2D⁺ y DNAM-1 (CD226⁺) son fundamentales para la respuesta inmunitaria innata, ya que promueven la activación de las células NK frente a células infectadas por SARS-CoV-2. NKG2D reconoce ligandos inducidos por estrés en células infectadas (Fernández-Messina et al., 2012; Imširović et al., 2023; Lanier, 2015), mientras que DNAM-1 interactúa con CD112⁺ y CD155⁺ (Shibuya & Shibuya, 2021), que pueden ser modulados por el virus, favoreciendo o

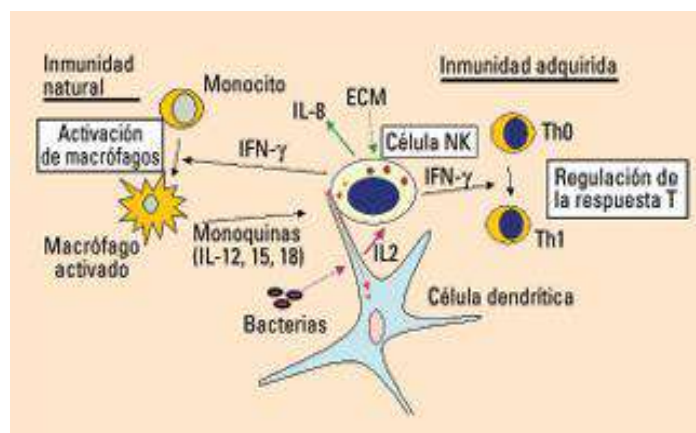
limitando la respuesta citotóxica. Sin embargo, el virus puede alterar la expresión de estos ligandos para evadir la eliminación por células NK, contribuyendo así a su persistencia y propagación. En contraste, los receptores inhibidores como KIR2DL1⁺, NKG2A⁺, LILRB4⁺ (H. N. Lee et al., 2022) y CD161⁺ tienden a estar regulados al alza durante la infección por SARS-CoV-2 (G. Lee et al., 2023), lo que reduce la eficacia citotóxica de las células NK y facilita la evasión inmunológica viral. En particular, CD161⁺ en monocitos CD16⁺ se ha relacionado con respuestas inflamatorias exacerbadas, lo que sugiere que el desequilibrio entre señales activadoras e inhibidoras contribuye tanto a la gravedad de la enfermedad como a las alteraciones inmunopatológicas características del COVID-19.

Esta desregulación se ha asociado con una menor eliminación viral, mayor inflamación sistémica y peor pronóstico clínico.

2.5 Interacción con otras células del sistema Inmunológico

Las células NK han evolucionado para reconocer células infectadas y neoplásicas a través de sus receptores activadores e inhibidores. Sin embargo, esta capacidad por sí sola no es suficiente para eliminar un patógeno o una célula cancerosa; requieren el apoyo de otros elementos de la respuesta inmune innata y adaptativa. Los principales componentes que interactúan con las células NK, incluyendo células presentadoras de antígenos, células T, así como su interacción con citocinas, quimioquinas y macrófagos (*Kyrysyuk & Wucherpfennig, 2025*).

FIGURA 7 CÉLULAS NK, CITOCINAS Y OTROS GRUPOS DE CÉLULAS



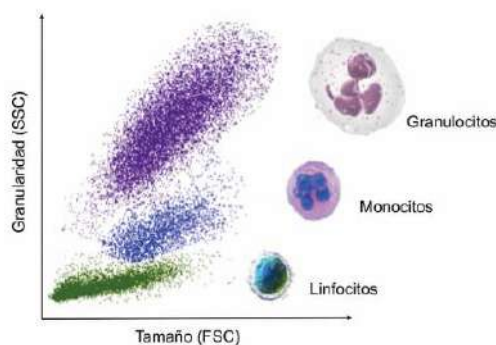
Las células NK secretan citocinas, entre las que se incluye el interferón- γ (IFN- γ), el cual puede activar macrófagos de forma independiente de la respuesta T y favorecer una respuesta Th1. Además, la interacción con células dendríticas (DC) conlleva la activación recíproca de ambas células. Las DC, al detectar microorganismos, producen interleucina 2 (IL-2) y otras citocinas, siendo la IL-2 crucial para activar las células NK; este proceso tiene lugar antes de que se inicie la respuesta T. (P. Roda-Navarro y E. Fernández-Ruiz. Células naturales killer. Concepto. Mecanismos de activación. Capacidades funcionales. Mecanismos de citotoxicidad Medicine 2005; 9(33): 2174-2180).

2.6 Citometría de Flujo

La citometría de flujo constituye una herramienta de gran precisión para el estudio de células en suspensión, entre ellas las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Esta técnica posibilita la evaluación simultánea de diversos parámetros celulares, incluyendo tanto marcadores de superficie como proteínas intracelulares, lo que permite identificar con detalle las distintas poblaciones del sistema inmunitario. Gracias a este abordaje, es factible diferenciar dentro de las PBMC subpoblaciones como las células NK, además de analizar sus fenotipos particulares y los estados de activación o maduración que presentan. La citometría de flujo es una técnica que permite analizar de forma simultánea múltiples parámetros celulares en poblaciones heterogéneas. En este estudio, los linfocitos NK serán evaluados

mediante paneles de marcadores específicos dirigidos a proteínas de superficie, lo que permitirá distinguir las diferentes subpoblaciones y estados de activación en pacientes con infección por COVID-19. El principio de la técnica se basa en la interacción de un haz de luz láser con cada célula en suspensión. La dispersión frontal (FSC, forward scatter) se utiliza para estimar el tamaño celular, mientras que la dispersión lateral (SSC, side scatter) refleja la complejidad interna o granularidad (Figura 8). A partir de estos parámetros iniciales, se establece la caracterización de las distintas poblaciones presentes en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), lo que proporciona la base para un análisis más detallado de los subtipos NK y su papel en la respuesta inmunológica.

FIGURA 8 CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES EN SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)

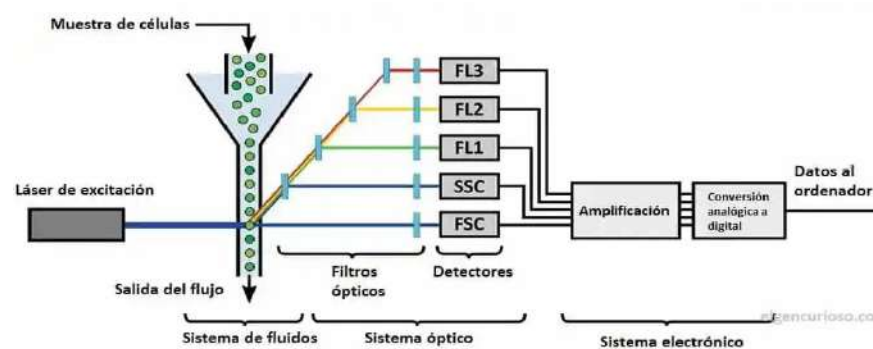


Leucocitos de sangre periférica de acuerdo con su tamaño y granularidad (Pérez Romero Rodríguez., 2018).

Un citómetro de flujo se encuentra compuesto por tres principales sistemas, el de fluidos, el óptico, y el electrónico (Figura 9). El sistema de fluidos, su principal función es alinear y

transportar a las células dentro de una cámara de flujo hacia el haz de luz; por tanto, es necesario que la muestra se encuentre suspendida en un fluido (*Pérez Romero Rodríguez., 2018*). Para lograrlo, se aplica una propiedad hidrodinámica, que consiste en la inyección de la muestra en el centro de una corriente de fluido envolvente, el cual puede ser agua o un buffer de fosfatos. Lo anterior se logra porque la presión de la muestra es mayor que la presión del líquido envolvente. Gracias a este sistema, las células pueden ser alineadas en “fila india”, y de esta manera se asegura que el haz de luz incida sobre una célula a la vez (*Pérez Romero Rodríguez., 2018*).

FIGURA 9 CITOMETRÍA DE FLUJO

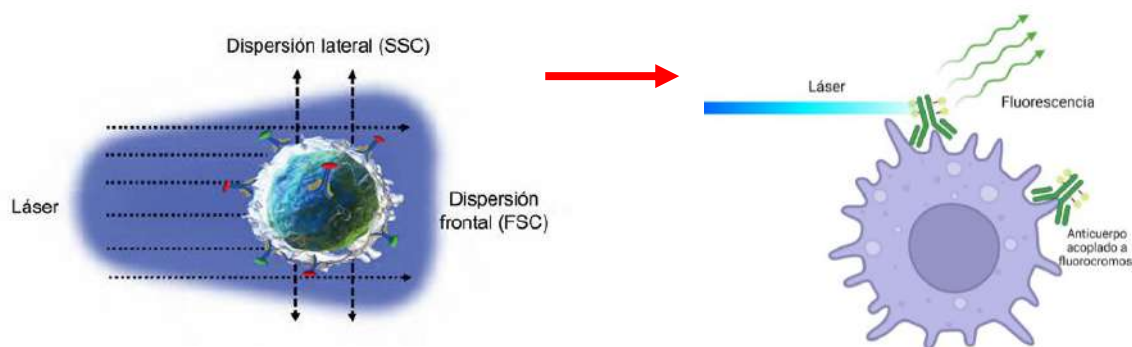


La muestra de células pasa por un sistema de fluidos donde es interceptada por un láser de excitación. La luz dispersada y la fluorescencia emitida son captadas por filtros ópticos y detectores (FL1, FL2, FL3 para fluorescencia; FSC y SSC para dispersión frontal y lateral). Estas señales se amplifican, se convierten de analógicas a digitales y se envían al ordenador para su análisis(Shapiro, 2003).

Sistema óptico: está compuesto por láseres y filtros, que se encargan de iluminar a las células y dirigir las señales resultantes hacia los detectores apropiados. Las células, al ser incididas por el láser, tendrán la capacidad de dispersar la luz de acuerdo con su tamaño y su granularidad. En caso de que

la luz se disperse frontalmente, se obtendrá un parámetro denominado FSC (forward scatter), que indica el tamaño de la célula (Arbini, 2005; Shapiro, 2003).

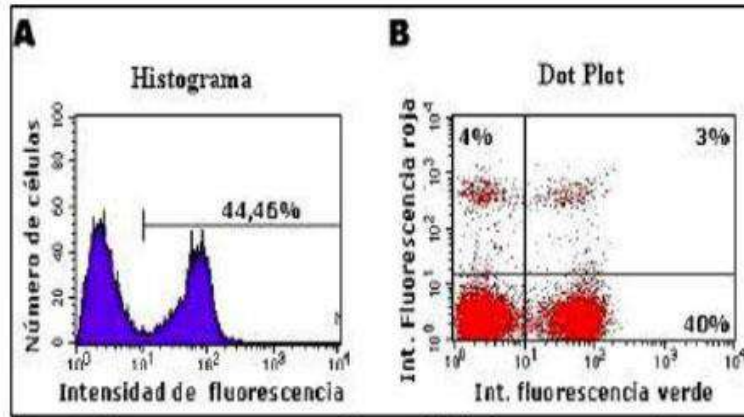
FIGURA 10 INCIDENCIA DEL LÁSER MUESTRA EL TAMAÑO Y COMPLEJIDAD CELULAR



Representación de la unión de Ac a fluorocromos en la célula de interés, para la detección de molécula de interés por fluorescencia.

El sistema electrónico, la señal luminosa (Fluorescencia) que es generada cuando el haz de luz incide en la célula de interés, esta se traducirá en señales electrónicas. El sistema de sensores (fotodiodos y fotomultiplicadores) tienen la finalidad de convertir los fotones en electrones y éstos, a su vez, en corriente eléctrica que es recibida por la computadora y traducida en gráficos e histogramas (Figura 11) (Marti, 2001).

FIGURA 11 HISTOGRAMA Y DOT PLOT



En la imagen A se representa la intensidad de fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente. En la imagen B, el diagrama de puntos (DotPlot), representa simultáneamente los dos parámetros (*Campoverde Cárdenas et al., 2019*).

Capítulo 3. Metodología

3.1 Diseño

Estudio analítico exploratorio de datos secundarios de los Estudios EC-CNBI-2020-05-65 en la que ampliará el punto 7.2 del protocolo. Adicionalmente, con apoyo de otros protocolos de estudios aprobados previamente: EC-CNBI-2020-03-42, EC-CNBI-2020-04-48 relacionados al análisis de PBMC en la respuesta de células NK en la inmunidad temprana.

3.2 Población de estudio

Todos los pacientes hospitalizados con diagnóstico positivo por COVID-19 del Hospital Santo Tomás, de Caja de Seguro Social (Complejo Hospitalario Doctor Arnulfo Arias Madrid y Hospital COVID-Ciudad de la Salud-Caja de Seguro Social) en ciudad de Panamá. Protocolo de Investigación EC-CNBI-2020-05-65 del estudio COVID-19-281.

3.3 Cálculo de Muestra

Basado en la prevalencia de infección por COVID-19 en Panamá se estimó un 20%, cuya variación estuvo entre 16.9% a 34.1% reportado por ICGES de las investigaciones realizadas entre el 30 de noviembre y 4 de diciembre 2020. La n estimada fue de 222 muestras de PBMC anonimizadas.

3.4 Procedimientos

El presente estudio corresponde a un análisis secundario realizado sobre una cohorte previamente definida de pacientes hospitalizados con infección confirmada por SARS-CoV-2. La cohorte original se estableció con base en criterios de inclusión que consideraron adultos mayores de 18 años con diagnóstico confirmado y necesidad de hospitalización,

mientras que se excluyeron sujetos con inmunodeficiencias conocidas, antecedentes de terapia inmunosupresora, neoplasias hematológicas activas o ausencia de consentimiento informado. De estos pacientes se recolectaron de datos clínicos y demográficos, comorbilidades relevantes (hipertensión, diabetes, enfermedad cardiovascular y obesidad) y parámetros de laboratorio. A partir de esta información, se llevó a cabo la caracterización del perfil de citocinas y la inmunofenotipificación de células NK, con el fin de explorar su asociación con la gravedad clínica y los desenlaces de la enfermedad.

3.4.1 Fase 1- Recolección de muestras de sangre de pacientes infectados por COVID-19 y Hospitalizados. EC-CNBI-2020-05-65 del estudio COVID-19 281.

Criterios para selección de pacientes:

CUADRO 2 CRITERIOS PARA SELECCIÓN DE PACIENTES

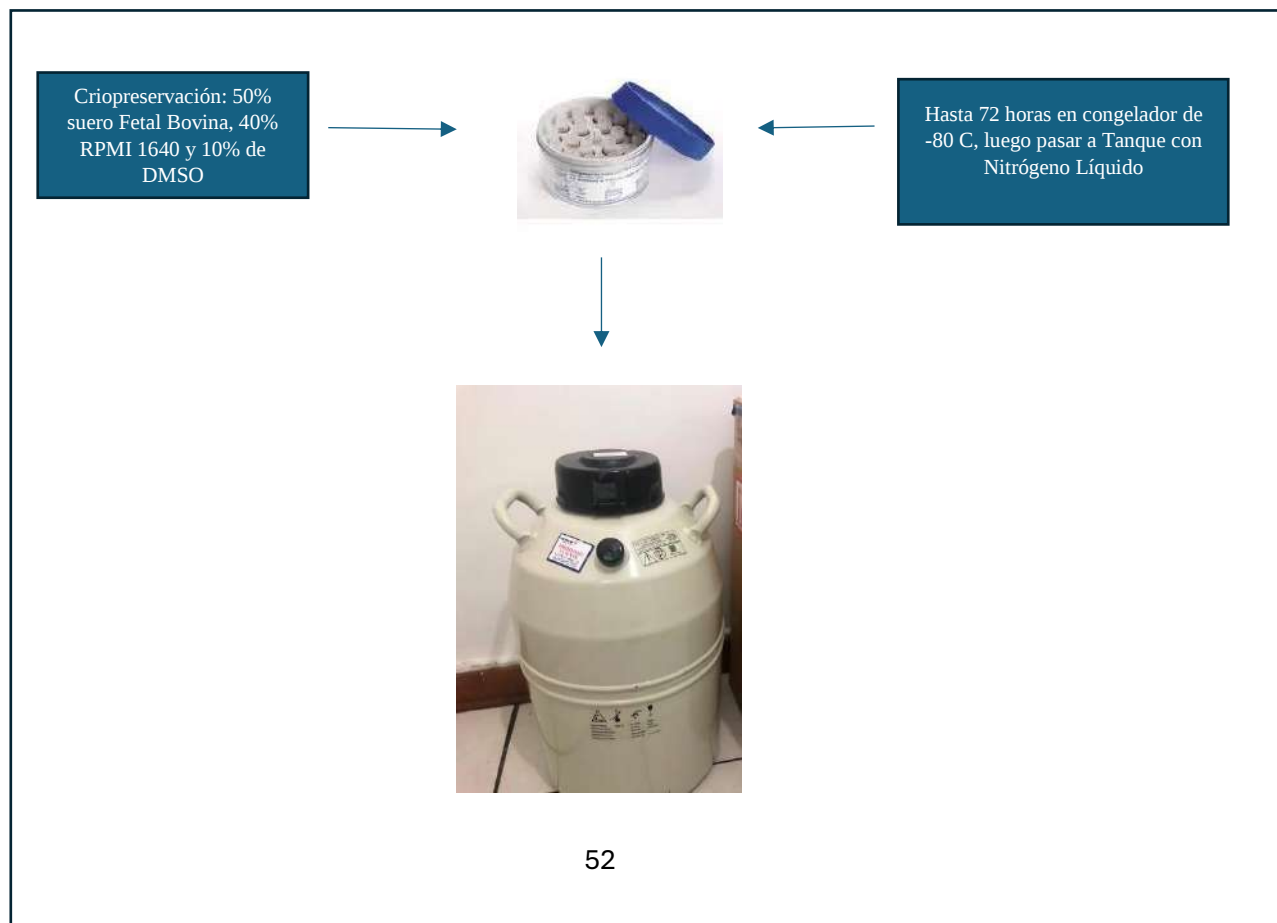
Inclusión	Exclusión
Pacientes mayores de 18 años	Paciente menor de 18 años
Hospitalizados con Diagnóstico positivo por COVID-19	Paciente que no pueda otorgar su consentimiento informado.
Aceptación de estudio por parte del paciente a través de su consentimiento firmado, para todo procedimiento.	Paciente con inmunosupresión, cáncer o con terapia inmunosupresora.
Pacientes hospitalizados con información clínica suficiente para ser clasificados en severos y no severos (moderados)	
Pacientes con más de 1 millón de células PBMC congeladas por vial	

3.4.2 Fase 2- Procesamiento de PBMC-Ver anexo protocolo extracción de PBMC utilizando tubos CPT.



Pasos: 1. Obtención de muestra sanguínea, 2. centrifugación según protocolo, 3. Congelación de PBMC, previo conteo celular. El conteo celular se realizó para determinar el volumen de células $\times 10^6$, anotados en una Bitácora.

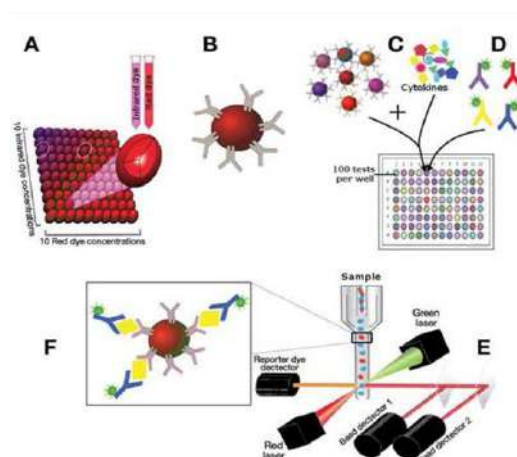
En la fase de congelación las muestras de PBMC fueron resguardadas en tanque de nitrógeno líquido de -80 C para su posterior descongelación, procesamiento y análisis por Citometría.



3.5 Medición de Citocinas

La selección de muestras de suero se hizo por conveniencia, para evaluar en dos momentos los niveles de citocinas de los pacientes hospitalizados. En las muestras de suero fueron inicialmente almacenadas en congeladores de -80C para luego ser procesadas para monitoreo inmunológico citocinas. Se implementó un panel de monitoreo inmunitario humano ProcartaPlex para MAGPIX 65plex es un kit (2-8 C) de inmunoensayo multiplex preconfigurado que mide 65 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento con un volumen de suero de 25uL, mediante la tecnología Luminex xMAP, Equipo ubicado en el ICGES (Ver Figura 12).

FIGURA 12 ANÁLISIS DE CITOCINAS



Esquema de Inmunoensayo A: Muestra las concentraciones de antígenos estándar para calibrar el ensayo. B: Representa una microesfera (bead) recubierta de anticuerpos. C: Ilustra la adición de citocinas (de la muestra) al pocillo del plato, donde interactuarán con los anticuerpos. D: Muestra el enlace de los anticuerpos en la microesfera con las citocinas de la muestra. E: Esquematiza la citometría de flujo: las microesferas pasan por un láser (rojo/verde) y son detectadas por dos sensores, midiendo la unión de anticuerpos-antígeno.

3.6 Citometría de flujo

Se examinó la expresión de antígenos de las células NK al combinar diferentes anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluorocromos seleccionados previamente para mejor identificación de las proteínas (marcadores), en un panel multicolor. Se pudo medir varios parámetros simultáneos relacionados con la activación y la inhibición.

Marcadores de superficie estudiados para la población general de linfocitos (Panel 1): CD95⁺, CD197⁺ (CCR7), CD 183⁺ (CXCR3), CD45RA⁺, CD8⁺, CD20⁺, CD3⁺, CD38⁺, CD56⁺, PD-1⁺, CD57⁺, CD14⁺, CD303⁺, CD16⁺, CD69⁺, CD25⁺, CD4⁺, CD127⁺, CD314⁺, CD19⁺, CD27⁺, CD45⁺.

3.6.1 Características del Citómetro para la adquisición de muestras

1. El analizador de células Cytex Northern Lights™, que permite detectar el espectro de luz casi completo, proporciona resultados altamente precisos en el conteo celular y la evaluación de viabilidad de las muestras en estudio, así como una detección detallada de poblaciones celulares que podrían ser difíciles de identificar con sistemas de citometría convencionales.
2. Está equipado con tres láseres, 38 canales de detección de fluorescencia y tres canales de dispersión (láser azul FSC, láser azul SSC y láser violeta SSC) para adquisición de datos multiparamétricos de alta resolución.
3. Los conjuntos de detectores semiconductores APD (Fotodiodos de Avalancha) exclusivos de alta sensibilidad están dotados de hasta 16 canales por láser para capturar los espectros de emisión de colorantes que emiten en el intervalo de longitudes de onda de 365 a 829 nm.

4. De acuerdo con los tres láseres fundamentales: 405 nm (violeta), 488 nm (azul) y 640 nm (rojo). Cada fluorocromo es mostrado con su canal de detección, nombre específico y longitud de onda de emisión máxima. Esta información es vital para la adecuada formación de paneles de colores variados, posibilitando una selección estratégica de fluorocromos que reduzcan el solapamiento espectral y potencien la resolución de subpoblaciones celulares (Ver figura 13).

FIGURA 13 LÁSERES FUNDAMENTALES

Laser (nm)	Primary Detector	Fluorochrome	Emission Max (nm)
405	V1	Brilliant Violet™ 421	421
		cFluor® V420	420
	V2	Alexa Fluor® 405	421
		Super Bright 436	436
	V3	cFluor® V450	450
		Pacific Blue™	455
	V5	Brilliant Violet™ 480	480
		cFluor® V505	505
	V7	Brilliant Violet™ 510	510
		VioGreen™	520
	V8	cFluor® V547	547
		Brilliant Violet™ 570	570
	V10	cFluor® V610	610
		Brilliant Violet™ 605	605
	V11	Super Bright 645	645
488	B1	cFluor® B515	515
		BD Horizon™ BB515	515
		Vio® S15	514
	B2	FITC	520
		Alexa Fluor® 488	525
	B3	cFluor® B548	548
		cFluor® BYG575	575
	B4	cFluor® YG584	584
		PE	575
	B6	cFluor® BYG610	610
		PE/Dazzle™ 594	610
	B7	BD Horizon™ BB630	631
		PE-Alexa Fluor® 610	630
	B8	PE/Fire™ 640	640
		BD Horizon™ BB660	667
640	B9	cFluor® BYG667	667
		PE-Cy™5	668
	B10	PerCP	680
		cFluor® B690	690
	B11	PerCP-Cy™5.5	680
		PE/Fire™ 700	695
	B12	BD Horizon™ BB700	700
		cFluor® BYG710	710
	B13	PerCP-Vio® 700	704
		PE-Alexa Fluor® 700	720
	B14	PerCP-eFluor® 710	730
		BD Horizon™ BB755	755
	R1	cFluor® BYG781	781
		PE-Cy™7	780
	R2	BD Horizon™ BB790	790
		cFluor® R659	659
	R3	APC	659
		cFluor® 668	668
	R4	Alexa Fluor® 647	668
		cFluor® R720	720
	R5	Alexa Fluor® 700	720
		BD Horizon™ APC-R700	704
	R6	Zombie NIR™	746
		cFluor® R780	780
	R7	APC-Cy™7	780
		APC-eFluor® 780	780
	R8	APC/Fire™ 750	780
		cFluor® R840	810
	R9	APC/Fire™ 810	810

La tabla organiza los fluorocromos por láser, detector y canal (violeta, azul, rojo), facilitando su selección en paneles multicolor.

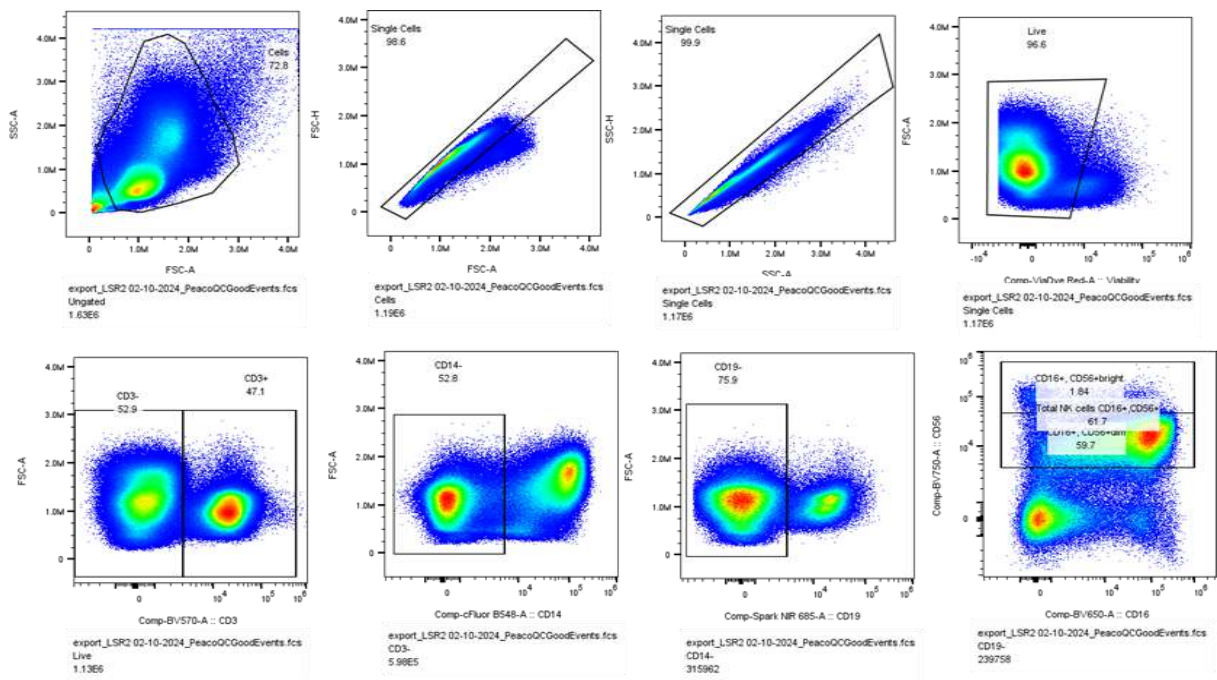
3.7 Gating Strategy propuesto

El panel utilizado de 24 colores fue específicamente diseñado para la identificación precisa de subpoblaciones celulares en sangre periférica humana, como linfocitos T/NK, monocitos y granulocitos. El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo siguiendo una estrategia secuencial de exclusión e inclusión de poblaciones celulares (Figura 15). En primer lugar, se seleccionaron las células totales con base en sus características físicas de tamaño y granularidad mediante la dispersión frontal (FSC-A) y lateral (SSC-A), excluyendo restos celulares y ruido. Posteriormente, se aplicaron controles de doblete tanto en FSC-H vs FSC-A como en SSC-H vs SSC-A, con el fin de restringir el análisis únicamente a células singletes. A continuación, se realizó la discriminación de viabilidad utilizando un marcador de exclusión, reteniendo únicamente las células vivas. Una vez establecida la población de interés, se seleccionaron los leucocitos a través de la expresión de CD45⁺. Dentro de esta fracción, se diferenciaron las células T (CD3⁺) de las células no T (CD3⁻).

El diseño del panel 1 contempla la identificación precisa de linajes celulares: las células NK con CD3⁻ permitiendo posteriormente diferenciar y descartar subpoblaciones CD3⁻ con marcadores CD14⁺ y CD19⁺ que corresponden a los monocitos y las células B, respectivamente. El análisis posterior se centró en la población CD3⁻, de la cual se identificaron las células NK definidas como CD56⁺CD3⁻. Finalmente, dentro de las células NK se distinguieron las subpoblaciones clásicamente descritas:

- CD56^{bright}CD16⁻, asociadas a funciones inmunorreguladoras y producción de citoquinas,
- CD56^{dim}CD16⁺, caracterizadas por un perfil predominantemente citotóxico.

FIGURA 14 GATTING STRATEGY



El análisis posterior se basa con la identificación $CD3^+/CD56^+/CD16^+$, de diferentes poblaciones de células NK, según la expresión de los marcadores que no definen linaje como marcadores de activación, maduración, etc. Para asegurar la calidad y fiabilidad de los resultados el análisis implicó una serie de pasos fundamentales. A continuación, se describen brevemente los principales conceptos:

1. Normalización: Se eliminaron los efectos de lote y variaciones en la señal que pueden surgir debido a diferencias técnicas en el proceso o ambientales. Se utilizó: perlas de referencias y controles internos para estandarizar finalmente los datos entre las distintas muestras.
2. Data QC (Control de calidad): revisión de los datos en busca de ruido, fluctuaciones de señal y posibles artefactos. Se realizan controles específicos para identificar anomalías, evaluar la compensación correcta de los parámetros espectrales y asegurar la consistencia entre las muestras.
3. Anotación: consiste en asignar metadatos relevantes a cada muestra. Estos metadatos pueden incluir grupos de tratamiento, características clínicas, condiciones experimentales o cualquier otra información relevante que ayude a contextualizar los datos.
4. Concatenación: permite integrar datos de múltiples fuentes y momentos temporales en una matriz coherente para el análisis estadístico y visualización.
5. UMAP: facilita la identificación de patrones emergentes dentro del repertorio de las células NK, otorgando un marco visual y cuantificable para el mapeo de su heterogeneidad funcional.

6. Clustering: Se refiere al uso de algoritmos computacionales, FlowSOM, para identificar grupos de células que comparten patrones similares de expresión de marcadores o características funcionales dentro de grandes conjuntos de datos. Estos métodos permiten que el análisis deje de depender exclusivamente de la experiencia o el sesgo humano, detectando poblaciones celulares presentes incluso en baja frecuencia que podrían pasar desapercibidas mediante técnicas tradicionales.
7. Fenotipo: asigna etiqueta de tipo celular a los clústeres identificados, basado en marcadores de superficie y características funcionales.

Análisis: Evalúa diferencias en la abundancia o expresión de marcadores entre condiciones experimentales.

Procedimiento para el Análisis de población celular

El análisis de las poblaciones celulares se realizó siguiendo un enfoque de citometría de flujo de alta dimensión, orientado a caracterizar con mayor precisión la heterogeneidad de las células inmunes. En primer lugar, los datos fueron sometidos a procesos de normalización y control de calidad (QC) para garantizar la comparabilidad entre muestras. Posteriormente, se llevó a cabo la anotación y concatenación de archivos, lo que permitió integrar múltiples adquisiciones en un solo marco de análisis. Con el fin de explorar la estructura global de los datos, se aplicaron algoritmos de reducción de dimensionalidad (UMAP), que facilitan la representación gráfica de subpoblaciones celulares en espacios bidimensionales. Posteriormente, se utilizaron herramientas de clustering no supervisado (FlowSOM) para agrupar células con perfiles fenotípicos similares y, de este modo, identificar poblaciones relevantes. Las subpoblaciones obtenidas se sometieron a fenotipado, empleando la expresión diferencial de marcadores de superficie y funcionales, seguido de análisis

comparativos entre grupos de pacientes de distinta severidad. Finalmente, los resultados se resumieron mediante mapas de calor y gráficos de caja y bigotes, que permiten visualizar patrones de activación o supresión en las células NK y otras poblaciones inmunes dentro de las PBMC.

3.8 Análisis estadístico

Análisis estadístico descriptivo para MFI

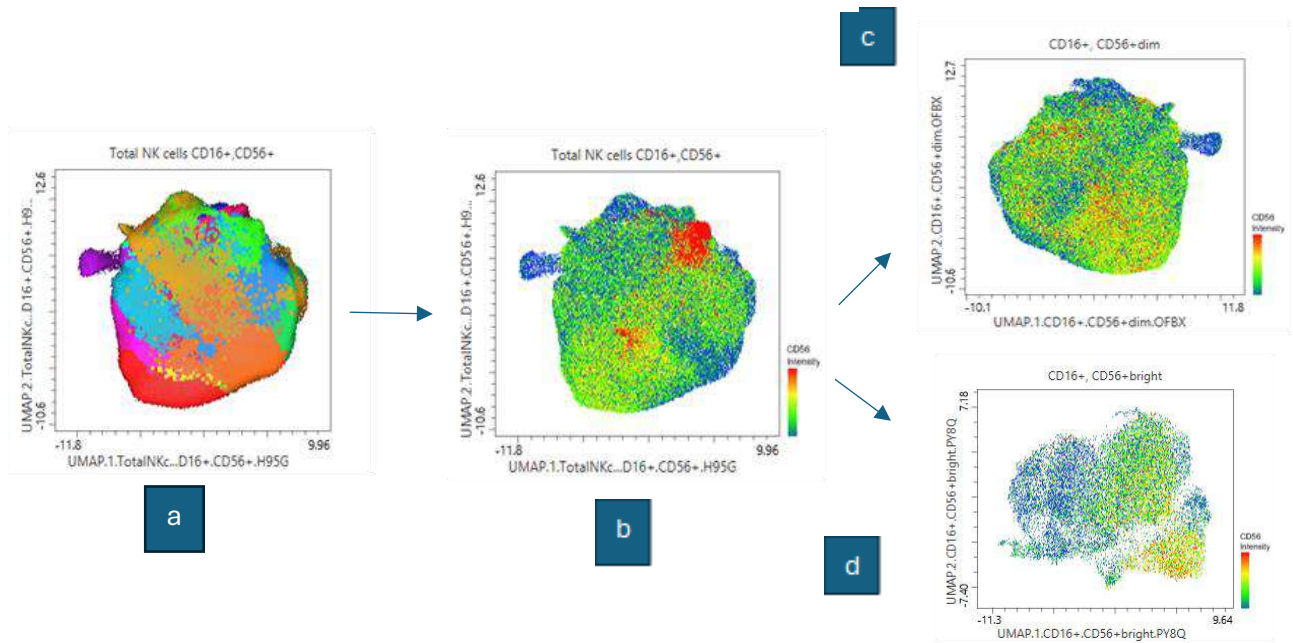
La expresión relativa de los distintos marcadores de superficie y funcionales en las células NK se evaluó mediante la intensidad media de fluorescencia (MFI, Mean Fluorescence Intensity), calculada a partir de las señales registradas en cada subpoblación. La MFI se utilizó como parámetro comparativo entre las distintas condiciones clínicas (pacientes moderados vs. severos) y entre subtipos celulares definidos por los algoritmos de clustering. Los valores de MFI se representaron gráficamente mediante diagramas de caja y bigotes, lo que permitió resumir la mediana, rango intercuartílico y valores extremos de cada marcador, facilitando la comparación visual entre grupos. Software usado; Excel y FlowJo del Equipo de Citometría.

Capítulo 4. Resultados

4.1 Caracterización del fenotipo de las células NK para tener una descripción general de la población de linfocitos NK implicados en la respuesta temprana a la infección de los pacientes hospitalizados.

Las células NK (Natural Killer) constituyen una subpoblación fundamental dentro del sistema inmunológico innato, reconocidas por su capacidad para eliminar células infectadas o transformadas sin la necesidad de sensibilización previa (Lanier, 2016; Vivier et al., 2014). Los gráficos UMAP reveló una clara segregación de las subpoblaciones de células NK basada en la expresión de CD16⁺ y CD56⁺, con patrones espaciales y de intensidad que reflejan su diversidad funcional (Figura 15).

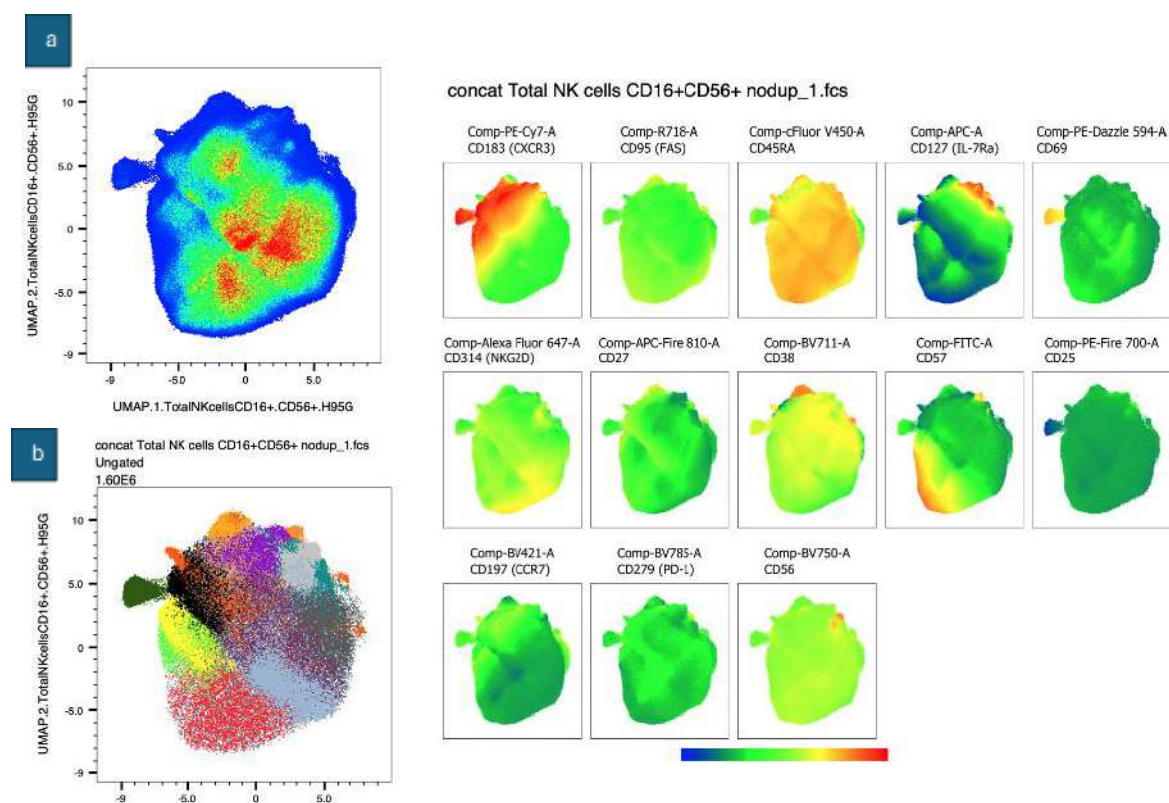
FIGURA 15 CÉLULAS POBLACIÓN TOTAL NK



a-Distribución UMAP de Población total de células NK con expresión de CD16⁺CD56⁺, donde cada color muestra un clúster definido según la expresión de los 14 marcadores analizados (CD183⁺, CD95⁺, CD45RA⁺, CD127⁺, CD69⁺, CD314⁺, CD27⁺, CD38⁺, CD57⁺, CD25⁺, CD197⁺, CD279⁺, CD56⁺, CD16⁺), b-posterior evaluación de intensidad de expresión de CD56⁺ y c-segregación en células NK^{dim} y d-células NK^{bright}.

Los resultados obtenidos exponen que las células NK $CD16^+CD56^+$ no representan una población uniforme, sino que se subdividen en numerosas agrupaciones que se distinguen por variados patrones de expresión de receptores de activación, maduración, migración y regulación inmunológica. La utilización de UMAP junto con mapas de expresión de marcadores posibilita la visualización del modo en que estas subpoblaciones se reparten en un espacio multidimensional, lo cual sugiere roles funcionales distintos dentro de la respuesta inmunitaria (Figura 16 y 17).

FIGURA 16 POBLACIÓN DE CÉLULAS NK
(GRÁFICO UMAP) 1 601 557 EVENTOS



Descripción: a- El mapa UMAP señala cada punto de una célula NK $CD16^+CD56^+$, manifestando colores con distintas intensidades en las células, desde azul (baja densidad) hasta rojo (alta densidad), señalando heterogeneidad fenotípica y de densidad dentro de la población NK. b- Se definió por color los 15 clústeres

basados en el algoritmo FlowSom (Figura 18). Cada color representa un subgrupo celular con un perfil de marcadores distintos, permitiendo la identificación de poblaciones funcionales o en estado de diferenciación. C-Cada recuadro muestra la intensidad de fluorescencia de 13 marcadores específicos (indicado en la parte de arriba del recuadro), con un código de colores (baja a alta expresión codificada del azul hacia verde, amarillo, naranja y rojo).

La concatenación de la población total de células NK CD16⁺CD56⁺ en un solo data set, permitió que algoritmos como FlowSom pudiese identificar poblaciones basadas en la expresión conjunta de múltiples marcadores: según la expresión de los 14 biomarcadores analizados en las células NK, se separaron las células en 15 clústeres.

FIGURA 17 CONCATENACIÓN DE TODAS LAS CÉLULAS NK

	Sample Name	Subset Name	Count
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_15	36479
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_14	3134
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_13	4.61E5
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_12	5275
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_11	9148
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_10	217398
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_9	68422
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_8	5718
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_7	15300
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_6	71975
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_5	142866
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_4	9466
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_3	69047
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_2	16820
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	FlowSOM.TotalNKcellsCD16+.CD56+.D7WI_1	4.69E5
	concat Total NK cells CD16+CD56+ nodup_1.fcs	Ungated	1.60E6

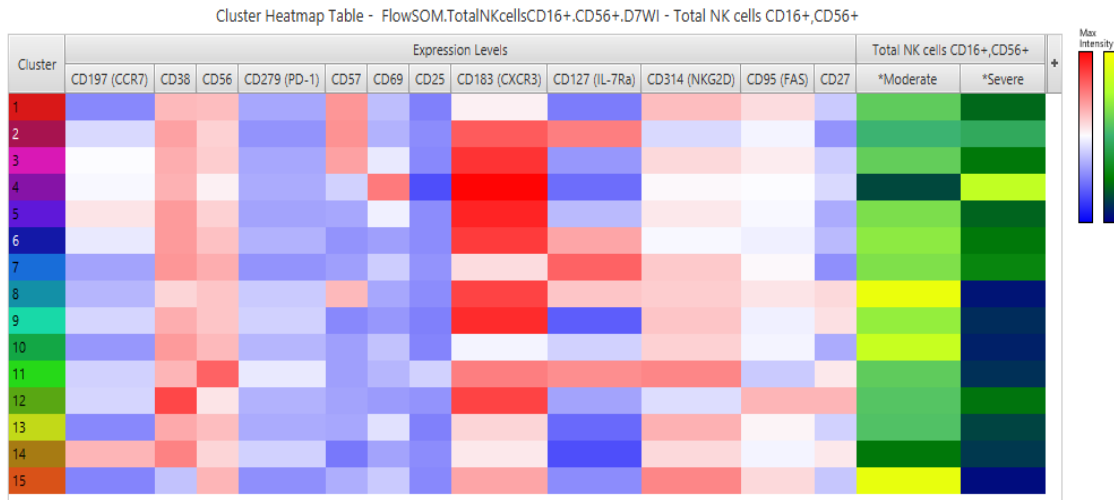
La tabla refleja los clústeres resultantes y el tamaño relativo de cada uno en el dataset concatenado. El celeste corresponde a la población total de NK que comprende todos los clústeres. FlowSOM de NK cel total: CD16⁺CD56⁺

La presencia de 15 clústeres sugiere que la población total de células NK es diversa, con subpoblaciones que expresan distintos patrones y niveles de marcadores. La identificación precisa de estos clústeres mediante herramientas como UMAP y FlowSOM permitió comprender mejor el repertorio inmunológico de personas hospitalizadas, ya que algunas subpoblaciones podrían ser responsables de una respuesta antiviral más eficiente, mientras

que otras podrían estar involucradas en la regulación o incluso en la disfunción inmunológica observada en casos severos de COVID-19. Así, el estudio detallado de estos clústeres no solo aporta información sobre la complejidad de la respuesta inmunitaria innata, sino que también puede guiar el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a potenciar los subtipos celulares más efectivos en el control de la infección. Por esta razón, el análisis de las células NK en el grupo de pacientes hospitalizados se completa por una comparación entre el perfil de los pacientes moderados y el de los pacientes severos para identificar los clústeres de subpoblaciones de células NK que varían entre estos dos subgrupos clasificados por la severidad de la enfermedad por COVID-19.

El mapa de calor de clústers generado mediante FlowSOM permite visualizar los niveles de expresión de diversos marcadores en las poblaciones de células NK CD16⁺/CD56⁺. Cada fila representó un clúster celular identificado de manera no supervisada, mientras que las columnas muestran la intensidad relativa de marcadores relevantes para activación, maduración e inhibición (ej. CD57⁺, CD25⁺, CD314⁺/NKG2D, CD95⁺). Los gradientes de color indican la variación en la intensidad media de fluorescencia (MFI), desde baja (azul) hasta alta (rojo) de cada uno de los marcadores en cada clúster (Figura 18).

FIGURA 18 CONCATENACIÓN DE TODAS LAS CÉLULAS NK

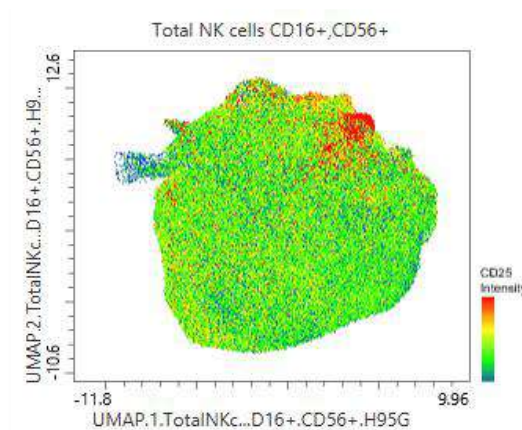


Grupos de células que comparten patrones similares de expresión de marcadores agrupadas en clúster mediante FlowSOM.

4.1.1 Marcador CD25⁺

En el análisis UMAP de las células NK CD16⁺CD56⁺, cada punto corresponde a una célula individual y la escala de color indica la intensidad de expresión de CD25⁺. En este caso se evidencia una expresión baja por la predominancia de verde, sin embargo, un grupo pequeño de células NK tienen una alta expresión de CD25⁺ a su superficie (marcadas en rojo) (Figura 20, estas corresponden a las células NK CD56^{bright}). El CD25⁺ (IL-2R α) forma parte del receptor de alta afinidad para IL-2 junto con CD122⁺ (IL-2R β) y CD132⁺, siendo esencial para la respuesta proliferativa y funcional de las NK frente a IL-2. La baja expresión de CD25⁺ observada sugiere una capacidad limitada de respuesta a IL-2 y de expansión clonal en la mayoría de las células NK, fundamentales en la inmunidad antiviral y antitumoral.

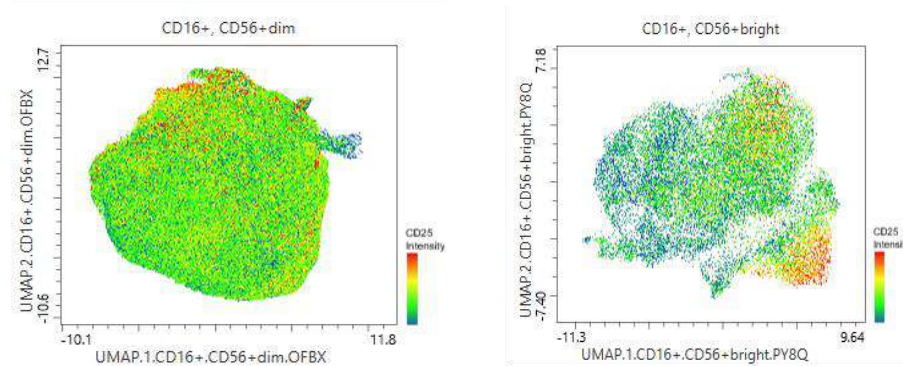
FIGURA 19 INTENSIDAD DE EXPRESIÓN DE CD25



Intensidad de expresión de CD25⁺ (IL-2R α) en las células NK totales según el código de colores, en el cual el color rojo indica alta intensidad y el azul baja intensidad.

La expresión del marcador CD25⁺ (IL-2R α) en células NK CD16⁺CD56^{dim}, actúa como cofactor de crecimiento y migración. Según su intensidad, tuvo un nivel de aparición en las células NK de pacientes COVID-19 hospitalizado, de intensidad intermedia, con pocos puntos de intensidad elevada (Figura 20). Por la frecuencia observada mayormente de intensidad intermedia, podría decir que es una población que mantiene una capacidad moderada de respuesta a IL-2. Células NK CD16⁺CD56^{bright}, son menos homogéneas, observando que un grupo con una expresión baja de CD25⁺ (azul) y un grupo con mayor cantidad de receptores (naranja, rojo) (Figura 19), confirmando lo observado en la población general de NK (Figura 20). El alto nivel de expresión de CD25⁺ en estas células, indica mayor capacidad de respuesta a IL-2 y de proliferación, sugiriendo que son las células menos maduras.

FIGURA 20 CONCATENACIÓN DE TODAS LAS CÉLULAS NK

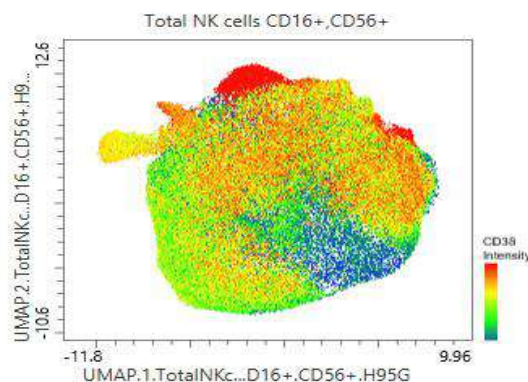


Subpoblaciones de células NK $CD16^+CD56^{dim}$ (izquierda) y $CD16^+CD56^{bright}$ (derecha) centrado en la intensidad de expresión del marcador CD25.

4.1.2 Marcador CD38⁺

La expresión de $CD38^+$ en células NK se ha vinculado a la activación, la inducción de actividad citotóxica y la secreción de $IFN-\gamma$. Se ha demostrado que $CD38^+$ controla estos procesos celulares mediante su actividad receptora, una función que depende de su asociación lateral con $CD16^+$ (Figura 21).

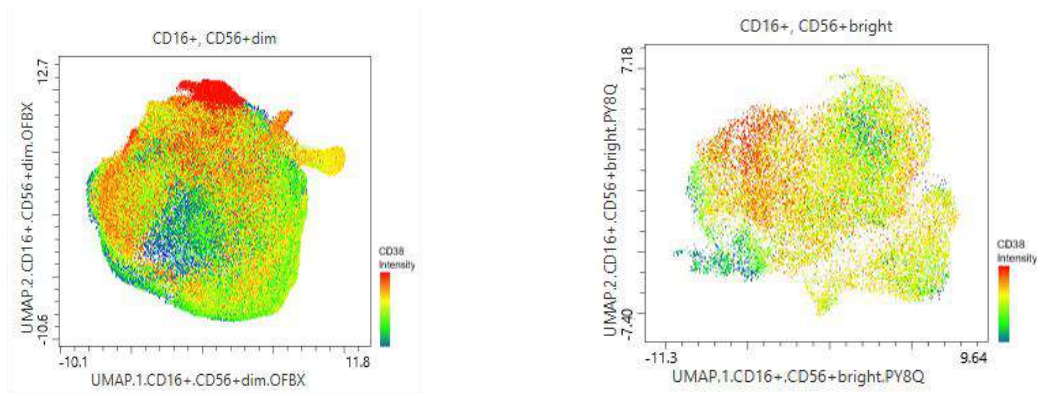
FIGURA 21 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16+CD56+CD38+



La expresión de CD38⁺ en células NK está estrechamente vinculada a su activación, diferenciación y funcionalidad efectora.

El marcador CD38⁺, un indicador clave de activación celular y metabolismo, reveló distintos patrones de expresión entre las subpoblaciones de células NK analizadas mediante UMAP. Las células NK en estado de reposo o con características de memoria típicamente presentan bajos niveles de CD38⁺. A pesar de los anterior, cuando estas células se activan o entran en proliferación al ser estimuladas por citocinas como IL-2 o IL-15, incrementan significativamente su expresión de CD38⁺. Al analizar los patrones de distribución en el UMAP, probablemente correspondan a células NK en estado efector, y de manera interesante las células CD38⁺ se encuentran entre diferentes clústeres de las células NK CD56^{dim}. Estas células activadas despliegan toda su capacidad citotóxica y productora de citocinas. Las células con baja o nula expresión de CD38^{+/-} dentro de estas mismas regiones densas probablemente representen un fenotipo más regulador o en estado de reposo. Estas células mantienen una actividad citotóxica reducida, posiblemente funcionando como reservorio o participando en funciones inmunorreguladoras.

FIGURA 22 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56 DIM VS BRIGHT CD38



La expresión de CD38 en células NK se ha vinculado a la activación, la inducción de actividad citotóxica y la secreción de IFN- γ . Se ha demostrado que CD38 controla estos procesos celulares mediante su actividad receptorial, una función que depende de su asociación lateral con CD16.

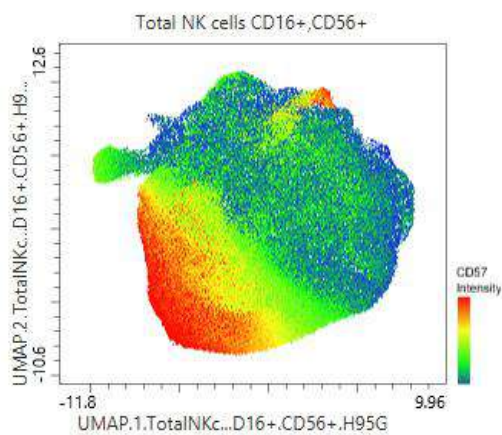
Subpoblaciones NK dim con CD38 elevado, pueden ser células activadas (respuesta a IL-2) o con metabolismo acelerado (regulación de NAD⁺ para citotoxicidad). Las células CD56^{dim} tienen una expresión heterogénea de CD38⁺, la mayoría tienen una expresión moderada alta, con un subgrupo de expresión muy alta, mientras que el subgrupo con baja expresión es pequeño (Figura 22). La expresión de CD38⁺ sugiere una exposición reciente a IL-15. En el caso de las células NK CD56^{bright}, la mayoría tiene una expresión moderada, lo que sugiere interacción con células dendríticas. Su respuesta inmune, está asociado a la modulación de respuestas por adenosina cuya capacidad está para influir en diversas funciones fisiológicas a través de su interacción con receptores específicos.

4.1.3 Marcador CD57⁺

Las células NK tienen una expresión heterogénea de CD57, que van desde la no expresión (células menos maduras sin activación previa) hasta una expresión muy alta (Figura 23). El marcador CD57⁺ es relevante ya que se asocia con las células NK maduras o en estadios avanzados de diferenciación, lo que sugiere que las células con alta expresión de CD57⁺ podrían representar subpoblaciones especializadas en funciones efectoras.

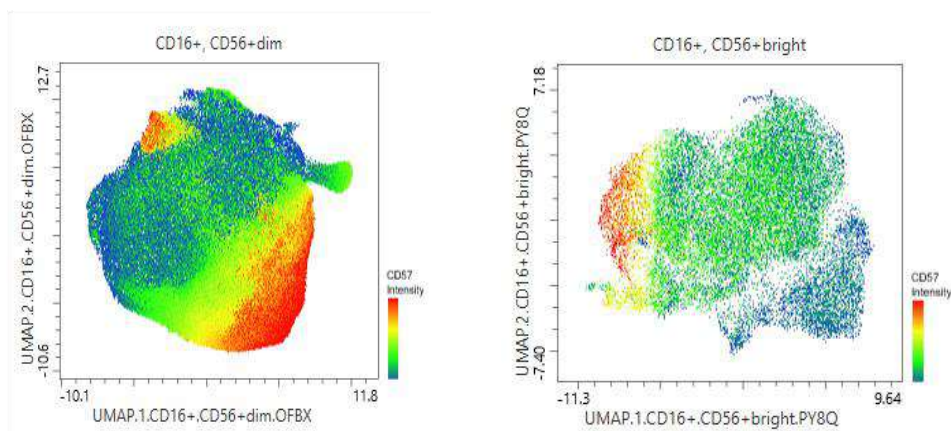
La expresión de CD57⁺ en células NK se ha vinculado a la activación de células altamente diferenciadas, con menor capacidad proliferativa pero mayor actividad citotóxica (perforina, granzimas). La expresión del marcador CD57⁺ en células NK CD16⁺CD56^{dim}, manifiesta una diferenciación terminal / agotamiento funcional (exhausto). En el entorno del COVID-19 agudo expresan CD57⁺, aumentan en su frecuencia, sobre todo en aquellos enfermos con una condición grave. Esta población diferenciada en fase terminal, tienen una capacidad de proliferación restringida pero un estado de activación alto es decir son células que ya no proliferan, pero pueden mantener o incluso aumentar la citotoxicidad. En células NK CD16⁻CD56^{bright}, la ausencia de clúster rojos, refleja su rol no citotóxico (Figura 24); sin embargo, un análisis más detallado dentro de este grupo de NK, muestra que un subgrupo pequeño de CD16⁻CD56^{bright} comienza a expresar CD57⁺ a su superficie, tal vez las que están en diferenciación hacia CD16⁺CD56^{dim} (Figura 24).

FIGURA 23 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺ CD57⁺



Análisis UMAP de células NK CD16⁺CD56⁺CD57⁺ mostrando su distribución

FIGURA 24 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56 DIM VS BRIGHT CD57

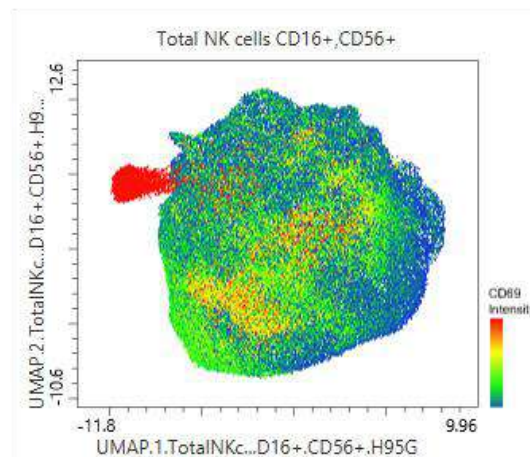


Subpoblaciones de células NK centrado en la expresión del marcador CD57⁺

4.1.4 Marcador CD69⁺

CD69⁺ es un marcador de activación y representan células en estado activado con capacidad tanto para secretar citocinas como IFN- γ como para ejercer funciones citotóxicas frente a células infectadas. La mayoría de las células NK no expresan o expresan niveles bajos e intermedios de CD69⁺, mostrando diferentes niveles de activación (Figura 25). Los clústeres aislados con alta intensidad de expresión de CD69⁺ (rojas) podrían ser células con alta afinidad por antígenos virales y ser las primeras en infiltrar tejidos infectados (ej.: pulmón).

FIGURA 25 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD69⁺

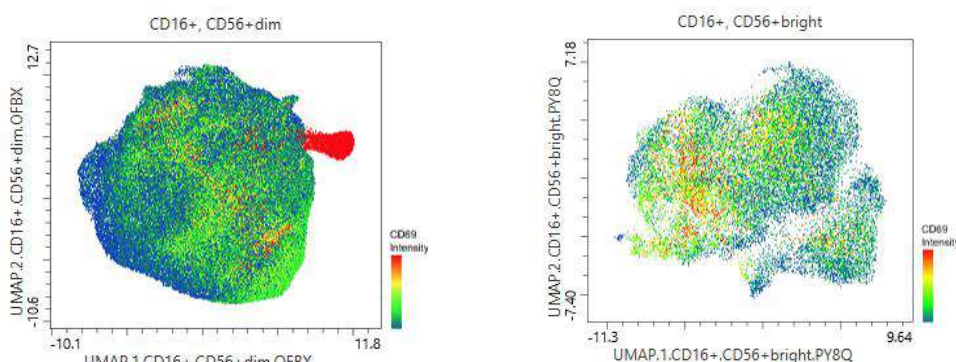


Los clústers aislados podrían ser células con alta afinidad por antígenos virales. Las células NK con alta CD69⁺ (rojas) pueden ser las primeras en infiltrar tejidos infectados (ej.: pulmón).

Este pequeño grupo de células con alta expresión del marcador CD69⁺ son todas células NK CD16⁺CD56^{dim} (Figura 25), y probablemente representan NK citotóxicas activadas tempranamente, probablemente en respuesta a contacto directo con células infectadas por

SARS-CoV-2. En etapas iniciales, estas células son críticas para controlar la replicación viral. En COVID-19 casos severos (Malengier-Devlies *et al.*, 2022a), su activación persistente puede contribuir a daño tisular. En la distribución de la población con expresión baja de CD69 (color azul) refiere un perfil citotóxico disminuido. Células NK CD16⁺CD56^{bright}, son células recién activadas para producir citocinas (IFN- γ , TNF- α) en ganglios linfáticos y su migración a tejidos inflamados se debe en respuesta a quimiocinas y por ende expresan niveles intermedios de CD69 (Figura 26).

FIGURA 26
COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD69⁺



Las células CD56^{bright} (relacionadas a la producción de citocinas) presentan una expresión mayor de CD69 (tonos cálidos), lo que indica un estado basal más activo o dispuesto a reaccionar a estímulos.

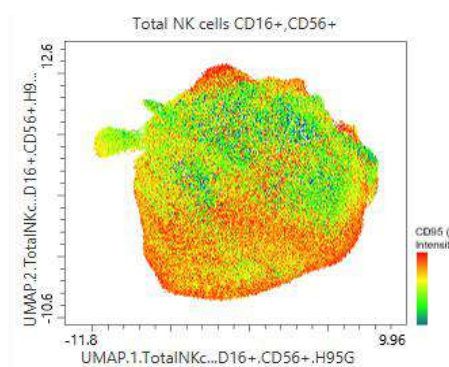
En cambio, las células CD56^{dim} (citotóxicas) poseen niveles reducidos de CD69 (tonos fríos), lo cual podría indicar que requieren señales extras para su activación.

4.1.5 Marcador CD95⁺

El marcador CD95⁺ es un receptor que participa en la apoptosis; no obstante, también tiene una función en la regulación de la respuesta inmunitaria, ya que genera IFN- γ al interactuar con su ligando, el FasL. Las células NK tienen una expresión heterogénea, la mayoría con una expresión intermedia a alta. La expresión de FasL se eleva en las células NK CD56^{dim}

(Figura 28), particularmente en subpoblaciones que han sido activadas por citocinas como IL-2 o IL-15. En las células NK CD56^{bright}, por el contrario, la expresión basal de FasL es baja, y muy pocas tienen un nivel intermedio/alto de expresión (Figura 27); probablemente puede ser un aumento en respuesta a IFN- γ . Esto indica que existe un mecanismo de regulación diferencial entre estas subpoblaciones

FIGURA 27 CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺ CD69⁺

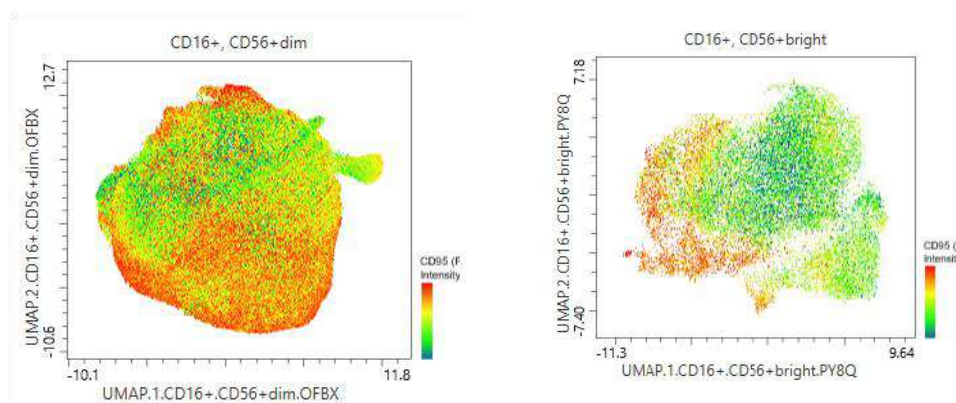


Distribución Heterogénea de Células NK CD16⁺CD56⁺ CD95⁺ en UMAP

CD56^{dim}, las células NK CD95⁺ evidencian un estado de activación crónica y pre-apoptótico ante el estrés inflamatorio. En el COVID-19 agudo, su incremento se vincula con la exhausto inmunológica en situaciones severas. Las NK CD56^{bright} muestran una expresión de CD95 baja y homogénea (tonos verdes/azules), con focos aislados de alta expresión (rojos) que indican subpoblaciones en funcionamiento (Figura 28). Desde el punto de vista funcional, estas células CD95⁺ pueden simbolizar: 1) una fase transitoria hacia la diferenciación CD56^{dim}, o 2) una reacción a interferones de tipo I durante infecciones virales. Su escasa expresión de CD95 las hace más robustas ante la apoptosis, facilitándoles el mantenimiento

de funciones reguladoras fundamentales como la generación de IFN- γ . Esta particularidad es especialmente significativa en reacciones antivirales como la COVID-19.

FIGURA 28 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺ CD95⁺



Comparación de la expresión del marcador CD95 (Fas) en células NK CD56^{dim} (izquierda) y CD56^{bright} (derecha) mediante análisis UMAP, mostrando diferencias en la intensidad de expresión (gradiente de color)

4.1.6 Marcador CD197⁺

La presencia del marcador CD197 (también conocido como CCR7) en células NK es clave por su capacidad de migrar hacia ganglios linfáticos, guiadas por señales quimiotácticas (Taborda *et al.*, 2014). Este proceso resulta fundamental en la coordinación de la respuesta inmune, ya que permite que las células NK recién activadas en sangre periferia se desplacen a zonas donde pueden interactuar con otras células inmunitarias, facilitando la regulación y el refuerzo de la defensa antiviral. En de infecciones como COVID-19, ayuda a identificar subpoblaciones capaces de responder a quimiocinas, lo que puede estar relacionado con la eficacia en el control de la inflamación y la resolución de la infección. Sólo un número bajo

de NK expresan CD197 a niveles altos, la mayoría no expresa o solo a niveles bajo, este marcador (Figura 29).

FIGURA 29 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD197⁺

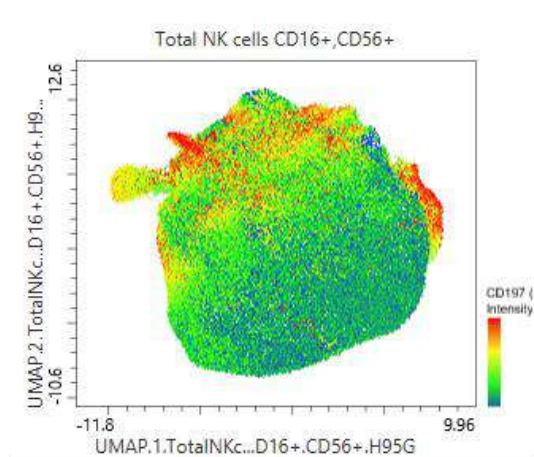
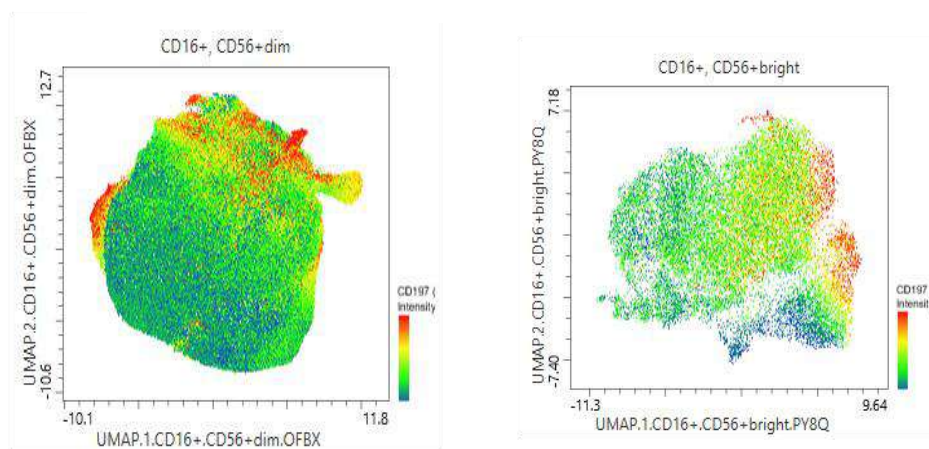


Gráfico de dispersión muestra la distribución de células NK según la expresión de los marcadores CD16⁺, CD56⁺ y CD197⁺

Se comparó las dos subpoblaciones de células NK según su expresión de los marcadores CD16⁺, CD56⁺ y CD197⁺ y tanto las CD56^{dim} como las CD56^{bright} en su mayoría no expresan o expresan niveles bajos de CD197, aunque la subpoblación de CD56^{dim} que expresan niveles altos de CD197 es más abundante que en las CD56^{bright} (Figura 30).

FIGURA 30 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD197⁺



Análisis comparativo de dos subpoblaciones de células NK (Natural Killer) mediante gráficos de dispersión basados en la expresión de los marcadores CD16⁺, CD56⁺ y CD197⁺. El gráfico izquierdo muestra células con expresión tenue (dim) de CD56, mientras que el derecho presenta células con expresión brillante (bright) del mismo marcador.

4.1.7 Marcador CD127⁺

Receptor de IL-7 que regula la supervivencia y homeostasis. Esta supervivencia y proliferación se puede observar en estadio temprano. La señalización a través del receptor de IL-7, que está intermediada por CD127, no solo fomenta la proliferación clonal de las células NK en desarrollo, sino que asimismo les otorga resistencia a la apoptosis, lo cual facilita que se mantengan en los nichos hematopoyesis. Un subgrupo de las NK expresa niveles altos de CD127 (en rojo), otras tienen una expresión moderada (verde, amarillo) y otro grupo no expresa ese marcador (azul) (Figura 31).

FIGURA 31 CÉLULAS NK TOTAL CD16⁺ CD56⁺CD127⁺

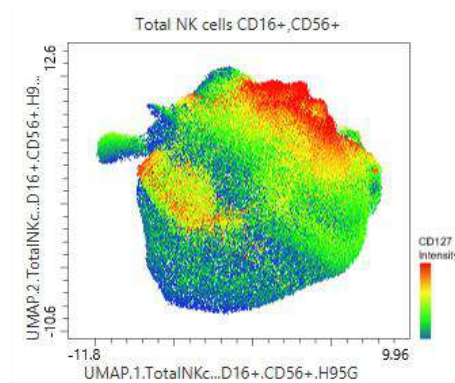
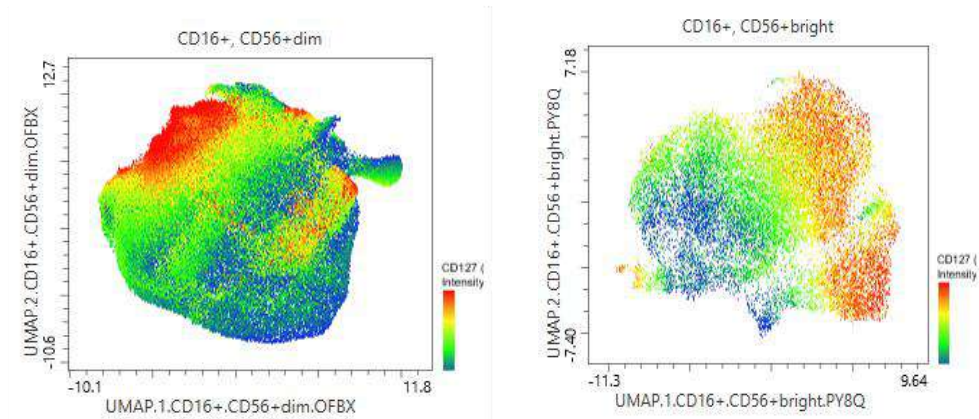


Gráfico de dispersión muestra la distribución de células NK según la expresión de los marcadores CD16⁺, CD56⁺ y CD197⁺.

La señalización a través del receptor de IL-7, que está intermediada por CD127 (*Chretien et al., 2021*), no solo fomenta la proliferación clonal de las células NK en desarrollo, sino que asimismo les otorga resistencia a la apoptosis, lo cual facilita que se mantengan en los nichos hematopoyéticos. Allí pueden recibir señales y factores que favorecen su desarrollo y especialización, antes de migrar a otros tejidos. Un subgrupo de las CD56^{dim} tenía una expresión alta, aunque la mayoría tenga una expresión media, baja o nula, mientras que en las CD56^{bright}, la mayoría expresa CD127⁺ a niveles intermedios o altos, y como menos del tercio tiene una expresión nula (Figura 32).

FIGURA 32 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD127⁺

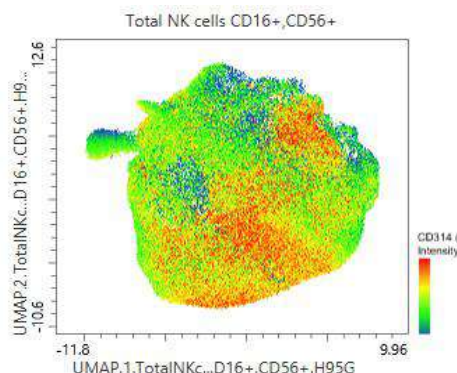


Subpoblación CD56^{dim} a la izquierda, puede estar reflejando la presencia de diferentes estadios de maduración o activación. La Subpoblación CD56^{bright} presenta un distribución más homogénea y uniformidad en el perfil de expresión.

4.1.8 Marcador CD314⁺

El receptor CD314⁺ (NKG2D) es una molécula clave en la activación de células NK. Pertenece a la familia de lectinas tipo 2, es una glucoproteína transmembrana que actúa como un receptor de activación y co-estimulación. Su interacción con el DAP (proteína adaptadora con función de señalización) desencadena procesos esenciales en la respuesta inmunitaria (desgranulación, Citotoxicidad y producción de citocinas), lo cual potencia la capacidad efectora (Silva *et al.*, 2008). La expresión de este receptor activador es bastante heterogénea dentro de las células NK, con una expresión que va desde alta a nula (Figura 33).

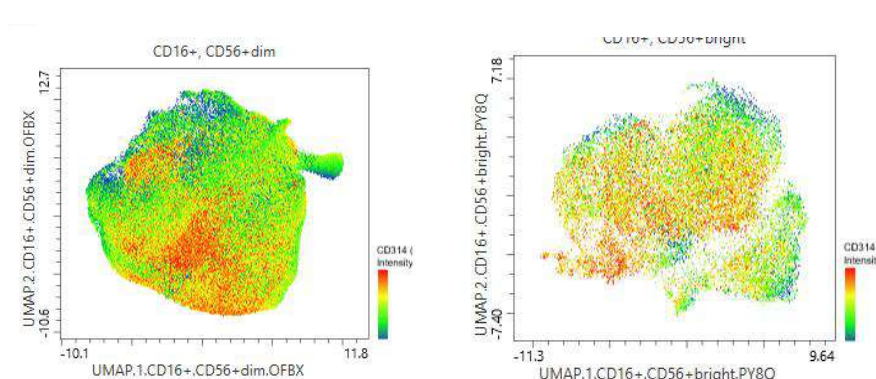
FIGURA 33 CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺ CD314⁺



Distribución Heterogénea de Células NK CD16⁺CD56⁺ CD314⁺ en UMAP

El contraste entre las subpoblaciones dim y bright de CD56, junto con la presencia del receptor de activación CD314⁺ (NKG2D), permite identificar distintas fases de maduración y activación, así como capacidades citotóxicas y reguladoras de estas células. Las células CD56^{dim} comprenden subgrupos pequeños con expresión nula, ya que la mayoría tiene una expresión baja/intermedia con un subgrupo bastante grande con expresión alta de NKG2D (Figura 34). Por el otro lado, la mayoría de las NK CD56^{bright} tienen una expresión intermedia/alta de NKG2D. Mediante el estudio comparativo de estos fenotipos, se revelan patrones precisos de respuesta inmunitaria, fundamentales para comprender la dinámica celular en estados de salud y enfermedad, especialmente en contextos clínicos como la infección por SARS-CoV-2, donde la alteración de estos perfiles puede asociarse a desenlaces clínicos adversos y abre la puerta a nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

FIGURA 34 COMPARACIÓN CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD314⁺

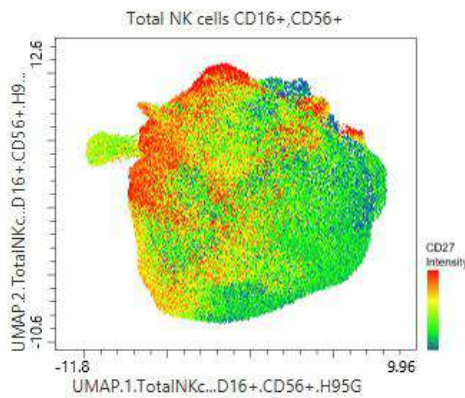


Comparación de subpoblaciones de células NK en función de la expresión de CD314⁺ (NKG2D)

4.1.9 Marcador CD27⁺

La expresión de CD27⁺ permite dividir las células NK en dos subconjuntos distintivos: uno con alta capacidad migratoria y respuesta efectora rápida (CD27⁺), y otro con menor movilidad, pero mayor citotoxicidad sostenida (CD27⁻). Esta dicotomía no solo refleja la plasticidad de las células NK en respuesta a microambientes tisulares (*Silva et al., 2008*). La mayoría de las células NK de los pacientes COVID-19 analizados tienen una expresión intermedia o alta de CD27⁺, mientras que el grupo con expresión nula es minoritario (Figura 35).

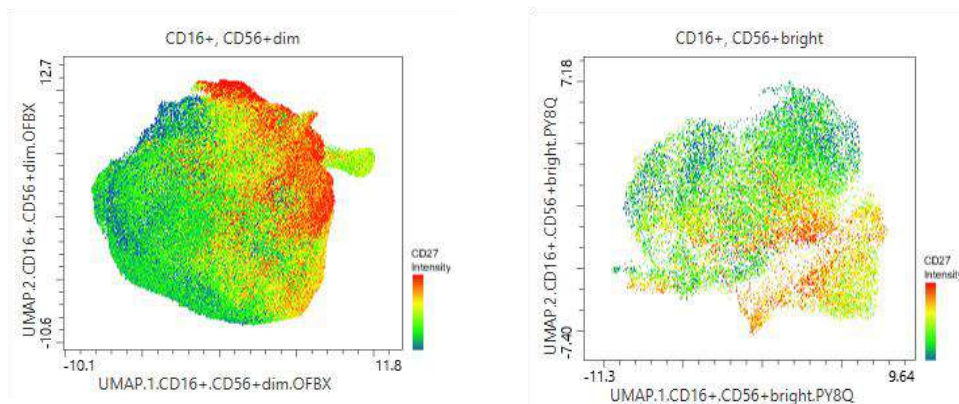
FIGURA 35 CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺ CD27⁺



El estudio señala que la intensidad de expresión del color para el marcador CD27 se basa en un gradiente dinámico que va desde alta expresión (color rojo) a baja expresión (color verde).

Al analizar las subpoblaciones de células NK CD16⁺CD56⁺ dim y bright conforme a la expresión de CD27⁺, se encuentran diferencias fenotípicas y funcionales que tienen un impacto en la clínica. Las células NK CD56⁺dim CD27⁺ (tanto las CD27^{low} como las CD27^{high}) tienen una capacidad citotóxica más alta y reaccionan con rapidez a las células infectadas o tumorales, lo que las convierte en un elemento clave de la respuesta inmunitaria innata, sobre todo en los momentos críticos de infecciones virales, como la provocada por el SARS-CoV-2. En cambio, las células NK CD56^{bright} CD27⁺, que son la minoría en nuestro grupo de pacientes (Figura 36), tienen propiedades de regulación, que se ocupan sobre todo de la producción de citocinas y la modificación del ambiente inmunológico, ayudando a conservar la homeostasis y a controlar la inflamación desmedida.

FIGURA 36 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD27⁺



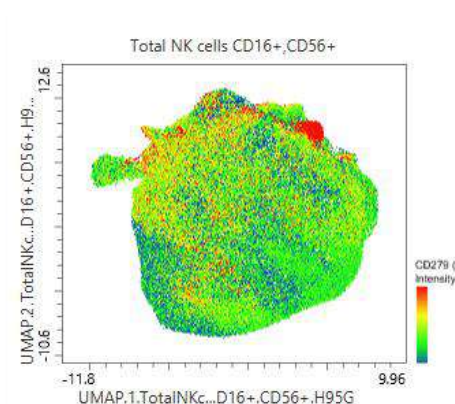
Comparación de subpoblaciones de células NK mediante UMAP. La intensidad del color refleja los niveles de CD27, marcador asociado a funcionalidad y maduración.

4.1.10 Marcador CD279⁺

El CD279⁺, también denominado PD-1 (programmed cell death protein 1), es un receptor inmunorregulador que se manifiesta en la superficie de diversas células del sistema inmune, incluyendo las poblaciones de células NK. Su principal tarea consiste en regular la respuesta inmunológica, funcionando como un "freno" que evita una activación excesiva y la autoinmunidad. En el marco de la infección por SARS-CoV-2, la manifestación de CD279⁺ en células NK puede incrementarse como un mecanismo de retroalimentación negativa frente a una inflamación que persiste, lo cual puede colaborar con el desgaste funcional de dichas células. Este fenómeno significa que la capacidad citotóxica decrece y que la producción de citocinas se reduce, lo cual puede estar relacionado con una respuesta inmune menos eficiente frente al avance de la enfermedad (*Messal et al., 2011; Silva et al., 2008*). En nuestra

población de pacientes COVID-19, la mayoría de las células NK expresan niveles bajos e intermedios de CD279, sin embargo, un subgrupo tiene una expresión alta de este marcador (Figura 37), sugiriendo que estas células pueden estar entrando en agotamiento.

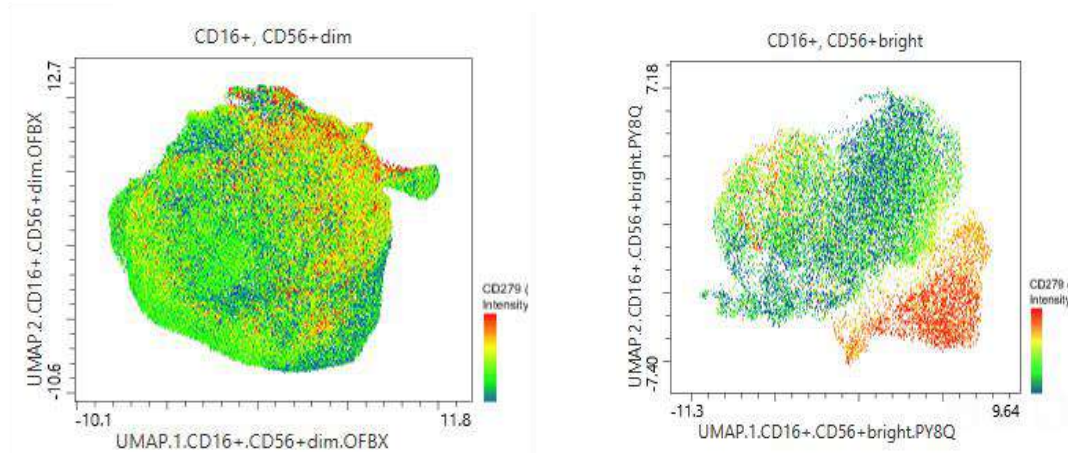
FIGURA 37 CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD279⁺



La expresión de CD279 (PD-1) en células NK totales positivas para CD16⁺CD56⁺, donde la intensidad del color refleja los niveles de CD279

En las CD56^{dim}, las células que expresan CD279⁺ son minoritarias, mientras que en las CD56^{bright} por lo menos un tercio tiene una expresión alta, mientras que dos tercios tienen una expresión nula o intermedia (Figura 38). Esto sugiere, que dentro de la enfermedad de COVID-19, las CD56^{bright}, que son menos maduras y expresan sobre todo la respuesta de citocinas, son más sensibles a la exhaustión o a la retroalimentación negativa de CD279.

FIGURA 38 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD279⁺

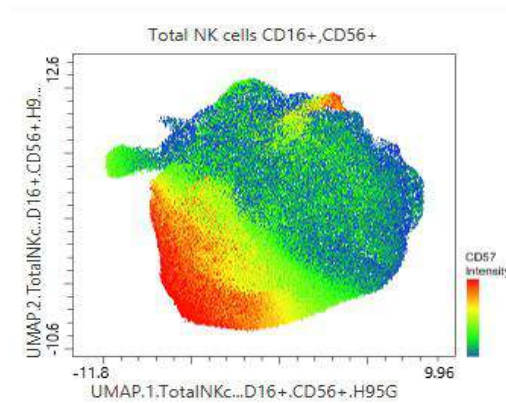


Comparación de poblaciones de células NK según la expresión de marcadores CD16⁺, CD56⁺ y CD279⁺. La imagen compara células dim y bright, mostrando diferencias en la expresión de CD279 (PD-1), relevante para su función y agotamiento en este contexto, infección por SARS-CoV-2.

4.1.11 Marcador CD57⁺

La presencia de CD57⁺ se asocia comúnmente con etapas avanzadas de diferenciación y maduración celular. En las células NK, la expresión de CD57⁺ caracteriza una población con un fenotipo más terminal, reflejando células que han experimentado múltiples rondas de activación y proliferación. Estas células NK CD57⁺ tienden a exhibir una capacidad citotóxica incrementada y una menor potencialidad para la proliferación, lo que sugiere que desempeñan funciones efectoras predominantes, especialmente en contextos de infecciones virales crónicas o cáncer (*Kared et al., 2016*). En los pacientes COVID-19 del estudio, la expresión de CD57⁺ en las células NK es bastante heterogénea con una mayoría con expresión intermedia o nula, mientras hay una población bastante representativa con una expresión alta de CD57⁺ (Figura 39).

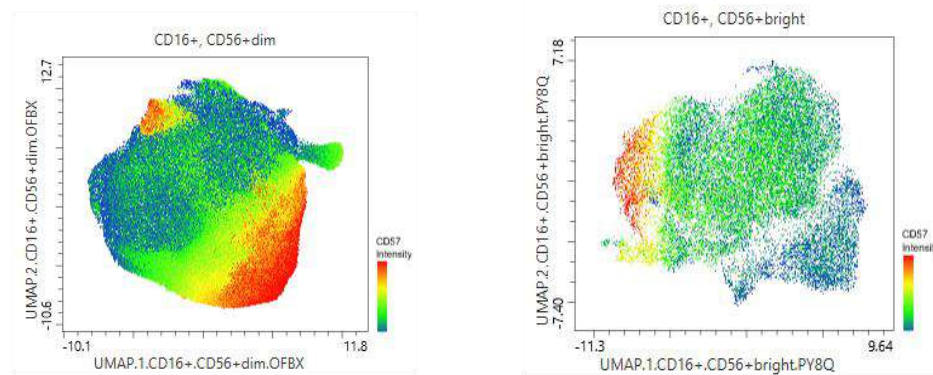
FIGURA 39 CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD57⁺



Distribución de células NK totales positivas para CD16⁺CD56⁺, estratificadas por la expresión de CD57 (marcador de senescencia o maduración terminal).

La mayoría de estas células CD57⁺ son parte de las CD56^{dim} más maduras como esperado; sin embargo, un subgrupo pequeño de CD56^{bright} también expresan CD57⁺, lo que no es común en un contexto sano, ya que CD57⁺ se asocia con la maduración y activación de las CD56^{dim} (Figura 40). Esto sugiere un fenotipo no funcional.

FIGURA 40 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD57⁺

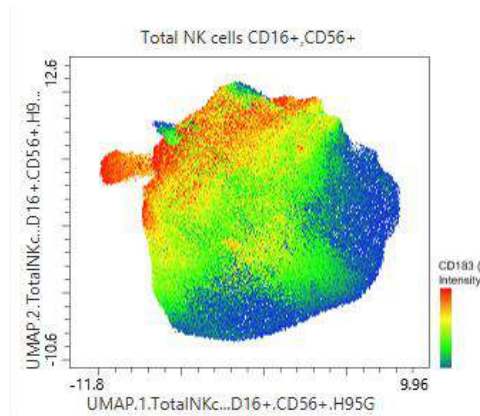


Células CD56^{dim} CD57⁺ población con un fenotipo más diferenciado y/o citotóxico. Células CD56^{bright} CD57⁺población vinculada a funciones reguladoras o memoria inmunológica.

4.1.12 Marcador CD183⁺

CD183 (CXCR3) es un receptor de quimiocinas presente en diversas células inmunitarias, entre ellas las células NK, con un rol esencial en dirigir su migración hacia focos de inflamación o infección. Al unirse con sus ligandos CXCL9, CXCL10 y CXCL11, este receptor promueve el reclutamiento selectivo de células NK hacia regiones específicas en respuesta a señales químicas emitidas durante condiciones patológicas, como infecciones virales o desarrollo tumoral. La presencia de CD183⁺ en diferentes subpoblaciones de células NK permite reconocer patrones vinculados a la gravedad de la enfermedad, lo que lo posiciona como un potencial biomarcador para anticipar desenlaces clínicos y guiar decisiones terapéuticas personalizadas. Por ello, un análisis exhaustivo de CD183⁺ y de sus funciones resulta fundamental para profundizar en la comprensión de la respuesta inmunológica en enfermedades infecciosas, además de contribuir al diseño de estrategias que optimicen la migración y la actividad citotóxica de las células NK en los momentos en que resulta más necesario. La expresión de CD183⁺ es bastante heterogénea entre las células NK, la mayoría tiene expresión intermedia, y las células con expresión nulas son más frecuentes que las con una expresión alta (Figura 41).

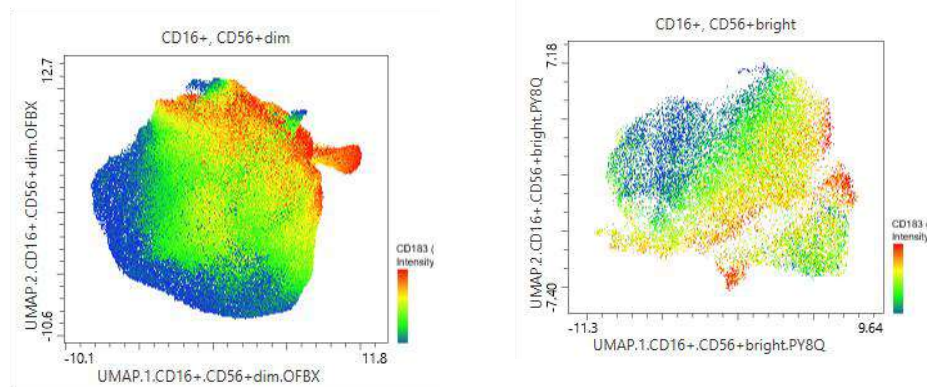
FIGURA 41 CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD183⁺



En el análisis del gráfico se muestra la distribución de células NK totales positivas para CD16⁺CD56⁺, donde la intensidad del color refleja los niveles de CD183, un receptor clave para la migración hacia tejidos inflamados.

El análisis UMAP muestra significativas modificaciones en la expresión de CD183⁺ (CXCR3) entre las subpoblaciones de células NK CD56^{bright} y CD16⁺CD56^{dim}. (Figura 42). Las células CD56^{dim} presentan una expresión de CD183⁺ más heterogénea, con agrupaciones de células con alta expresión de CD183⁺ bien definidas que apuntan a subpoblaciones funcionales enfocadas en la migración y la respuesta inflamatoria.

FIGURA 42 COMPARACIÓN DE CÉLULAS NK CD16⁺ CD56⁺CD183⁺

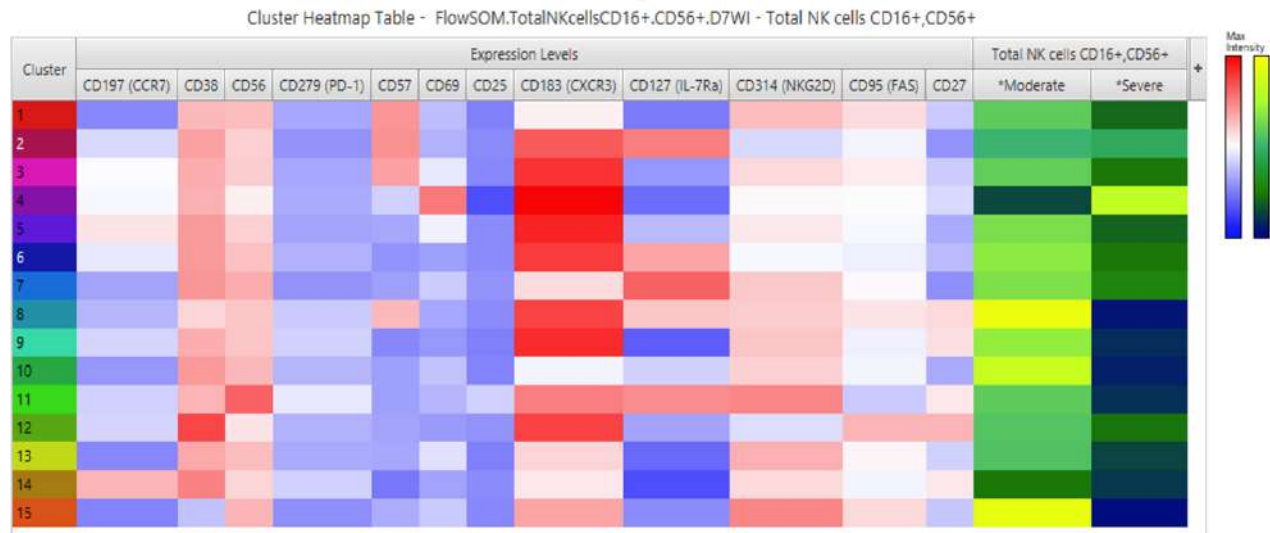


Comparación de la expresión de CD183⁺ (CXCR3) en subpoblaciones de células NK CD16⁺CD56⁺

4.2 Determinación de biomarcadores de mayor expresión en las células NK para indicar asociación de severidad de la enfermedad por SARS-COV-2.

Analizar los biomarcadores de expresión en células NK que se relacionan con la gravedad de la infección por SARS-CoV-2, es un elemento crucial para entender las diferentes condiciones clínicas que surgen a lo largo de la enfermedad. Estos marcadores no solamente posibilitan definir el nivel de activación o disfunción de las células NK, sino que asimismo brindan información esencial acerca de los procesos inmunológicos que están detrás del avance clínico. El mapa de calor de FlowSOM reveló 15 subpoblaciones de células NK total $CD16^+CD56^{dim}$ con perfiles únicos de marcadores, con una distribución inmunitaria en estadio o condiciones clínicas de moderado a severo. Con este reconocimiento se busca mejorar la comprensión de la enfermedad asociada a infección por COVID-19, promoviendo el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas e identificación oportuna de quienes presentan mayor riesgo de complicaciones (Figura 43).

FIGURA 43 MAPA DE CALOR DE CLUSTERS CELULARES CÉLULAS CD16⁺ CD56⁺



El mapa de calor evidencia una heterogeneidad inmunofenotípica dentro de las células NK

En la parte derecha, se comparan los clústers entre pacientes con cuadros moderados y severos, lo que evidencia diferencias fenotípicas y funcionales en las subpoblaciones de NK asociadas al grado de severidad clínica de la infección por SARS-CoV-2. Al describir los grupos categorizado como moderados y severos (en el gráfico: “Moderate”, “Severe”), se identificaron clústeres de células NK con expresión diferencial, lo cual sugirió posibles implicaciones biológicas relevantes en la progresión de la enfermedad. Se observa una gran diversidad de clústeres entre ambos grupos de pacientes. En los pacientes con cuadro severo, se destaca una mayor presencia del clúster 4, que corresponden a células NK CD56^{dim} altamente activadas, con expresión media de CD38⁺, con alta expresión del receptor de quimiocina CXCR3, o sea que tienen una alta capacidad migratoria, y sobre todo, las células del clúster 4 son las únicas que expresan un alto nivel de CD69, indicando una fuerte activación de las células NK en actividad temprana en el grupo severo.

En los pacientes con cuadro moderado se destaca la mayor presencia de los clústeres de células NK CD56^{dim}: 8 (CD27⁺ CD127⁺ CD38⁺ CXCR3^{hi}CD95⁺NKG2D⁺CD57⁺), 15 (CD27⁺CXCR3⁺CD95⁺NKG2D⁺) y 10 (CD38⁺CXCR3^{lo}CD95^{lo}NKG2D⁺), todas positivas para el recetor activador de las células NK NKG2D, y con diferentes niveles de expresión del receptor de CXCR3 y del receptor de muerte celular CD95⁺.

El análisis de los clústeres mostró patrones de expresión heterogéneos y en algunos casos se observó la sobreexpresión simultánea de múltiples marcadores de activación, lo que sugirió la presencia de subpoblaciones altamente activadas y posiblemente implicadas en la respuesta inflamatoria exacerbada. En contraste, otros clústeres se caracterizaron por una expresión disminuida de manera global, lo que pudo asociarse a poblaciones con menor funcionalidad o señalar distintos estados de diferenciación celular.

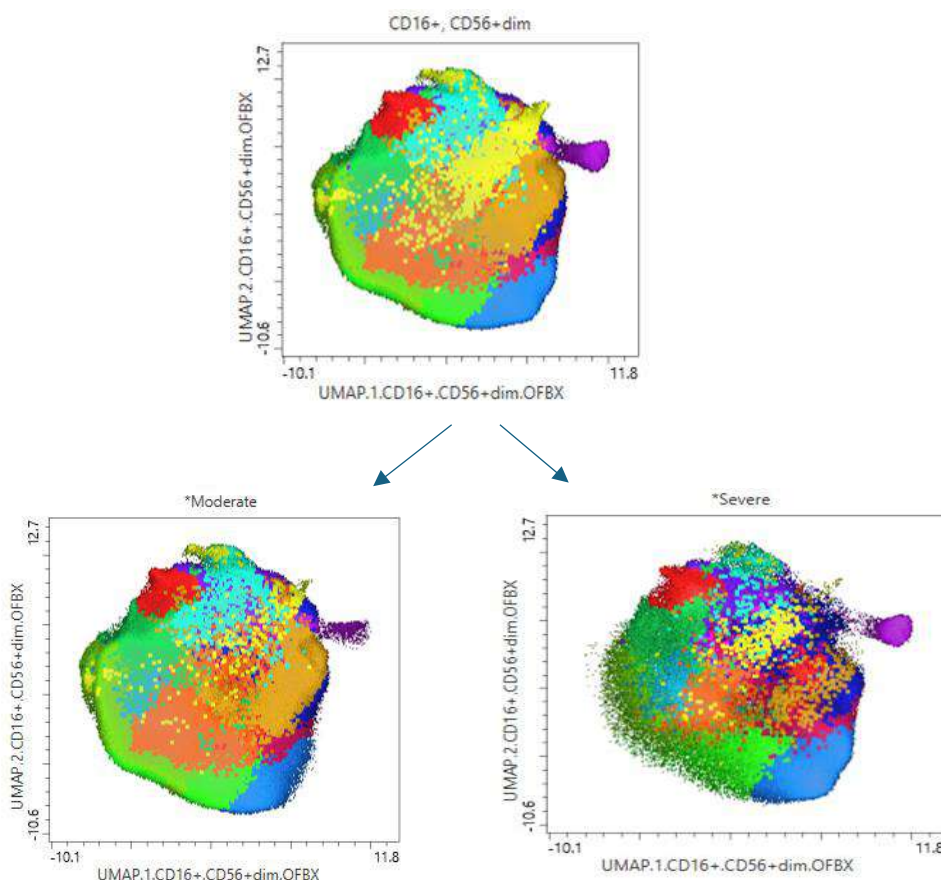
En conjunto, estas observaciones refuerzan la idea de que las células NK presentan subconjuntos funcionalmente distintos dependiendo de la severidad clínica, lo que convierte a los patrones de expresión diferencial en un posible recurso para identificar biomarcadores pronósticos y orientar estrategias terapéuticas dirigidas.

Desde una perspectiva biológica integral, estos hallazgos subrayan los distintos ejes funcionales que trascienden en la presencia o ausencia de los marcadores para modular la respuesta inmune por medio de distintos mecanismos. Para su entendimiento se agrupó en ejes biológicos principales (*Quatrini et al., 2021b*): agotamiento, activación, migración, diferenciación, apoptosis e inhibición.

Análisis de los biomarcadores en las células NK CD56^{dim} en pacientes severos versus moderados

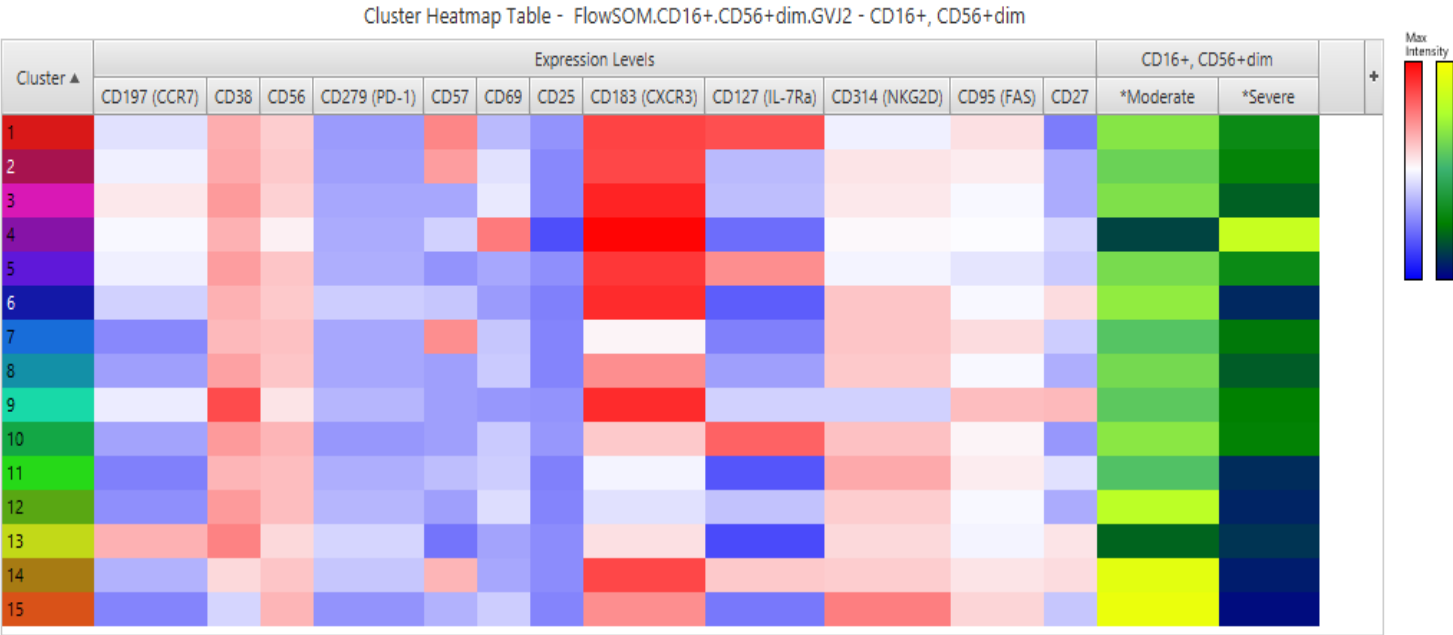
El análisis mediante UMAP reveló la función heterogénea de las células NK CD56^{dim}, que corresponden al 90% de las células NK en la sangre periférica, identificando poblaciones que podrían correlacionarse con la progresión de la enfermedad (Figura 44). Varios clústeres observados en los pacientes moderados disminuyen casi completamente en los pacientes severos, y al contrario, un clúster es aumentado exclusivamente en los pacientes severos.

FIGURA 44 UMAP DE CÉLULAS CD16⁺CD56^{dim}



El análisis de los 15 clústeres en las células NK CD56^{dim} a través del mapa de calor, muestra una diferencia de representación de los clústeres entre los pacientes moderados y severos, confirmando que un clúster, el clúster 4, el único clúster con expresión elevada del marcador de activación CD69, está específicamente elevado en los pacientes severos (Figura 44). Por otra parte, las células NK CD56^{dim} de los pacientes moderados tienen tres clústeres sobre expresados (clústeres 12, 14 y 15), que expresan diferentes intensidades de diferentes marcadores mostrando una diversidad de la respuesta NK en estos pacientes (Figura 45).

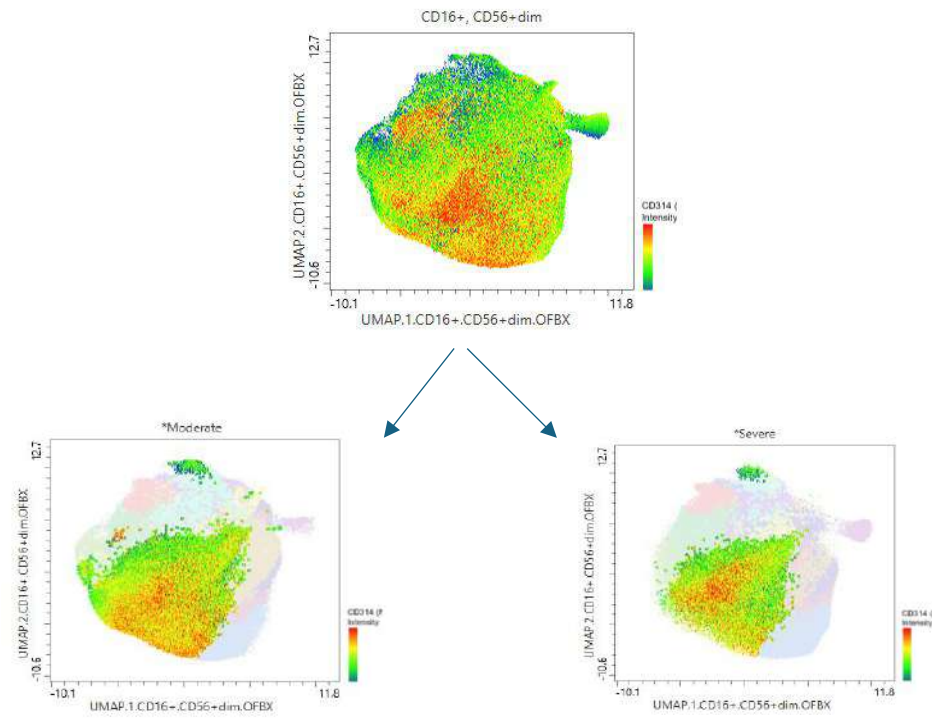
FIGURA 45 CLÚSTERES DE FLOWSOM DE CÉLULAS CD16+CD56^{dim}. MAPA DE CALOR



Mapa de calor de la intensidad de expresión de cada marcador en cada clúster, y de la presencia y representación cada clúster en la población CD16+CD56^{dim} de los pacientes 'Moderado' y 'Severo'. Heterogeneidad en células CD16+CD56^{dim} entre 'Moderado' y 'Severo' sugiere grados diferenciales de activación o disfunción, potencialmente vinculados a la progresión de patologías inflamatorias.

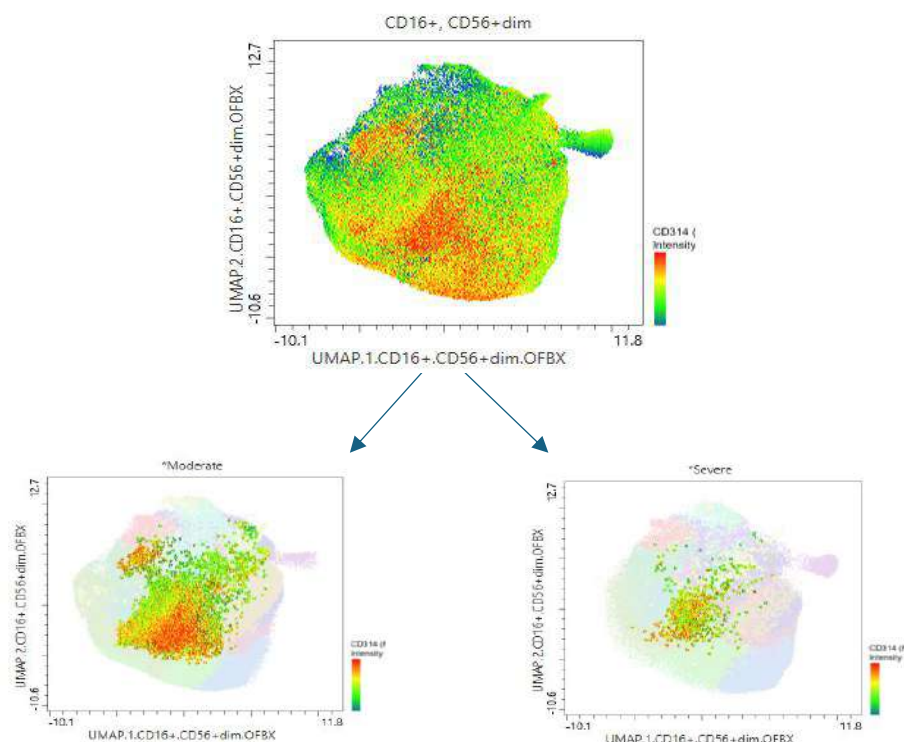
La población de células NK CD56^{dim} identificadas por el marcador CD314⁺ (NKG2D) mostró variaciones significativas en las categorías de pacientes moderados y severos de COVID-19 en el clúster 11 (Figura 46) y 15 (Figura 47). En los casos moderados, se observó una expresión intermedia en el clúster 11, y una expresión elevada en el clúster 15, mientras que en los casos severos la expresión de CD314⁺ es principalmente intermedia con casi una desaparición del clúster 15. Estos hallazgos resaltan la importancia de poder monitorear la expresión de CD314⁺ para comprender mejor los mecanismos que dirigen la progresión clínica y para identificar posibles biomarcadores útiles en la estratificación de riesgo de los pacientes

FIGURA 46 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD16⁺CD56^{dim} CD314 CLÚSTER 11



Comparación de células NK (CD16⁺CD56^{dim}) en COVI19: Moderado vs. Severo

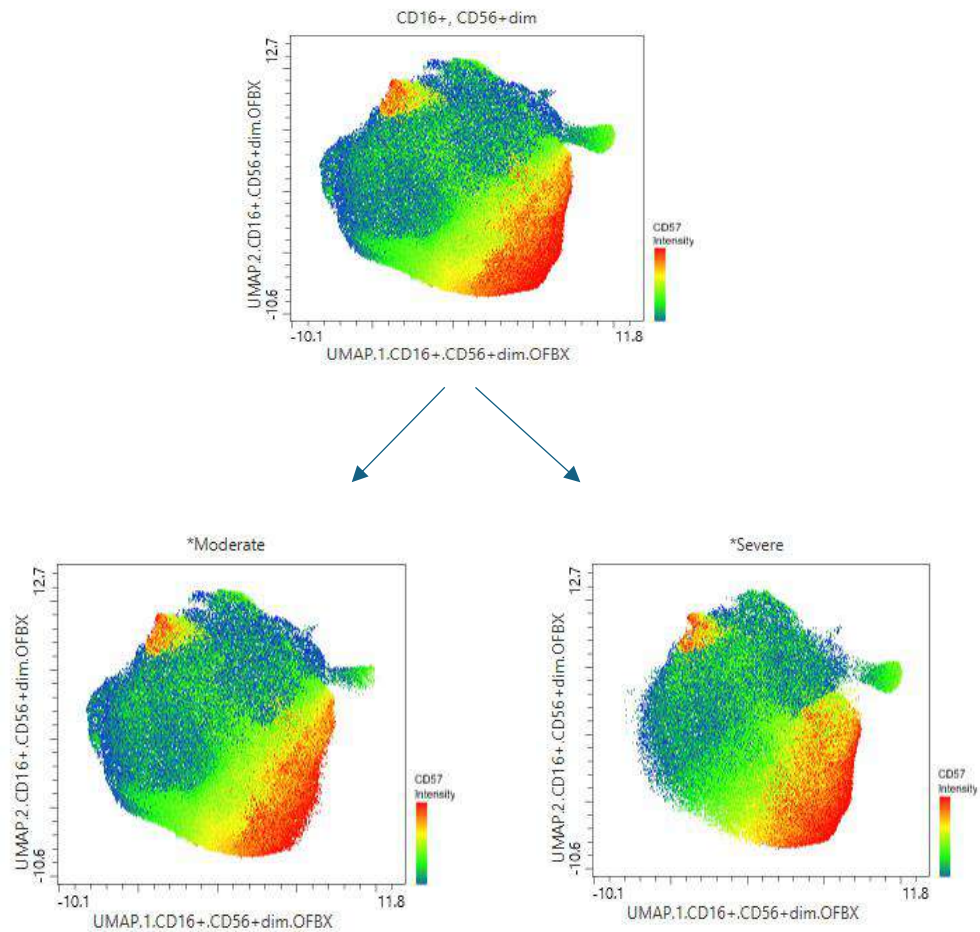
FIGURA 47 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD16⁺CD56^{dim} CLÚSTER 15



Comparación de células NK (CD16⁺CD56^{dim}) en COVID-19: Moderado vs. Severo

La expresión de CD57⁺ en las células NK CD16⁺CD56^{dim} refleja un estado de diferenciación terminal, asociado con una mayor capacidad citotóxica, pero con menor potencial proliferativo. La población de células NK CD56^{dim} identificada por el marcador CD57⁺ no mostró variaciones significativas en pacientes con síntomas moderados y severos de COVID-19, sino ligeramente en el clúster 14 y clúster 1 con expresión conservadora (Figura 48).

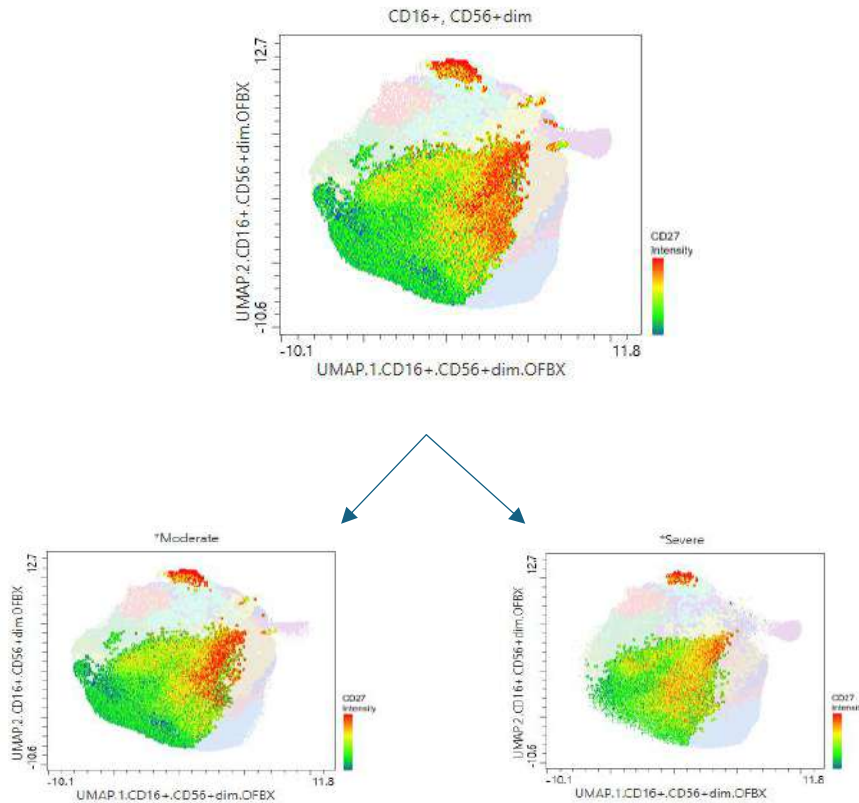
FIGURA 48 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD16⁺CD56^{DIM} CLÚSTER 14 Y CLÚSTER 1



Comparación de células NK (CD16⁺CD56^{dim}CD57⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

La población de células NK CD56^{dim} identificadas por el CD27 es un receptor coestimulador que participa en la activación y diferenciación de linfocitos. En las células NK CD56 dim, su presencia suele asociarse a un estado menos diferenciado y con mayor capacidad proliferativa, al contrario de que su pérdida puede indicar un fenotipo más terminal y efector (Figura 49).

FIGURA 49 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD16⁺CD56^{DIM} CLÚSTER 9



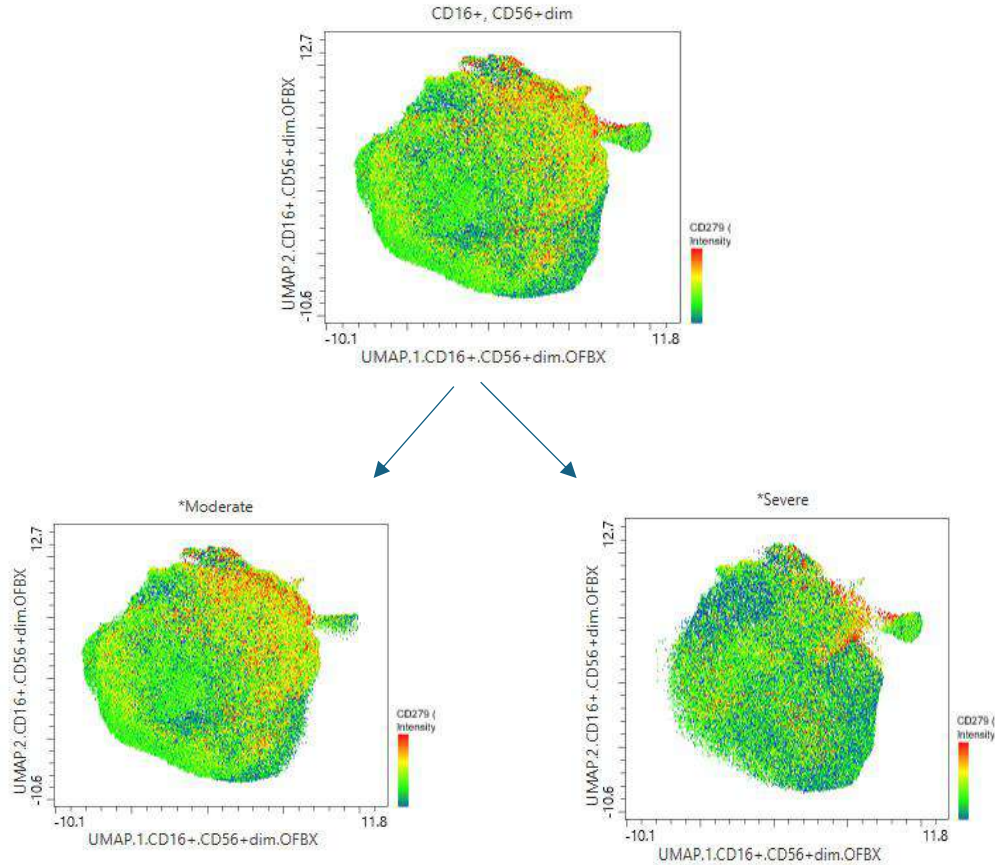
Comparación de células NK (CD16⁺CD56^{dim} CD27) en COVID-19: Moderado vs. Severo

La expresión del marcador CD27⁺ en la población de células NK CD16⁺CD56^{dim} reveló ciertas diferencias entre la categoría de moderado y severo (Figura 49). En los casos moderados, la distribución de CD27⁺ es más amplia y heterogénea, lo que indica la presencia de subpoblaciones con un grado intermedio de maduración que mantienen su capacidad proliferativa y funcional. Por otro lado, en los casos graves, la señal de CD27⁺ es más limitada y menos intensa, lo que apunta a una reducción de células NK menos diferenciadas y un predominio de fenotipos más maduros o agotados. Este hallazgo sugiere que la progresión

hacia la gravedad de la enfermedad está vinculada a la disminución de células NK CD27⁺, lo que podría comprometer su capacidad de renovación y respuesta eficaz contra la infección viral.

Al interactuar con sus ligandos, el CD279⁺ (PD-1) en células NK CD56^{dim} induce la inhibición de la actividad citotóxica y la reducción de la proliferación celular. En contextos como infecciones virales puede contribuir al agotamiento inmunológico y a la progresión de la enfermedad. La sobreexpresión de PD-1 podría asociarse con una disfunción de las células inmunitarias, disminuyendo su capacidad para eliminar el virus (*Deng et al., 2024; Heigener & Reck, 2017*). En el caso de los pacientes COVID-19 moderados, la expresión de PD-1 es intermedia/baja con en pocas células con expresión elevada repartidas entre los clústeres de las NK CD56^{dim}, mientras que en los pacientes severos la expresión elevada de PD-1 se encuentra localizada en pocos clústeres, mientras es baja en la mayoría de las células (Figura 50).

FIGURA 50 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS $CD16^+CD56^{dim}CD279^+$

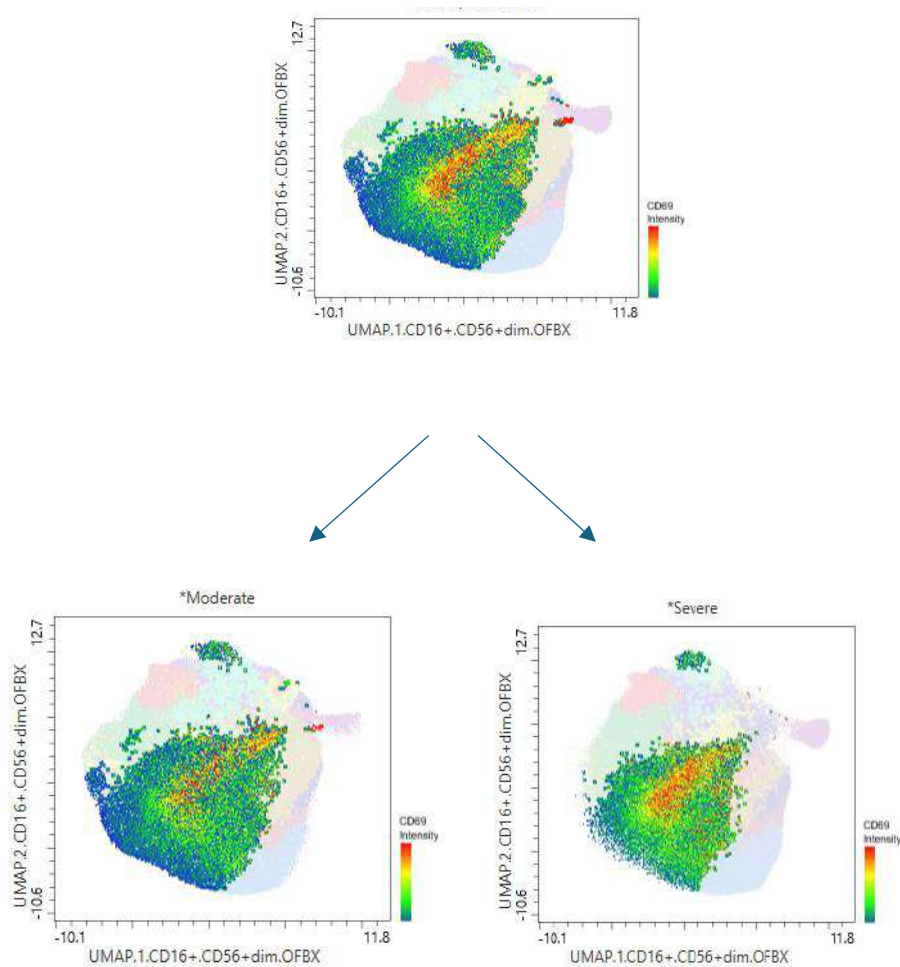


Comparación de células NK ($CD16^+CD56^{dim}CD279^+$) en COVID-19: Moderado vs. Severo

$CD69^+$ es un marcador temprano de activación en células NK, cuya expresión aumenta tras el contacto con estímulos virales. Su presencia indica una respuesta inmunitaria activa y transitoria, esencial en las primeras fases de infección por SARS-CoV-2. Los niveles elevados y sostenidos pueden asociarse al agotamiento celular y desregulación inmunológica (Bornego *et al.*, 1993; Malengier-Devlies *et al.*, 2022b). En los casos moderados, la expresión de $CD69^+$ se distribuye de manera más amplia y heterogénea (Figura 51), lo que indica un estado de activación transitoria y posiblemente más controlada de las NK frente al estímulo viral. En contraste, en la categoría de severos se observa una concentración más marcada de

señal en regiones específicas del clúster, sugiriendo una activación sostenida y posiblemente desregulada, en respuesta a una respuesta de citocinas más elevada. Este hallazgo es consistente con la hipótesis de que la activación temprana de las NK mediante $CD69^+$ podría ser beneficiosa en fases iniciales de la enfermedad, mientras que su persistencia en estadios severos podría reflejar agotamiento celular y contribuir al desbalance inmunológico característico de los cuadros graves de COVID-19.

FIGURA 51 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS $CD16^+CD56^{dim}$ CLÚSTER 4

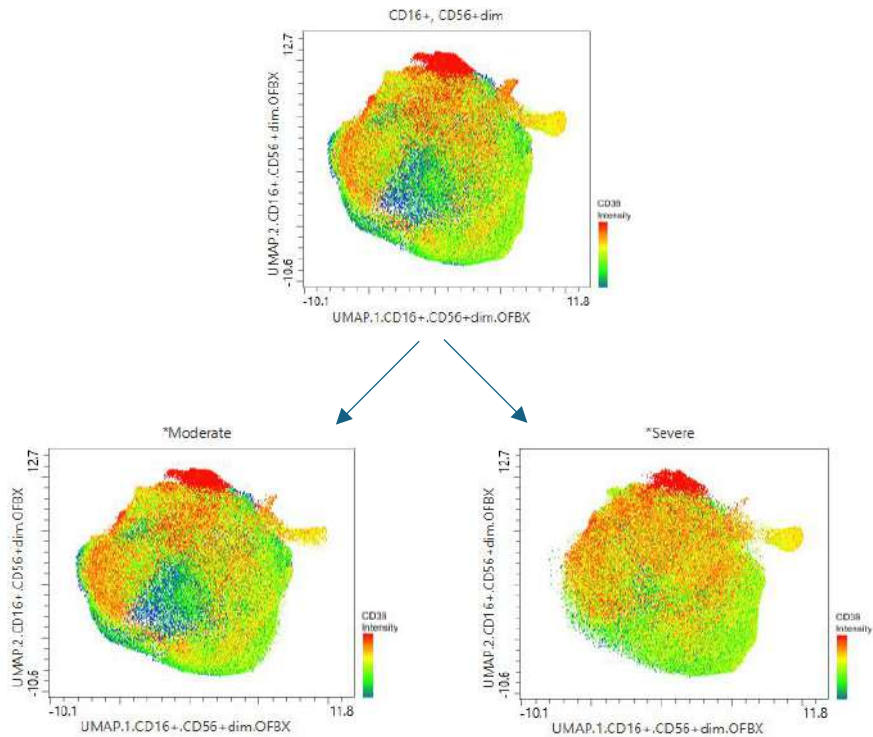


Comparación de células NK ($CD16^+CD56^{dim} CD69^+$) en COVID-19: Moderado vs. Severo

El marcador CD38⁺ es una ectoenzima ampliamente reconocida por su papel en la activación y diferenciación de células inmunitarias, incluyendo las células NK CD56^{dim}. Su expresión suele aumentar ante estímulos infecciosos y se considera indicativo de un estado funcional activo, participando tanto en la adhesión celular como en la señalización y producción de citocinas. Los niveles de CD38 pueden estar elevados de manera transitoria, reflejando una activación eficiente de las NK frente al virus y contribuyendo a la eliminación temprana de células infectadas (*Maucourant et al., 2020a*). El análisis muestra que en pacientes con COVID-19 moderado, las células NK CD16⁺CD56^{dim} con el marcador CD38⁺ presentan una activación más heterogénea y controlada, con una población definida de expresión elevada y otra de expresión nula, mientras que en casos severos se observa una activación sostenida y generalizada de CD38⁺ en la mayoría de las células (Figura 52).

En pacientes con cuadros severos de COVID-19, se observa que la sobreexpresión sostenida de CD38⁺ podría estar relacionada con el agotamiento funcional de las células NK. Esta persistencia en la señal puede favorecer la desregulación del sistema inmunitario, disminuyendo la eficacia de la respuesta citotóxica y facilitando la progresión de la infección. La hiperactivación de CD38⁺ también puede contribuir al entorno inflamatorio patológico característico de los casos graves, potenciando la liberación exacerbada de mediadores inflamatorios y citocinas (*Gars et al., 2018*).

FIGURA 52 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD16⁺CD56^{dim} CLÚSTER 9



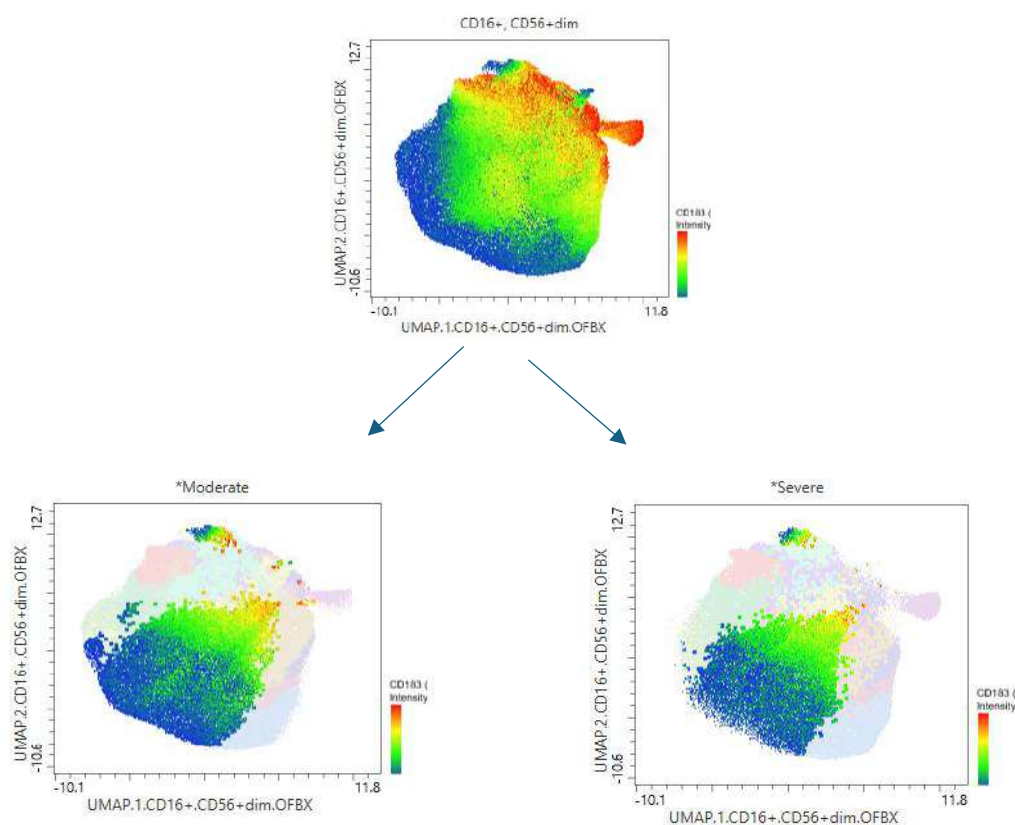
Comparación de células NK (CD16⁺CD56^{dim} CD38⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

El marcador CD183⁺, también conocido como CXCR3, es un receptor de quimiocinas expresado en diversas células inmunitarias, incluyendo las células NK CD56^{dim}. Su función principal es guiar la migración de estas células hacia sitios de inflamación a través de la interacción con sus ligandos, como CXCL9, CXCL10 y CXCL11, que suelen estar elevados en contextos de infección viral o inflamación aguda (Tomankova *et al.*, 2015). La comparación de la población NK CD16⁺CD56^{dim} según la expresión de CD183⁺ (CXCR3) muestra que en pacientes moderados la señal es más amplia y heterogénea (Figura 53), reflejando una mayor capacidad migratoria hacia sitios de inflamación. En contraste, en los casos severos la expresión se encuentra reducida y restringida, lo que sugiere una limitación

en la movilización de las NK y un posible compromiso de la respuesta inmunológica en etapas graves de COVID-19.

En pacientes en categoría de moderados pudo haberse asociado a una mayor capacidad de migración y localización eficiente en los tejidos afectados, favoreciendo así la eliminación del virus. En individuos en categoría severos, la expresión alterada o disminuida de CD183⁺ puede contribuir a una respuesta desorganizada, dificultando la llegada focalizada de las células NK a los sitios de infección y favoreciendo el agotamiento inmunológico (*Khalil et al., 2021*)

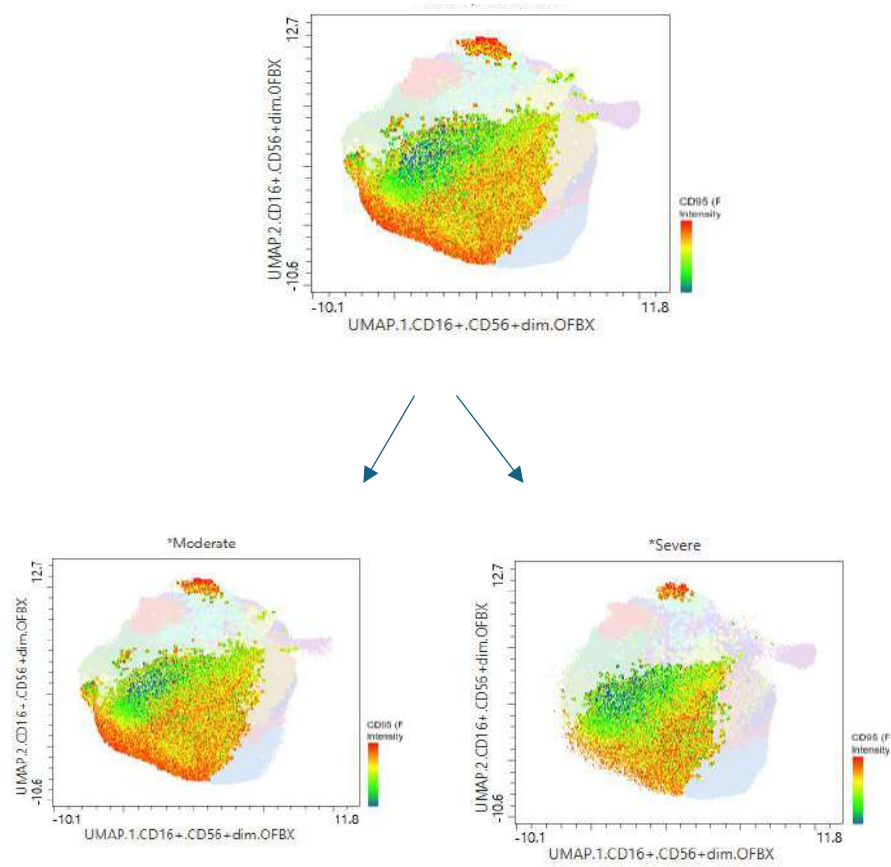
FIGURA 53 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD16⁺CD56^{DIM} CLÚSTER 14



Comparación de células (CD16⁺CD56^{dim} CD183⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

La sobreexpresión de CD95⁺ en las células NK CD56^{dim}, que son las encargadas de la citotoxicidad frente a virus, ayuda inicialmente a eliminar las células infectadas, sin embargo, con el tiempo se vuelve más propenso a la apoptosis de las propias células inmunes y puede llevar a una disfunción del sistema inmunológico. En el grupo moderado, la expresión de CD95⁺ aparece distribuida de forma más amplia y con intensidades intermedias (Figura 54), lo que sugiere un balance funcional entre activación y mecanismos de control celular. En cambio, en los casos graves, se observa una mayoría de células NK que tienen una expresión del marcador intermedio/elevado, pero disminuido comparado a la población elevada en los moderados; su disminución podría equivaler a un agotamiento inmunitario y una reducción de la eficacia citotóxica. La diferencia en la expresión de CD95⁺ en NK CD56^{dim} entre pacientes moderados y severos refleja un gradiente de activación hacia disfunción/apoptosis, lo cual podría utilizarse como biomarcador de severidad en COVID-19 (Marquardt *et al.*, 2017).

FIGURA 54 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS $CD16^+CD56^{dim}$ CLÚSTER 9



Comparación de células ($CD16^+$, $CD56^{dim}$ $CD95^+$) en COVID-19: Moderado vs. Severo

Marcadores en la población de células NK CD56^{bright} entre moderados y severos.

Las células NK CD56^{bright}, conocidas por su alta expresión de CD56⁺ y baja presencia de CD16⁻ en la superficie celular, representan una subpoblación esencial dentro del sistema inmunológico innato. Las CD56^{bright} destacan por su capacidad de producir grandes cantidades de citocinas inmunomoduladores, especialmente interferón gamma, lo cual resulta fundamental para la regulación de respuestas inflamatorias y la activación de otras células inmunitarias (*Michel et al., 2016*). La mayoría de los clústeres en las NK CD56^{bright} están disminuidos en los pacientes severos (Figura 55), y no se ve el aumento de ningún clúster específico asociado a severidad como en las NK CD56^{dim}.

FIGURA 55 MAPA DE CALOR CD56^{BRIGHT} CLÚSTER 9

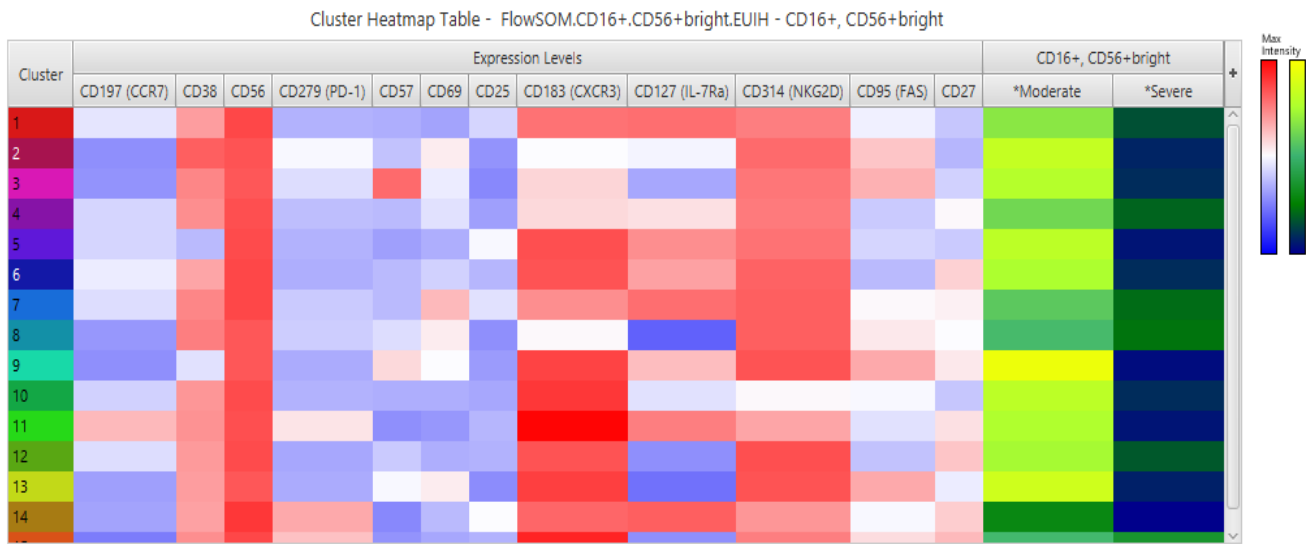
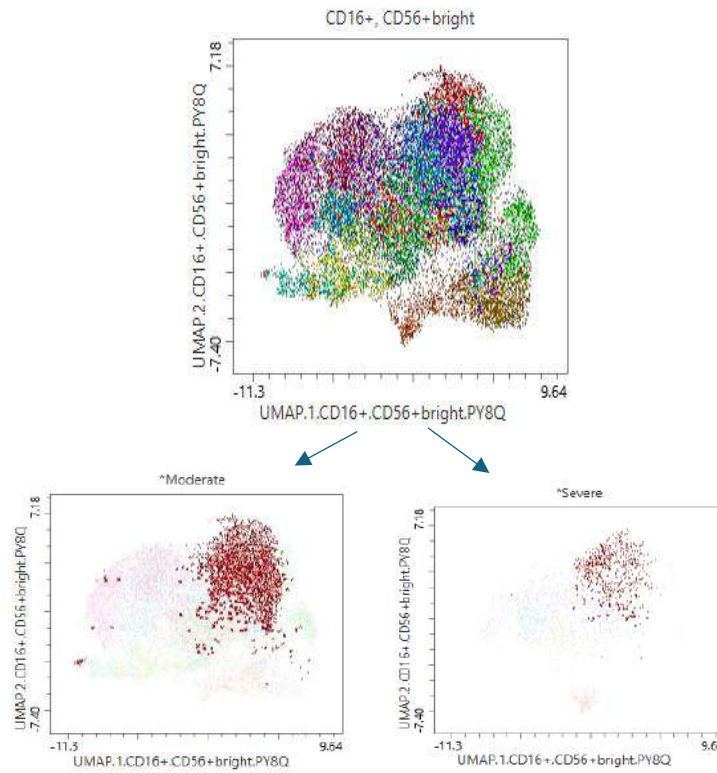


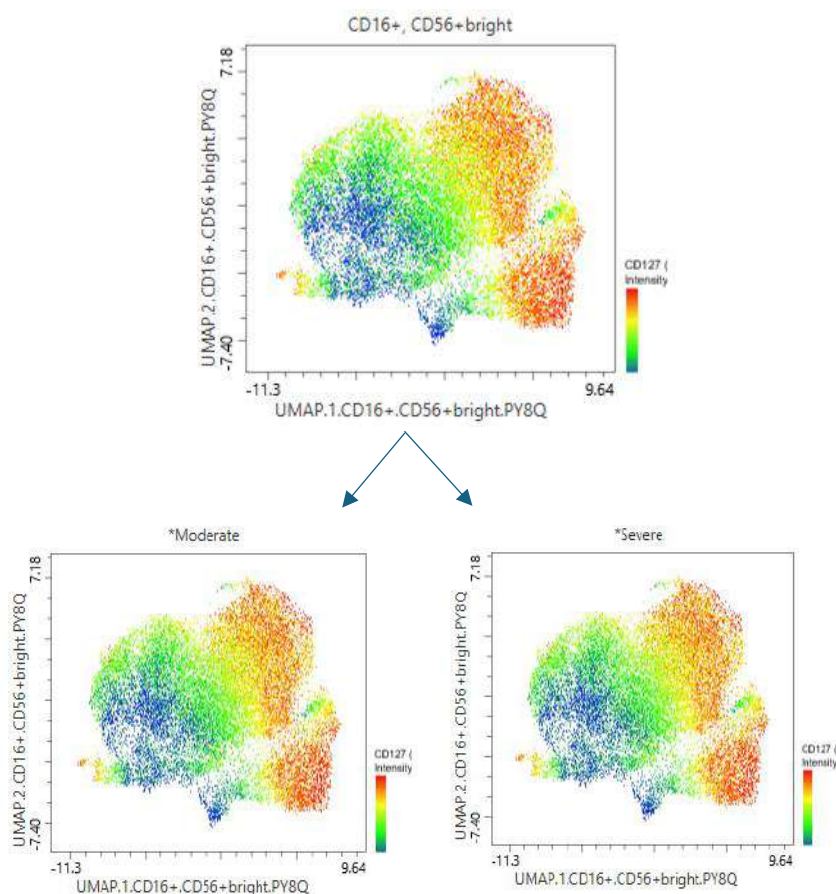
FIGURA 56 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD56^{BRIGHT}



Comparación de células (CD56^{BRIGHT}) en COVID-19: Moderado vs. Severo

Basado en el mapa de calor la sobreexpresión (MFI) del CD127⁺ fue mayor presencia en el grupo de los moderados (Figura 56 y 57), principalmente en el clúster 9, que es el más representado en los moderados y no es detectado en los severos.

FIGURA 57 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD56^{BRIGHT} CLÚSTER 1,5 Y 9

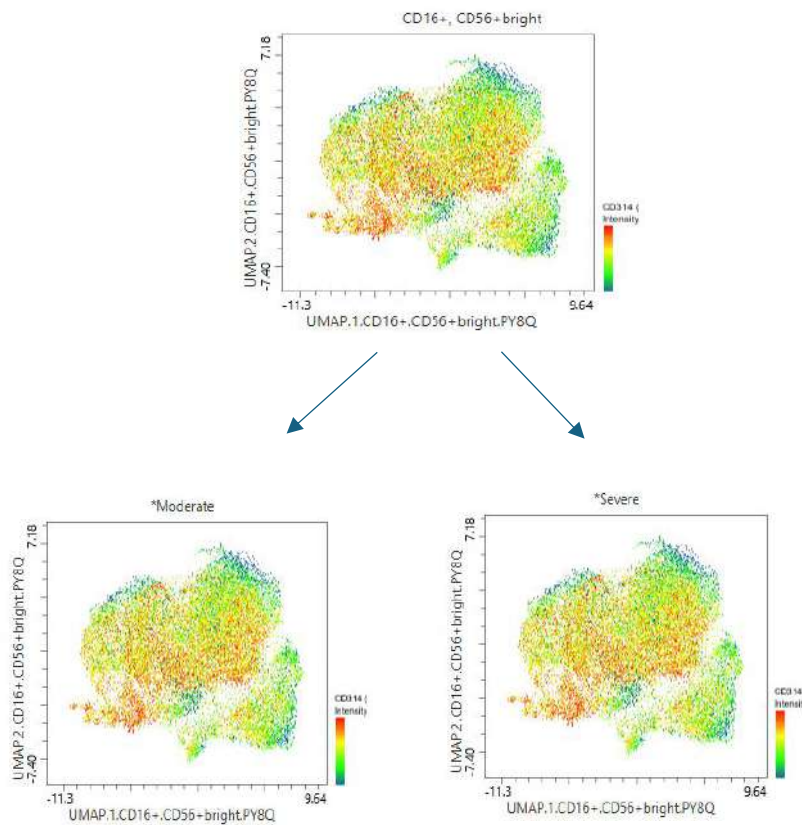


Comparación de células (CD56^{bright}CD127⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

El marcador CD314⁺ (NKG2D) en células NK CD56^{bright} actúa como receptor activador clave en la detección y eliminación de células infectadas, contribuyendo al control viral y a la modulación inflamatoria. Su mayor expresión en pacientes moderados se asocia con una respuesta antiviral más eficiente y un equilibrio inmunológico protector, mientras que en los casos severos su disminución refleja agotamiento funcional y pérdida de capacidad

citotóxica, favoreciendo la disfunción inmunológica propia de la progresión grave de COVID-19 (*da Costa et al., 2023*). Sin embargo, en nuestro grupo de pacientes, no se detectó una diferencia significativa de la expresión de NKG2D en las CD56^{bright}, aunque se observó la sobreexpresión (MFI) del CD314⁺ fue mayor en el clúster 2 y 9 en el grupo de los moderados (Figura 58).

FIGURA 58 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD56^{BRIGHT} CLÚSTER 2 Y 9



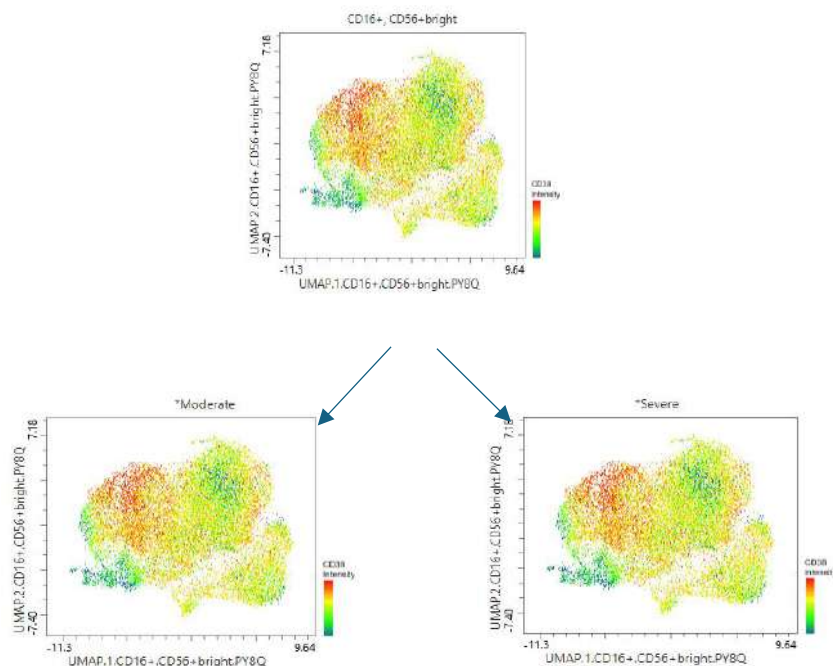
Comparación de células (CD56^{bright}CD314⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

4.2.11 Marcador CD38⁺

El marcador CD38⁺ en las células NK CD56^{bright} se asocia con la activación y el estado funcional de estas poblaciones. Una elevada expresión de CD38⁺ suele indicar una respuesta inmunitaria activa y una mayor capacidad para modular la inflamación y eliminar células infectadas. En el contexto de COVID-19, la presencia y los niveles de CD38⁺ en NK CD56^{bright} pueden aportar información valiosa sobre el grado de activación inmunológica y el potencial de estas células para contribuir en la defensa antiviral (*Pilar Ma Lanuza Mort, 2020*)

En el UMAP de las células CD56^{bright}CD38⁺ en COVID-19, se observó una expresión diversa y dispersada de CD38⁺, sin diferencia significativa entre moderados y severos (Figura 59).

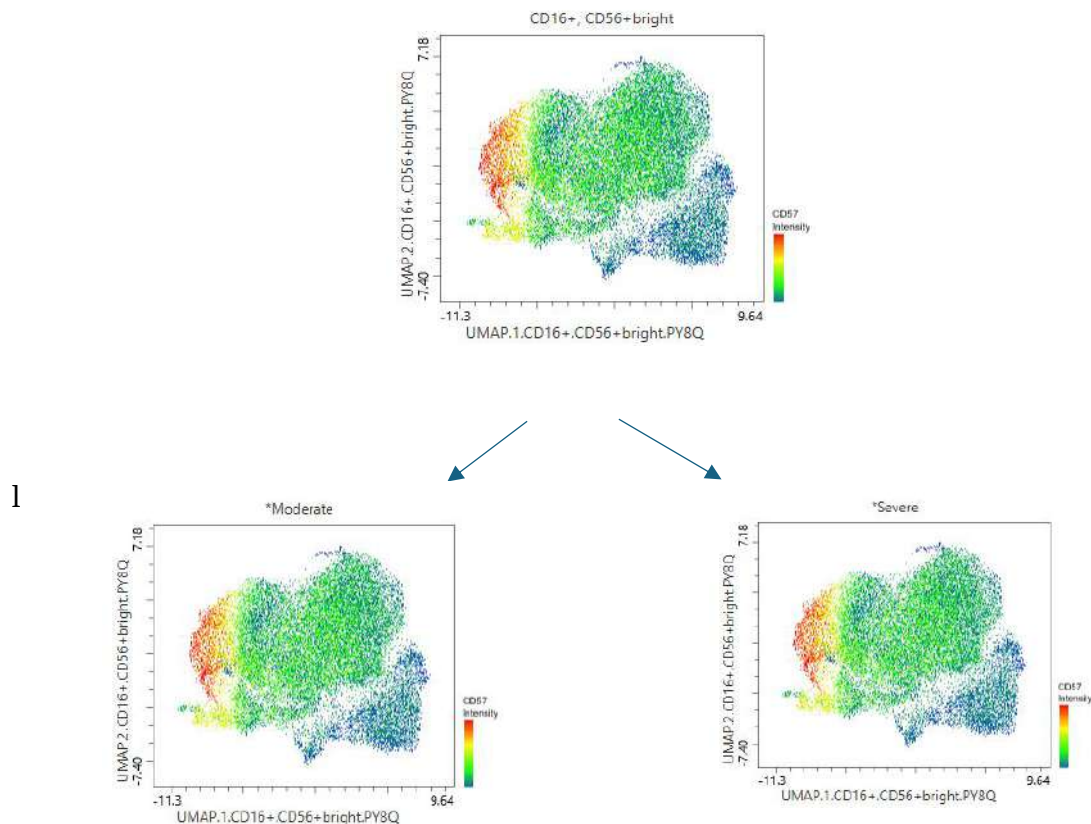
FIGURA 59 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD56^{BRIGHT} CLÚSTER 2



Comparación de células (CD56^{bright}CD38⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

El marcador CD57⁺ en la población NK ^{bright} ofrece información relevante sobre la maduración y el estado funcional de estas células en personas con COVID-19. Una expresión elevada de CD57⁺ suele reflejar un grado avanzado de diferenciación y puede estar relacionada con una capacidad citotóxica sostenida, mientras que niveles bajos podrían indicar un perfil funcional menos maduro, lo cual influye en la respuesta inmunitaria durante la progresión de la enfermedad (Björkström et al., 2010; Liu et al., 2022; Soleimanian et al., 2022) (Figura 60).

FIGURA 60 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD56^{BRIGHT} CLÚSTER 3

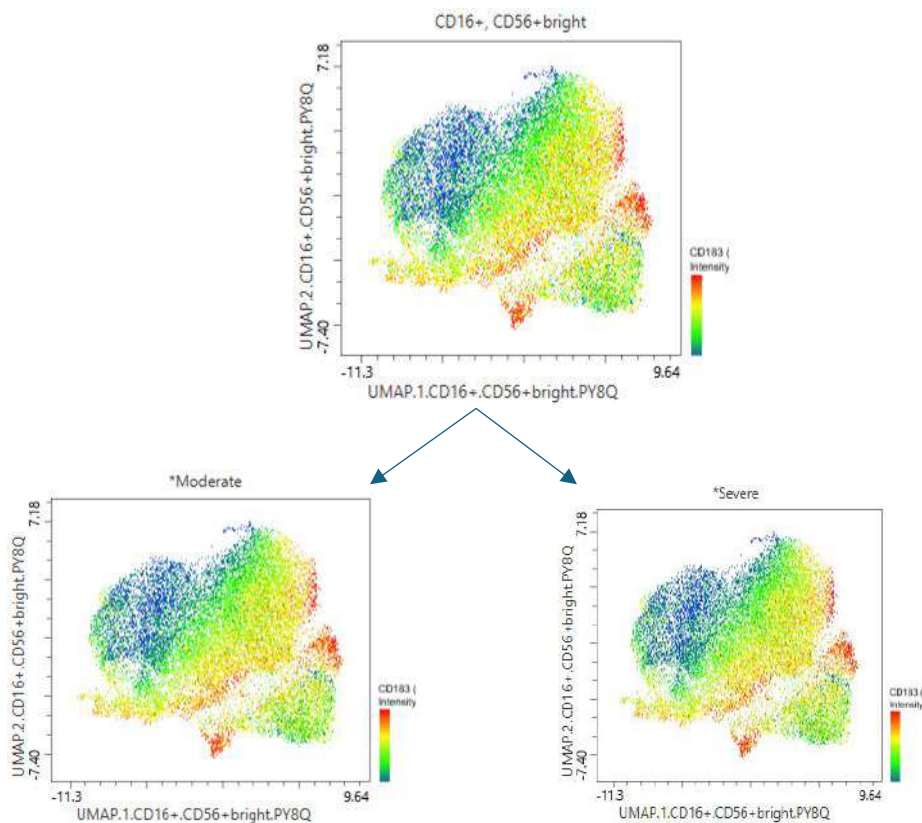


Comparación de células (CD56^{bright} CD57⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

El marcador CD183⁺, también conocido como CXCR3, desempeña un papel relevante en la migración y posicionamiento de las células NK en tejidos infectados o inflamados. Su expresión en la población NK CD56^{bright} puede indicar la capacidad de estas células para responder a señales quimiotácticas y dirigir su movimiento hacia focos de infección o daño tisular(Poli *et al.*, 2009).

Los niveles de CD183⁺ pueden variar entre pacientes con síntomas moderados y severos, lo que sugiere diferencias en la capacidad de reclutamiento y respuesta funcional de las células NK frente a la progresión de la enfermedad. Una alta presencia de CD183⁺ puede estar asociada con una mayor movilidad y potencial de respuesta antiviral, mientras que una expresión disminuida podría reflejar alteraciones en el tráfico celular y una respuesta inmunitaria menos eficiente. UMAP de células CD56^{bright}CD183⁺ en pacientes con COVID-19 permite visualizar la distribución y niveles de intensidad del marcador CD183⁺ entre los casos moderados y severos, mostrando poca diferencia entre ambos grupos (Figura 61).

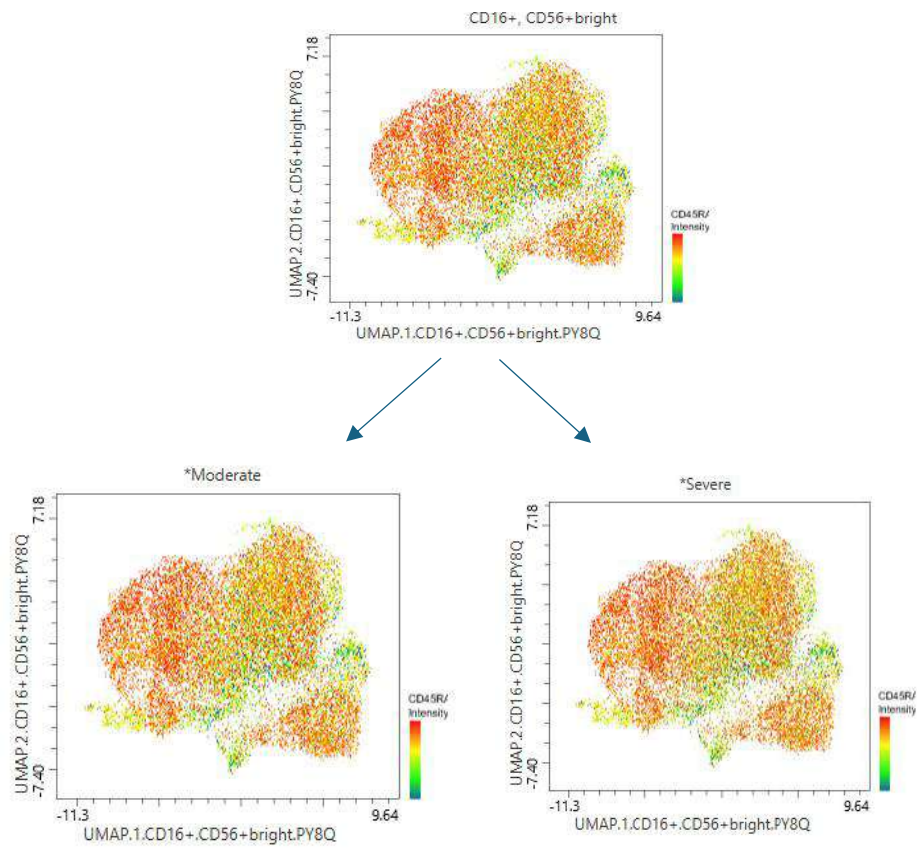
FIGURA 61 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD56^{BRIGHT} CLÚSTER 9 Y 13



Comparación de células (CD56^{bright}CD183⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

Los marcadores como CD45RA⁺ permiten evaluar el estado de maduración, capacidad migratoria y funcionalidad de las células del sistema inmune innato en diferentes estadios de la enfermedad. El análisis comparativo entre pacientes moderados y severos revela patrones clave sobre la plasticidad y desregulación inmunológica durante la infección (*Maucourant et al., 2020b*). La reducción de dimensionalidad (UMAP) reveló que la expresión de CD45RA⁺ en CD56^{bright} no se correlaciona de manera significativa con la gravedad (Figura 62).

FIGURA 62 COMPARACIÓN UMAP DE CÉLULAS CD16+. CD56^{BRIGHT} CLÚSTER 2 Y 9



Comparación de células (CD56^{bright}CD45RA⁺) en COVID-19: Moderado vs. Severo

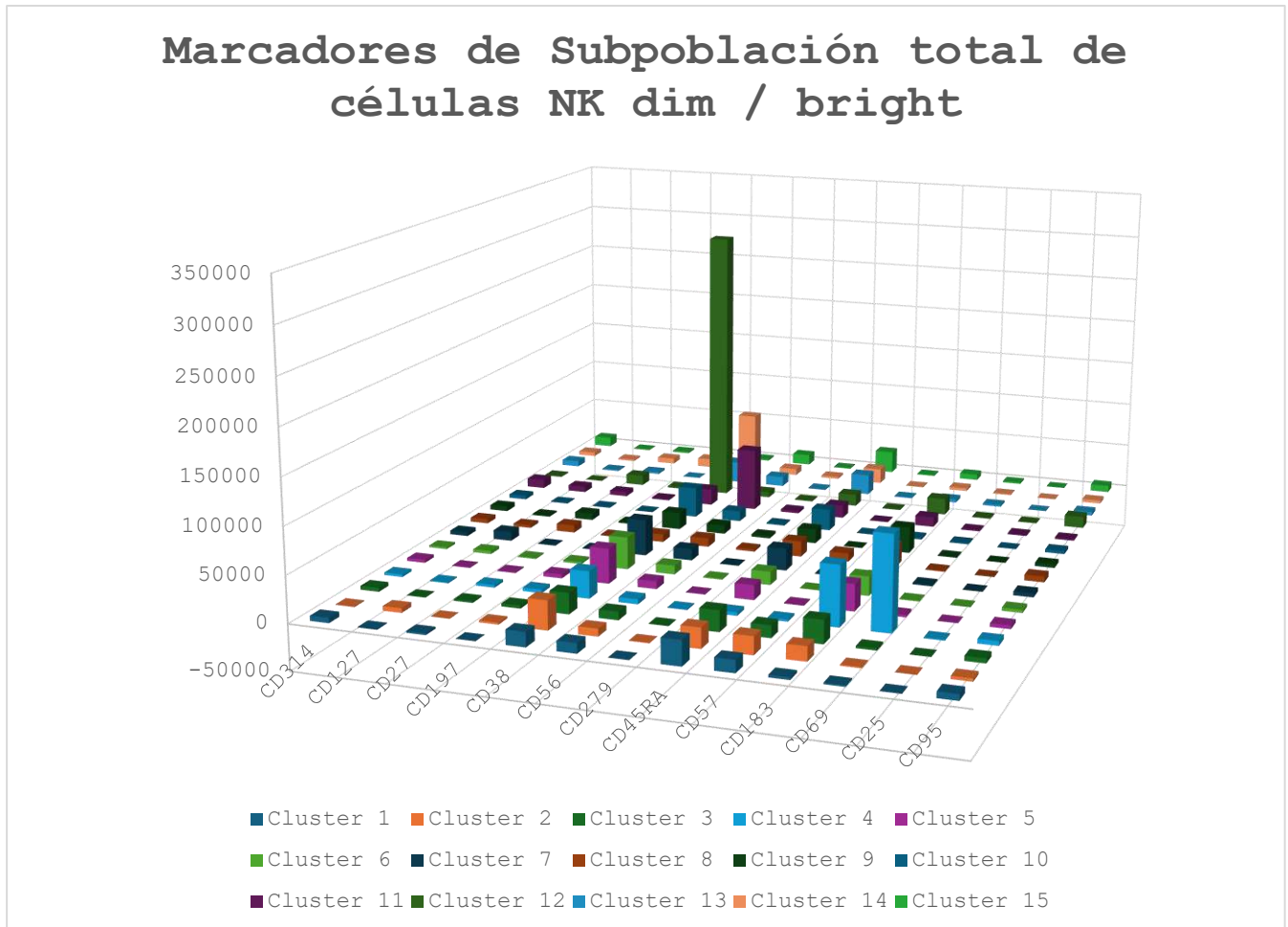
4.3 La comparación de los distintos fenotipos de células NK en las poblaciones de pacientes hospitalizados por COVID-19 permite comparar los eventos de severidad vinculados a la infección.

El objetivo de esta investigación es describir las alteraciones funcionales y los fenotipos de las células NK CD16⁺CD56^{bright} en COVID-19, a través del análisis comparativo de marcadores esenciales en pacientes con enfermedad moderada y grave. El propósito científico es detectar tendencias de disfunción inmunológica relacionadas con el avance de la gravedad, proporcionando evidencia a nivel molecular que explique por qué el sistema innato no puede controlar la infección en situaciones críticas.

Se identificaron patrones de expresión diferencial de cada uno de los marcadores entre subpoblaciones de células NK (CD56dim vs. CD56bright) en distintos clústeres, con el fin de correlacionar fenotipos específicos con su capacidad funcional (ej. citotoxicidad, migración o memoria inmunológica) (gráfico 1).

GRÁFICO 1

EXPRESIÓN DE FLUORESCENCIA DEL TIPO DE SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS NK POR MARCADOR Y CLÚSTER



Cuando analizamos algunos marcadores de interés, se puede profundizar su rol en la severidad.

De la población general de células NK, en los clústeres 1 y 10 de NK CD56^{dim} se pudo observar una expresión del marcador CD127⁺ en los pacientes moderados, pudiendo estar relacionada a una mayor activación. Sin embargo, en el clúster 7 de las NK CD56^{bright} se observó una MFI ^{bright} de 7146 menor en comparación a las ^{dim} lo que puede indicar menor expresión, sin embargo, no se observó una diferencia entre las categorías de severidad (Tabla 3).

TABLA 2 VALORES DE MFI ELEVADOS Y PATRONES DE PRESENCIA EN PACIENTES MODERADOS VS. SEVEROS

Clúster	Marcador	Población	Valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
1	CD127	dim	15038		
7	CD127	bright	7146		
10	CD127	dim	10395		

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia; Categoría-Gravedad: moderados y severos.

● : mayor intensidad; ● : Presente; ● : ausentes; M: moderados; S: Severo

Se observó que la población NK CD56^{bright} presentó valores de MFI intermedios para CD183 (10,140 – 29,882), distribuidos de manera más homogénea a lo largo de distintos clústeres. Esta expresión relativamente estable de CXCR3 en los NK CD56^{bright} es consistente con un fenotipo funcionalmente regulador y con capacidad de migrar hacia sitios inflamados de forma controlada, característica más evidente en los pacientes moderados, ya que la mayoría de los clústeres CD56^{bright} CD183⁺ están disminuidos o inexistentes en los pacientes severos

(tabla 2). En contraste, la población NK CD56^{dim} mostró una expresión más heterogénea y, en algunos clústeres, valores de MFI considerablemente elevados, alcanzando picos extremos como el del clúster 4 (65,406) que es el único mayoritario en los severos comparados a los moderados, y el clúster 9 (22,943) que se expresa de manera similar entre ambos grupos clasificados por severidad. Estos hallazgos indican que en los pacientes severos existe una tendencia hacia la sobreexpresión de CXCR3 en subpoblaciones específicas, lo que podría favorecer una migración exacerbada hacia tejidos periféricos, particularmente el pulmón, contribuyendo a la inflamación descontrolada característica de los cuadros graves (tabla 4).

TABLA 3. VALORES DE MFI ELEVADAS Y PATRONES DE PRESENCIA EN PACIENTES MODERADOS VS. SEVEROS

Clúster	Marcador	Población	Valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
1	CD183	dim	19435	Yellow	Green
2	CD183	dim	18463		
3	CD183	dim	29821		
4	CD183	dim	65406	Green	Yellow
5	CD183	bright	14091	Yellow	Blue
5	CD183	dim	22575		Green
6	CD183	bright	14434		Blue
6	CD183	dim	29712		
9	CD183	bright	16429		Blue
9	CD183	dim	22943	Green	
10	CD183	bright	16682	Yellow	Blue
11	CD183	bright	29882		Green
12	CD183	bright	13297		
13	CD183	bright	15730		Blue

14	CD183	bright	10140		
14	CD183	dim	20556		
15	CD183	bright	20832		
15	CD183	dim	9673		

● : mayor intensidad ; ● : Presente; ● : ausentes M: moderados; S: Severo

CUADRO 3 RESUMEN DE LA EXPRESIÓN DE CD183⁺ SEGÚN LA SEVERIDAD

Población / Grupo	Patrón observado	Interpretación funcional
Severos	Concentran los picos más altos de MFI (ej. clúster 4 con 65,406)	Hiperexpresión de CXCR3 → posible infiltración exacerbada en tejido, asociada a inflamación.
Moderados	Expresión presente pero más controlada y homogénea	Conservan capacidad migratoria sin alcanzar los niveles extremos de los severos.

El marcador CD197⁺ (CCR7), fundamental para la recirculación de linfocitos y su migración hacia órganos linfoides secundarios, mostró un patrón de expresión restringido dentro de las células NK. En este análisis, solo el clúster 13 de la población CD56^{dim} presentó valores de MFI relevantes (10,482), mientras que en el resto de los clústeres su presencia fue prácticamente ausente (tabla 5). Este hallazgo indica que la expresión de CCR7 en células NK se mantiene en subpoblaciones muy específicas, lo que sugiere una distribución limitada de la capacidad de recirculación en este contexto clínico. De la población general en el Clúster 13 se reportó expansión de subpoblaciones celulares de NK CD56^{dim} con mayor expresión, está relacionada a una mayor activación y expresión patológica por actividad citotóxica observada en ambos grupos (moderados y severos).

TABLA 4. VALORES DE MFI ELEVADOS Y PATRONES DE PRESENCIA EN PACIENTES MODERADOS VS. SEVEROS

Clúster	Marcador	Población	Valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
---------	----------	-----------	-----------	-------------	-------------

13	CD197	dim	10482		
----	-------	-----	-------	--	--

 : mayor intensidad;
  :Presente;
  :ausentes
 M: moderados; S: Severo

El marcador CD27⁺ mostró un comportamiento diferencial en las subpoblaciones NK. En la población CD56^{dim}, se observaron valores de MFI variables según el clúster analizado: en el clúster 5, la intensidad fue baja (1,539), mientras que en el clúster 9 alcanzó un valor elevado (10,203) (tabla 6), sugiriendo la coexistencia de subpoblaciones con distintos grados de diferenciación dentro de este compartimento. En contraste, en la población CD56^{bright}, representada en el clúster 15, la expresión de CD27⁺ fue igualmente alta (9,427), indicando que, aunque estas células suelen asociarse con funciones más regulatorias, también conservan una fracción con marcada capacidad proliferativa. Los clústeres 5 de NK CD56^{dim} y 15 de NK CD56^{bright} se detectaron un poco más en el grupo de moderados. En conjunto, estos hallazgos reflejan que la pérdida o reducción de CD27 podría asociarse a los casos severos, mientras que su preservación en valores altos tendería a relacionarse con los pacientes moderados, manteniendo la capacidad de expansión y homeostasis del compartimento NK.

TABLA 5 VALORES DE MFI ELEVADOS Y PATRONES DE PRESENCIA EN PACIENTES MODERADOS VS. SEVEROS

Clúster	Marcador	Población	Valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
5	CD27	dim	1539		
9	CD27	dim	10203		
15	CD27	bright	9427		

 : mayor intensidad;
  : Presente;
  : ausentes
 M: moderados; S: Severo

El marcador CD38⁺, asociado a activación celular, mostró una expresión consistentemente elevada en ambas subpoblaciones NK (CD56^{bright} y CD56^{dim}), con valores de MFI que variaron de manera amplia entre clústeres (Tabla 5). En la fracción CD56^{bright}, los valores oscilaron entre ~12,700 y ~83,700, reflejando una activación significativa pero heterogénea, donde algunos clústeres alcanzaron picos notables de expresión (clúster 2 con >80,000). Por su parte, la población CD56^{dim} presentó un rango aún más marcado, desde ~16,000 hasta más de 277,000 (clúster 9), lo que evidencia una activación desproporcionada en determinados subgrupos. En términos comparativos, los pacientes severos se caracterizaron por presentar los valores más altos de MFI, especialmente dentro de la población CD56^{dim}, lo que concuerda con un estado de hiperactivación inflamatoria exacerbada. En contraste, los moderados mostraron valores elevados, pero menos extremos, sugiriendo una activación más regulada y controlada. En conjunto, los resultados confirman que la activación de NK medida por CD38⁺ está presente en ambos fenotipos, pero es más intensa y heterogénea en los severos, especialmente dentro de las NK CD56^{dim}, población que parece estar directamente vinculada con la respuesta inflamatoria más agresiva.

TABLA 7 Valores de MFI elevados y patrones de presencia en pacientes moderados vs. Severos

●: mayor intensidad ; ●: Presente; ●: ausentes M: moderados; S: Severos

Cluster	Marcador	Población	Valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
1	CD38	bright	20200	Yellow	Green
1	CD38	dim	23311		Green
2	CD38	bright	83796		Blue
2	CD38	dim	25966		Green
3	CD38	bright	26672		Blue
3	CD38	dim	36288		Green
4	CD38	bright	30209		Green
4	CD38	dim	29204		Yellow
5	CD38	dim	28124	Yellow	Green
6	CD38	bright	17575		Blue
6	CD38	dim	18376	Green	Blue
7	CD38	bright	30804		Green
7	CD38	dim	16084		
8	CD38	bright	40678		Green
8	CD38	dim	31212		
9	CD38	dim	277216		Green
10	CD38	bright	25739		
10	CD38	dim	31406	Yellow	Green
11	CD38	bright	27158		Blue
11	CD38	dim	17030	Green	Blue
12	CD38	bright	24488	Yellow	Green
12	CD38	dim	34041		Blue
13	CD38	bright	12718	Yellow	Blue
13	CD38	dim	70147		Green
14	CD38	bright	18291	Green	Blue
15	CD38	bright	29939	Yellow	Green

CUADRO 4 RESUMEN DE LA EXPRESIÓN DE CD38⁺

Población / Grupo	Patrón observado	Interpretación funcional
-------------------	------------------	--------------------------

CD56bright	Activación elevada pero más homogénea	Respuesta regulada, menos dispersa entre clústeres
CD56dim	Activación extrema, con clústeres desproporcionados (clúster 9)	Hiperactivación asociada a inflamación exacerbada
Severos	Concentran los picos más altos de MFI	Estado de hiperactivación sostenida
Moderados	Activación elevada, pero más controlada	Activación funcional sin alcanzar niveles extremos

El marcador CD314⁺ (NKG2D) presentó una expresión elevada y sostenida en la población NK CD56bright, distribuida de manera consistente en múltiples clústeres, con valores de MFI que oscilaron entre 9,133 y 15,373 (Tabla 6). Este patrón indica que los NK CD56^{bright} mantienen una activación robusta y homogénea, lo cual respalda su función en el reconocimiento de células infectadas o transformadas. En contraste, la población CD56^{dim} mostró expresión únicamente en el clúster 15 (MFI 11,658), lo que refleja una presencia más restringida de este receptor en dicha fracción. Al considerar los grupos clínicos, los pacientes moderados parecen mantener una expresión intermedia-alta de CD314⁺ en las células NK bright, lo que favorece un equilibrio funcional entre activación y regulación. Por otro lado, en los pacientes severos, los picos más altos de MFI en algunos clústeres bright (superiores a 15,000) sugieren un estado de activación exacerbada, que, si bien potencia la capacidad citotóxica, también podría conducir a desregulación y agotamiento celular.

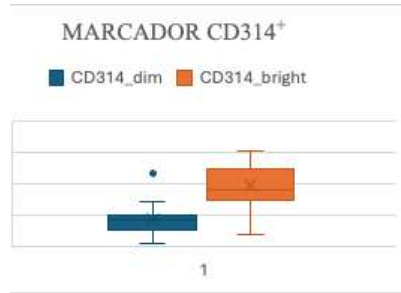
TABLA 6 VALORES DE MFI ELEVADOS Y PATRONES DE PRESENCIA EN PACIENTES MODERADOS VS. SEVEROS CD314⁺

cluster	marcador	población	valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
3	CD314	bright	9133	yellow	blue
5	CD314	bright	10115		
6	CD314	bright	11671		
7	CD314	bright	12130	lightgreen	
8	CD314	bright	12515		
9	CD314	bright	14416	yellow	blue
12	CD314	bright	15373		lightgreen
13	CD314	bright	13705		blue
15	CD314	dim	11658		

●: mayor intensidad ; ●: Presente; ●: ausentes M: moderados; S: Severos

El receptor activador NKG2D⁺ se expresó de manera heterogénea en las NK totales, pero con una intensidad significativamente mayor en las NK CD56^{bright} (Tabla 8).

GRÁFICO 2



Comparación de la intensidad media de fluorescencia entre grupos en azul población dim y en naranja población bright.

CUADRO 5. RESUMEN SOBRE LA EXPRESIÓN DE CD314⁺ (NKG2D)

Población / Grupo	Patrón observado	Interpretación funcional
CD56bright	Expresión elevada y distribuida en varios clústeres (MFI 9,133 – 15,373)	Activación homogénea, mantiene capacidad de reconocimiento y respuesta regulada
CD56dim	Expresión localizada en un único clúster (clúster 15, MFI 11,658)	Presencia más limitada; puede reflejar activación focalizada o inicio de disfunción
Severos	Concentran los valores de MFI más altos (picos en clústeres bright >15,000)	Estado de activación sostenida con riesgo de desregulación
Moderados	Mantienen expresión intermedia-alta en NK bright	Favorecen una detección eficaz y un balance funcional

El análisis de CD69 muestra un patrón de activación muy dispar entre subpoblaciones NK. En NK CD56^{dim} aparece un pico de MFI extraordinariamente alto en el clúster 4 ($\approx 105,891$)

(cuadro 3), indicativo de activación temprana intensa y sostenida en una fracción específica de células. En contraste, en las NK CD56^{bright} la señal es notablemente menor (clúster 7, MFI $\approx 11,710$), compatible con una activación más moderada y homogénea dentro de este compartimento más regulador. Desde la perspectiva clínica, un pico tan elevado en CD56^{dim} es el tipo de señal que suele concentrarse en pacientes severos, reflejando hiperactivación y riesgo de disfunción/agotamiento; mientras que la señal intermedia en CD56^{bright} es más acorde con pacientes moderados, en quienes predomina una activación controlada.

TABLA 7 . VALORES DE MFI ELEVADOS Y PATRONES DE PRESENCIA EN PACIENTES MODERADOS VS. SEVEROS

cluster	marcador	población	valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
4	CD69	dim	105891		
7	CD69	bright	11710		

CUADRO 6. RESUMEN SOBRE LA EXPRESIÓN DE CD69

Población / Grupo	Patron observado	Interpretación funcional
CD56 ^{bright}	MFI intermedio ($\approx 11,710$, clúster 7)	Activación temprana controlada, perfil regulador
CD56 ^{dim}	MFI muy alto ($\approx 105,891$, clúster 4)	Hiperactivación temprana focal, riesgo de disfunción
Moderados	(esperado) señal intermedia en bright	Activación útil sin exceso
Severos	(esperado) picos en dim	Activación exacerbada/agotamiento potencial

El estudio del marcador CD95⁺ (Fas) mostró una expresión destacada en ambas subpoblaciones NK, tanto CD56^{bright} como CD56^{dim}. En las células CD56^{bright}, la señal se distribuyó en varios clústeres con valores de MFI altos, particularmente en los clústeres 3 (9,023), 9 (12,061) y 13 (11,476) (Tabla 8), lo que evidencia una activación sostenida de rutas vinculadas a apoptosis y regulación de la respuesta inmune. En el caso de las células dim, la expresión fue más puntual, concentrándose principalmente en el clúster 9 (11,124). Desde la perspectiva clínica, los pacientes severos parecen agrupar los valores más elevados de CD95⁺, sobre todo en la fracción CD56^{bright}, lo que sugiere una mayor tendencia al agotamiento funcional y a la inducción de apoptosis, con la consecuente disminución de la actividad efectora. Por el contrario, en los pacientes moderados la expresión se mantiene en rangos intermedios, lo que podría interpretarse como un mecanismo homeostático que regula la respuesta sin comprometer de manera significativa la viabilidad y función de las células NK.

TABLA 8. VALORES DE MFI ELEVADOS Y PATRONES DE PRESENCIA EN PACIENTES MODERADOS VS. SEVEROS CD95

cluster	marcador	población	valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
3	CD95	bright	9023		
9	CD95	bright	12061		
9	CD95	dim	11124		
13	CD95	bright	11476		

CUADRO 7 RESUMEN SOBRE LA EXPRESIÓN DE CD69 EN LOS PACIENTES HOSPITALIZADOS CON COVID-19

Población / Grupo	Patron observado	Interpretación funcional
CD56bright	MFI elevado en varios clústeres (3, 9, 13)	Activación consistente de vías apoptóticas y regulatorias
CD56dim	Expresión focalizada (clúster 9)	Activación restringida, menor contribución a apoptosis
Moderados	Niveles intermedios de CD95	Mantenimiento de control homeostático sin comprometer la función
Severos	Picos más altos de CD95 en NK bright	Mayor predisposición a apoptosis y pérdida funcional

El análisis del marcador CD57⁺ evidenció una expresión destacada en ambas subpoblaciones NK, aunque con predominio en los NK CD56^{dim}, donde se identificaron varios clústeres con intensidades de MFI elevadas: clúster 1 (22,829), clúster 2 (14,764), clúster 7 (17,423) y clúster 14 (9,832) (Tabla 11). Esta distribución heterogénea refleja la presencia de subpoblaciones de células NK altamente diferenciadas y con menor capacidad proliferativa, lo que es consistente con el papel de CD57⁺ como marcador de senescencia inmunológica. En la fracción NK CD56^{bright}, también se observó un clúster con expresión elevada (clúster 3, MFI 25,833), lo que indica que incluso en un compartimento típicamente inmaduro persisten subgrupos con características de diferenciación terminal. Desde la perspectiva clínica, los pacientes moderados presentaron mayor expresión de CD57⁺ en sangre periférica en comparación con los severos, lo que sugiere la preservación de un pool de células NK maduras y citotóxicas competentes. En contraste, en los pacientes severos, la menor representación de CD57⁺ podría estar asociada a redistribución hacia los tejidos o a procesos de agotamiento celular, limitando la capacidad efectora. En conjunto, estos hallazgos

refuerzan la idea de que en los moderados predomina un fenotipo de madurez efectiva, mientras que en los severos se observa una tendencia hacia la pérdida funcional o la desregulación.

TABLA 9. VALORES DE MFI ELEVADOS Y PATRONES DE PRESENCIA EN PACIENTES MODERADOS VS. SEVEROS CD57⁺

cluster	marcador	población	valor-MFI	Categoría-M	Categoría-S
1	CD57	dim	22829		
2	CD57	dim	14764		
3	CD57	bright	25833		
7	CD57	dim	17423		
14	CD57	dim	9832		

CUADRO 8 RESUMEN DE LA EXPRESIÓN DE CD95⁺ EN PACIENTES CON COVID-19

Población / Grupo	Patron observado	Interpretación funcional
CD56bright	MFI elevado en el clúster 3 (MFI = 25,833)	Subpoblación con diferenciación avanzada dentro de un compartimento habitualmente inmaduro
CD56dim	MFI alto en varios clústeres (Cluster= 1, 2, 7, 14)	Distribución heterogénea; predominan NK maduras con menor capacidad proliferativa
Moderados	Mayor expresión de CD57 ⁺ en sangre periférica	Preservación de NK maduras competentes, con citotoxicidad efectiva y controlada
Severos	Expresión comparativamente menor	Sugiere redistribución al tejido o pérdida funcional por senescencia/apoptosis

Capítulo 5. Discusión

Los hallazgos de esta tesis ponen de manifiesto el papel fundamental de las células NK en la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV-2, aportando evidencia de que su actividad se encuentra estrechamente vinculada con la evolución clínica de COVID-19, utilizando citometría espectral de alta dimensión. Esta aproximación permitió una identificación precisa de subpoblaciones y la evaluación de la expresión de marcadores activadores, inhibitorios y de maduración, comparando individuos con enfermedad moderada y severa.

Los resultados sugirieron que la preservación de la actividad citotóxica de las células NK se asocia con presentaciones clínicas leves, mientras que su disfunción parece favorecer la progresión hacia cuadros graves. Los hallazgos confirman que las células NK desempeñan un papel crucial en la inmunopatogénesis de la COVID-19, al participar tanto en la eliminación directa de células infectadas como en la modulación de la respuesta inflamatoria sistémica.

En concordancia con reportes previos sobre SARS-CoV y MERS-CoV, observamos una disminución proporcional de linfocitos NK CD56^{bright} en pacientes con enfermedad severa. La reducción de estas células podría reflejar un reclutamiento activo hacia tejidos afectados como el pulmón, como se ha descrito en infecciones respiratorias severas, o bien una disfunción sistémica que compromete la coordinación inicial de la respuesta inmunitaria.

La heterogeneidad poblacional observada entre subtipos de NK reveló diferencias relevantes: las células CD56^{bright}, principales productoras de citocinas, estuvieron notablemente reducidas en pacientes críticos, lo que refleja una alteración en la capacidad reguladora de esta población. La variabilidad en la respuesta de las NK no solo depende de factores clínicos, sino también de determinantes genéticos y epigenéticos.

Esta observación concuerda con estudios recientes en COVID-19 que reportan pérdida o redistribución de esta subpoblación en cuadros críticos, asociada a una menor producción de citocinas protectoras y a un entorno inflamatorio desregulado. Por otro lado, la subpoblación CD56^{dim}, predominantemente citotóxica, mostró un perfil de activación aumentado, particularmente en pacientes con cuadros severos. Se detectó una sobreexpresión de CD57⁺ en el clúster 3, lo cual sugiere un estado de maduración terminal y posible senescencia funcional. Esta característica ha sido relacionada con una reducción en la capacidad proliferativa y una persistencia de señales de activación que podrían contribuir al daño tisular. Adicionalmente, se observó una alteración en la expresión de NKG2D (CD314⁺), un receptor activador clave para el reconocimiento de células infectadas. En los casos severos se evidenció una disminución de NKG2D en comparación con los moderados, hallazgo consistente con reportes recientes que vinculan niveles elevados de ligandos solubles de NKG2D (ULBP2, ULBP3) con la pérdida de expresión del receptor y la disminución de la función citotóxica mediada por ADCC (Fernández-Soto et al., 2024). Estos datos respaldan la hipótesis de que, en la enfermedad grave, la función de vigilancia inmunológica mediada por NK se encuentra comprometida, favoreciendo la replicación viral sostenida y la inflamación sistémica prolongada. La expresión de CD69⁺, marcador temprano de activación, también mostró un comportamiento diferencial. En pacientes moderados predominó en subpoblaciones CD56^{bright}, lo cual es consistente con una activación funcional dirigida a la producción de citocinas y al reclutamiento celular. En contraste, en los casos severos, su expresión se observó principalmente en subpoblaciones CD56^{dim}, lo que sugiere una activación intensa de las células citotóxicas posiblemente en un contexto inflamatorio exacerbado. Este cambio en el patrón de activación podría reflejar una desregulación de las

fases iniciales de la respuesta inmune innata, contribuyendo a la patogénesis observada en cuadros graves.

Los resultados también se contextualizan frente a otros coronavirus y virus respiratorios. En SARS-CoV y MERS-CoV se ha documentado linfopenia y desregulación NK similares, aunque menos prolongadas que en SARS-CoV-2. En infecciones por influenza y virus sincitial respiratorio (RSV), la activación inicial de NK es seguida por un agotamiento reversible; en COVID-19, en cambio, esta disfunción se mantiene de forma sostenida y se asocia con fenotipos de maduración terminal (CD57⁺), pérdida de receptores activadores y linfopenia marcada. Esto sugiere que SARS-CoV-2 induce un grado de disfunción NK más profundo y prolongado que otros virus respiratorios, lo que podría explicar parte de la severidad clínica y la persistencia inflamatoria observada.

Capítulo 6. Conclusiones

El presente estudio aporta evidencia sólida sobre el papel crítico de las células NK en la inmunopatogénesis de la COVID-19, destacando diferencias fenotípicas y funcionales entre pacientes con enfermedad moderada y severa. Se observó una disminución significativa de la subpoblación CD56^{bright} clave en la regulación inmunitaria temprana junto con un aumento de células CD56^{dim} CD57⁺ altamente diferenciadas, lo que sugiere un estado de maduración terminal y posible agotamiento funcional en los cuadros graves. Además, la pérdida de receptores activadores como NKG2D (CD314⁺) y las alteraciones en marcadores de activación como CD69⁺ refuerzan la hipótesis de una disfunción de la vigilancia inmunológica innata en la enfermedad severa. Estos hallazgos, obtenidos mediante citometría espectral y análisis multidimensional, resaltan la relevancia de las células NK como potenciales biomarcadores inmunológicos para estratificar la severidad clínica y orientar intervenciones terapéuticas futuras. Comprender estas dinámicas celulares no solo amplía el conocimiento sobre la respuesta inmune frente a SARS-CoV-2, sino que también contribuye a fortalecer las estrategias de preparación ante futuras epidemias virales.

7. Referencias

1. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
2. Afrin, S., & Sharmin, S. (2024). Role of Interleukin-6 as a Predictor in Assessing Severity of COVID-19 Patients: A Hospital Based Cross-Sectional Study. In *International Journal of Science and Healthcare Research* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.52403/ijshr.20240225>
3. Anolik, J., Looney, R. J., Bottaro, A., Sanz, I., & Young, F. (2003). Down-regulation of CD20 on B cells upon CD40 activation. *European Journal of Immunology*, 33(9), 2398–2409. <https://doi.org/10.1002/eji.200323515>
4. Arbini, A. A. (2005). Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols, Second Edition. *Leukemia Research*, 29(1), 109–110. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.05.007>
5. Ashmore, P., & Sherwood, E. (2023). An overview of COVID-19 global epidemiology and discussion of potential drivers of variable global pandemic impacts. In *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Vol. 78, pp. II2–II11). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad311>
6. Balachandran, H., Kroll, K., Terry, K., Manickam, C., Jones, R., Woolley, G., Hayes, T., Martinot, A. J., Sharma, A., Lewis, M., Jost, S., & Reeves, R. K. (2024). NK cells modulate in vivo control of SARS-CoV-2 replication and suppression of lung damage. *PLoS Pathogens*, 20(8 August). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012439>
7. Barbon, S., Armellini, F., Passerini, V., De Angeli, S., Primerano, S., Del Pup, L., Durante, E., Macchi, V., De Caro, R., Parnigotto, P. P., Veronesi, A., & Porzionato, A. (2024). Innate immune response in COVID-19: single-cell multi-omics profile of NK lymphocytes in a clinical case series. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 22(1), 496. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01867-5>

8. Batista, J. C., DeAntonio, R., & López-Vergès, S. (2025). Dynamics of Innate Immunity in SARS-CoV-2 Infections: Exploring the Impact of Natural Killer Cells, Inflammatory Responses, Viral Evasion Strategies, and Severity. *Cells*, 14(11), 763.
<https://doi.org/10.3390/cells14110763>
9. Beelen, N. A., Ehlers, F. A. I., Bos, G. M. J., & Wieten, L. (2023). Inhibitory receptors for HLA class I as immune checkpoints for natural killer cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. In *Cancer Immunology, Immunotherapy* (Vol. 72, Issue 4, pp. 797–804). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
<https://doi.org/10.1007/s00262-022-03299-x>
10. Bender, B. S., Johnstontj, M. P., & Small, P. A. (1991). Influenza in senescent mice: impaired cytotoxic T-lymphocyte activity is correlated with prolonged infection. In *Immunology* (Vol. 72).
11. Ben-Shmuel, A., Sabag, B., Puthenveetil, A., Biber, G., Levy, M., Jubany, T., Awwad, F., Roy, R. K., Joseph, N., Matalon, O., Kivelevitz, J., & Barda-Saad, M. (2022). Inhibition of SHP-1 activity by PKC- θ regulates NK cell activation threshold and cytotoxicity. *ELife*, 11.
<https://doi.org/10.7554/eLife.73282>
12. Berghäll, E., Hultström, M., Frithiof, R., Lipcsey, M., & Hahn-Strömberg, V. (2022a). The Evolution of Blood Cell Phenotypes, Intracellular and Plasma Cytokines and Morphological Changes in Critically Ill COVID-19 Patients. *Biomedicines*, 10(5).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10050934>
13. Berghäll, E., Hultström, M., Frithiof, R., Lipcsey, M., & Hahn-Strömberg, V. (2022b). The Evolution of Blood Cell Phenotypes, Intracellular and Plasma Cytokines and Morphological Changes in Critically Ill COVID-19 Patients. *Biomedicines*, 10(5).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10050934>

14. Bertoni, A., Penco, F., Mollica, H., Bocca, P., Prigione, I., Corcione, A., Cangelosi, D., Schena, F., Del Zotto, G., Amaro, A., Paladino, N., Pontali, E., Feasi, M., Signa, S., Bustaffa, M., Caorsi, R., Palmeri, S., Contini, P., De Palma, R., ... Volpi, S. (2022). Spontaneous NLRP3 inflammasome-driven IL-1- β secretion is induced in severe COVID-19 patients and responds to anakinra treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 150(4), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.05.029>
15. Bi, J., & Wang, X. (2020). Molecular Regulation of NK Cell Maturation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01945>
16. Bjorgen, J. C., Dick, J. K., Cromarty, R., Hart, G. T., & Rhein, J. (2023). NK cell subsets and dysfunction during viral infection: a new avenue for therapeutics? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1267774>
17. Braakman, E., Sturm, E., Vijverberg, K., Van Krimpen, B. A., Gratama, J. W., & Bolhuis, R. L. H. (1990). Expression of CD45 isoforms by fresh and activated human yd T lymphocytes and natural killer cells. In *International Immunology* (Vol. 3, Issue 7). <http://intimm.oxfordjournals.org/>
18. Brodin, P., & Davis, M. M. (2017). Human immune system variation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 21–29). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.125>
19. Calleri, F., Nastasi, G., & Romano, V. (2021). Continuous-time stochastic processes for the spread of COVID-19 disease simulated via a Monte Carlo approach and comparison with deterministic models. *Journal of Mathematical Biology*, 83(4). <https://doi.org/10.1007/s00285-021-01657-4>
20. Camacho Moll, M. E., Mata Tijerina, V. L., Silva Ramírez, B., Peñuelas Urquides, K., González Escalante, L. A., Escobedo Guajardo, B. L., Cruz Luna, J. E., Corrales Pérez, R., Gómez García, S., & Bermúdez de León, M. (2023). Sex, Age, and Comorbidities Are

- Associated with SARS-CoV-2 Infection, COVID-19 Severity, and Fatal Outcome in a Mexican Population: A Retrospective Multi-Hospital Study. *Journal of Clinical Medicine*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/jcm12072676>
21. Campoverde Cárdenas, A. D., López Laaz, S. A., Correa Quinto, W. P., & Cárdenas Rodríguez, J. D. (2019). Citometría de flujo en el diagnóstico de inmunopatía. *RECIAMUC*, 3(1), 218–241. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/3.\(1\).enero.2019.218-241](https://doi.org/10.26820/reciamuc/3.(1).enero.2019.218-241)
 22. Carvacho, C., Donoso, N. V., Medina, R., Gallegos, C., Carvacho, R., Uauy, O., Ward, M. I., Márquez-Espinoza, C., Pablo, J., Quiñeman, S., & Gac, H. (2022). *Unidad Geriátrica de Agudos Evolution and prognostic factors associated with mortality in older adults hospitalized for COVID-19.*
 23. Castriconi, R., Carrega, P., Dondero, A., Bellora, F., Casu, B., Regis, S., Ferlazzo, G., & Bottino, C. (2018). Molecular Mechanisms Directing Migration and Retention of Natural Killer Cells in Human Tissues. *Front Immunol*, 9, 2324. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02324>
 24. Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*, 130(5), 2620–2629. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
 25. Chen, X., Huang, J., Huang, Y., Chen, J., Huang, Y., Jiang, X., & Shi, Y. (2020). Characteristics of immune cells and cytokines in patients with coronavirus disease 2019 in Guangzhou, China. *Hum Immunol*, 81(12), 702–708. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.08.006>
 26. Chilunda, V., Martinez-Aguado, P., Xia, L. C., Cheney, L., Murphy, A., Veksler, V., Ruiz, V., Calderon, T. M., & Berman, J. W. (2021). Transcriptional Changes in CD16+

- Monocytes May Contribute to the Pathogenesis of COVID-19. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.665773>
27. Chiossone, L., & Vivier, E. (2018). NK Cell-Based Therapies. In *Oncoimmunology* (pp. 275–288). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62431-0_16
 28. Cooper, M. (2001). *The biology of human natural killer-cell subsets*.
 29. Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Research*, 176, 104742. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7114094/pdf/main.pdf>
 30. De Colvenaer, V., Taveirne, S., Delforche, M., De Smedt, M., Vandekerckhove, B., Taghon, T., Boon, L., Plum, J., & Leclercq, G. (2011). CD27-deficient mice show normal NK-cell differentiation but impaired function upon stimulation. *Immunology and Cell Biology*, 89(7), 803–811. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.171>
 31. De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D., & Ginaldi, L. (2005). Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Letters*, 579(10), 2035–2039. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.055>
 32. De Wit, E., Van Doremalen, N., Falzarano, D., & Munster, V. J. (2016). SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), 523.
 33. Demel, I., Koristek, Z., Motaïs, B., Hajek, R., & Jelinek, T. (2022). Natural killer cells: Innate immune system as a part of adaptive immunotherapy in hematological malignancies. In *American Journal of Hematology* (Vol. 97, Issue 6, pp. 802–817). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ajh.26529>
 34. Deng, Y., & Yu, J. (2015). *The negative NK cell maturation checkpoint Foxo1* (Vol. 6, Issue 32). www.impactjournals.com/oncotarget

35. Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., & Gregory, C. D. (1998). *Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells*.
36. Di Gennaro, F., Pizzol, D., Marotta, C., Antunes, M., Racalbuto, V., Veronese, N., & Smith, L. (2020). Coronavirus diseases (COVID-19) current status and future perspectives: A narrative review. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082690>
37. Di Vito, C., Calcaterra, F., Coianiz, N., Terzoli, S., Voza, A., Mikulak, J., Della Bella, S., & Mavilio, D. (2022a). Natural Killer Cells in SARS-CoV-2 Infection: Pathophysiology and Therapeutic Implications. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.888248>
38. Di Vito, C., Calcaterra, F., Coianiz, N., Terzoli, S., Voza, A., Mikulak, J., Della Bella, S., & Mavilio, D. (2022b). Natural Killer Cells in SARS-CoV-2 Infection: Pathophysiology and Therapeutic Implications. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.888248>
39. Diefenbach, A. (2013). Natural Killer Cells. In *Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity* (pp. 75–93). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394802-1.00004-2>
40. Diefenbach, A., Colonna, M., & Koyasu, S. (2014). Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 3, pp. 354–365). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.09.005>
41. Doganyigit, Z., Eroglu, E., & Akyuz, E. (2022a). Inflammatory mediators of cytokines and chemokines in sepsis: From bench to bedside. In *Human and Experimental Toxicology* (Vol. 41). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/09603271221078871>
42. Doganyigit, Z., Eroglu, E., & Akyuz, E. (2022b). Inflammatory mediators of cytokines and chemokines in sepsis: From bench to bedside. In *Human and Experimental Toxicology* (Vol. 41). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/09603271221078871>

43. Fernandez-Messina, L., Reyburn, H. T., & Vales-Gomez, M. (2012). Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol*, 3, 299. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00299>
44. Fernández-Soto, D., García-Jiménez, Á. F., Casasnovas, J. M., Valés-Gómez, M., & Reyburn, H. T. (2024). Elevated levels of cell-free NKG2D-ligands modulate NKG2D surface expression and compromise NK cell function in severe COVID-19 disease. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1273942>
45. Finton, K. A., & Strong, R. K. (2012). Structural insights into activation of antiviral NK cell responses. *Immunological Reviews*, 250(1), 239–257. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01168.x>
46. Foltz, J. A., Tran, J., Fisk, B., Wong, P., Khan, S. M., Berrien-Elliott, M. M., Becker-Hapak, M., Russler-Germain, D. A., Marsala, L., Bednarski, J. J., Zimmerman, C., Cubitt, C. C., Marin, N. D., Zhou, A. Y., Jacobs, M. T., Foster, M., Schappe, T., Pence, P., Cashen, A., ... Fehniger, T. A. (2023). *Brief IL-12, IL-15, IL-18 activation drives the acquisition of two distinct memory-like NK cell states*. https://academic.oup.com/jimmunol/article/210/Supplement_1/160.14/7947883
47. Gars, M. Le, Seiler, C., Kay, A. W., Bayless, N. L., Sola, E., Starosvetsky, E., Moore, L., Shen-Orr, S. S., Aziz, N., Khatri, P., Dekker, C. L., Swan, G. E., Davis, M. M., Holmes, S., & Blish, C. A. (2018). *CD38 contributes to human natural killer cell responses through a role in immune synapse formation*. <https://doi.org/10.1101/349084>
48. González, S. (2022). Evaluación de pruebas funcionales de citotoxicidad: Natural killer en patología gravídica.
49. Graninger, M., Endmayr, V., Kühner, L. M., Berger, S. M., Rommer, P., Klotz, S., Gelpi, E., Vietzen, H., Höftberger, R., & Puchhammer-Stöckl, E. (2024). Association Between NK Cell Genetic Variants and the Development of Long COVID Associated- and Prepandemic

Small Fiber Neuropathy. *Journal of Medical Virology*, 96(12).

<https://doi.org/10.1002/jmv.70091>

50. Grier, J. T., Forbes, L. R., Monaco-Shawver, L., Oshinsky, J., Atkinson, T. P., Moody, C., Pandey, R., Campbell, K. S., & Orange, J. S. (2012). Human immunodeficiency-causing mutation defines CD16 in spontaneous NK cell cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3769–3780. <https://doi.org/10.1172/JCI64837>
51. Guo, H., Kumar, P., & Malarkannan, S. (2010). Evasion of natural killer cells by influenza virus. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(2), 189–194. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610319>
52. Hart, O. M., Athie-Morales, V., O’connor, G. M., & Gardiner, C. M. (2005). *TLR7/8-Mediated Activation of Human NK Cells Results in Accessory Cell-Dependent IFN-Production 1*. <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/175/3/1636/1205078/1636.pdf>
53. Hasan, M. Z., Claus, M., Krüger, N., Reusing, S., Gall, E., Bade-Döding, C., Braun, A., Watzl, C., Uhrberg, M., & Walter, L. (2024). SARS-CoV-2 infection induces adaptive NK cell responses by spike protein-mediated induction of HLA-E expression. *Emerging Microbes and Infections*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2361019>
54. Hayakawa, Y., & Smyth, M. J. (2006). CD27 Dissects Mature NK Cells into Two Subsets with Distinct Responsiveness and Migratory Capacity. *The Journal of Immunology*, 176(3), 1517–1524. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1517>
55. Hornef et al. (2002). *Bacterial Strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses*.
56. Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

57. Hutcheon, C., Paulvannan, P., & Subramanian, N. (2016). Cytoplasmic Sensing in Innate Immunity. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Vol. 3, pp. 710–726). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30108-0>
58. Imširović, V., Lenartić, M., Wensveen, F. M., Polić, B., & Jelenčić, V. (2023). Largely preserved functionality after the combined loss of NKG2D, NCR1 and CD16 demonstrates the remarkable plasticity of NK cell responsiveness. *Frontiers in Immunology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1191884>
59. Kandi, V., Thungaturthi, S., Vadakedath, S., Gundu, R., & Mohapatra, R. K. (2021). Mortality Rates of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Caused by the Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Cureus*.
<https://doi.org/10.7759/cureus.14081>
60. Karki, R., Sharma, B. R., Tuladhar, S., Williams, E. P., Zalduondo, L., Samir, P., Zheng, M., Sundaram, B., Banoth, B., Malireddi, R. K. S., Schreiner, P., Neale, G., Vogel, P., Webby, R., Jonsson, C. B., & Kanneganti, T. D. (2021). Synergism of TNF-alpha and IFN-gamma Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell*, 184(1), 149-168 e17.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.025>
61. Kokudo, N., & Sugiyama, H. (2021). Hospital capacity during the COVID-19 pandemic. *Global Health & Medicine*, 3(2), 56–59. <https://doi.org/10.35772/ghm.2021.01031>
62. Kwon, H. J., Kim, N., & Kim, H. S. (2017). Molecular checkpoints controlling natural killer cell activation and their modulation for cancer immunotherapy. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 49, Issue 3). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/emm.2017.42>

63. Kyrysyuk, O., & Wucherpfennig, K. W. (2025). Designing Cancer Immunotherapies That Engage T Cells and NK Cells. *Annual Review of Immunology*.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101921>
64. Lanier, L. L. (1998). NK CELL RECEPTORS. In *Annu. Rev. Immunol* (Vol. 16).
www.annualreviews.org
65. Lanier, L. L. (2015). NKG2D receptor and its ligands in host defense. *Cancer Immunology Research*, 3(6), 575–582. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>
66. Lanier, L. L. (2016). Natural Killer Cells. In *Encyclopedia of Immunobiology* (Vol. 1, pp. 353–356). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.03009-5>
67. Lau, M. S., Liu, C., Siegler, A., Sullivan, P., Waller, L. A., Shioda, K., & Lopman, B. (2022). *Effects of Lockdowns And Its Impacts On Age-Specific Transmission Dynamics of SARS-Cov-2 In Georgia, USA*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1171299/v1>
68. Lavrik, I. N. (2011). Regulation of death receptor-induced apoptosis induced via CD95/Fas and other death receptors. In *Molecular Biology* (Vol. 45, Issue 1, pp. 150–155).
<https://doi.org/10.1134/S0026893311010079>
69. Lee, G., Schauner, R., Burke, J., Borocz, J., Vasana, S., Sobieraj, L., Giraudo, M., Jackson, Z., Ansari, Q., Navas, M., Sakr, H., & Wald, D. (2023). NK cells from COVID-19 positive patients exhibit enhanced cytotoxic activity upon NKG2A and KIR2DL1 blockade. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1022890>
70. Lee, H. N., Manangeeswaran, M., Lewkowicz, A. P., Engel, K., Chowdhury, M., Garige, M., Eckhaus, M. A., Sourbier, C., Ireland, D. D. C., & Verthelyi, D. (2022). NK cells require immune checkpoint receptor LILRB4/gp49B to control neurotropic Zika virus infections in mice. *JCI Insight*, 7(3). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.151420>

71. Lenart, M., Rutkowska-Zapała, M., & Siedlar, M. (2024a). NK-cell receptor modulation in viral infections. In *Clinical and Experimental Immunology* (Vol. 217, Issue 2, pp. 151–158). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cei/uxae045>.
72. Lenart, M., Rutkowska-Zapała, M., & Siedlar, M. (2024b). NK-cell receptor modulation in viral infections. In *Clinical and Experimental Immunology* (Vol. 217, Issue 2, pp. 151–158). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cei/uxae045>.
73. Lenart, M., Rutkowska-Zapała, M., & Siedlar, M. (2024c). NK-cell receptor modulation in viral infections. In *Clinical and Experimental Immunology* (Vol. 217, Issue 2, pp. 151–158). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/cei/uxae045>.
74. Li, L., Li, J., Gao, M., Fan, H., Wang, Y., Xu, X., Chen, C., Liu, J., Kim, J., Aliyari, R., Zhang, J., Jin, Y., Li, X., Ma, F., Shi, M., Cheng, G., & Yang, H. (2021). Interleukin-8 as a Biomarker for Disease Prognosis of Coronavirus Disease-2019 Patients. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.602395>.
75. Li, X., Mi, Z., Liu, Z., & Rong, P. (2024). SARS-CoV-2: pathogenesis, therapeutics, variants, and vaccines. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1334152>.
76. Lin, J. X., Du, N., Li, P., Kazemian, M., Gebregiorgis, T., Spolski, R., & Leonard, W. J. (2017). Critical functions for STAT5 tetramers in the maturation and survival of natural killer cells. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01477-5>.
77. Ling, L., Chen, Z., Lui, G., Wong, C. K., Wong, W. T., Ng, R. W. Y., Tso, E. Y. K., Fung, K. S. C., Chan, V., Yeung, A. C. M., Hui, D. S. C., & Chan, P. K. S. (2021). Longitudinal Cytokine Profile in Patients With Mild to Critical COVID-19. *Front Immunol*, 12, 763292. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.763292>.

78. Mace, E. M. (2023). Human natural killer cells: Form, function, and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 151(2), 371–385.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.09.022>.
79. Malmberg, K. J., Carlsten, M., Björklund, A., Sohlberg, E., Bryceson, Y. T., & Ljunggren, H. G. (2017). Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. In *Seminars in Immunology* (Vol. 31, pp. 20–29). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.002>.
80. Manandhar, T., Hò, G. G. T., Pump, W. C., Blasczyk, R., & Bade-Doeding, C. (2019). Battle between host immune cellular responses and hcmv immune evasion. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 15). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms20153626>
81. Mariuzza, R. A., Singh, P., Karade, S. S., Shahid, S., & Sharma, V. K. (2025). Recognition of Self and Viral Ligands by NK Cell Receptors. In *Immunological Reviews* (Vol. 329, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/imr.13435>.
82. Marti. (2001). *Introduction to Flow Cytometry*. <https://doi.org/10.1053/shm.2001.21921>
83. Martinez, A. L., Shannon, M. J., Sloan, T., & Mace, E. M. (2023). *CD56/NCAM mediates cell migration of human NK cells by promoting integrin-mediated adhesion turnover*.
<https://doi.org/10.1101/2023.11.21.567714>.
84. Meager, A., & Wadhwa, M. (2013). An Overview of Cytokine Regulation of Inflammation and Immunity. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0024658>
85. Mercier, F. E., Ragu, C., & Scadden, D. T. (2012). The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 49–60).
<https://doi.org/10.1038/nri3132>.

86. Moebius, J., Guha, R., Peterson, M., Abdi, K., Skinner, J., Li, S., Arora, G., Traore, B., Rajagopalan, S., Long, E. O., & Crompton, P. D. (2020). *PD-1 Expression on NK Cells in Malaria-Exposed Individuals Is Associated with Diminished Natural Cytotoxicity and Enhanced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*. <https://doi.org/10.1128/IAI>.
87. Morbach, H., Schickel, J. N., Cunningham-Rundles, C., Conley, M. E., Reisli, I., Franco, J. L., & Meffre, E. (2016). CD19 controls Toll-like receptor 9 responses in human B cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(3), 889-898.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.040>.
88. Moretta, A., Poggi, A., Pende, D., Tripodi, G., Orengo, A. M., Pella, N., Augugliaro, G., Bottino, C., Ciccone, E., & Moretta, L. (1991). *CD69-mediated Pathway of Lymphocyte Activation: Anti-CD69 Monoclonal Antibodies Trigger the Cytolytic Activity of Different Lymphoid Effector Cells with the Exception of Cytolytic T Lymphocytes Expressing T Cell Receptor*.
89. Mwimanzi, P., Markle, T. J., Ueno, T., & Brockman, M. A. (2012). Human Leukocyte Antigen (HLA) class I down-regulation by human immunodeficiency virus type 1 negative factor (HIV-1 Nef): What might we learn from natural sequence variants? In *Viruses* (Vol. 4, Issue 9, pp. 1711–1730). <https://doi.org/10.3390/v4091711>.
90. Nieto-Gutierrez, W., Campos-Chamberg, J., Gonzalez-Ayala, E., Oyola-Garcia, O., Alejandro-Mora, A., Luis-Aguirre, E., Pasquel-Santillan, R., Leiva-Aguirre, J., Ugarte-Gil, C., & Loyola, S. (2024). Prediction models of COVID-19 fatality in nine Peruvian provinces: A secondary analysis of the national epidemiological surveillance system. *PLOS Global Public Health*, 4(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0002854>.
91. Nou, E., Zhou, Y., Nou, D. D., & Blankson, J. N. (2009). Effective Downregulation of HLA-A*2 and HLA-B*57 by Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates

- Cultured from Elite Suppressors. *Journal of Virology*, 83(13), 6941–6946.
<https://doi.org/10.1128/jvi.00306-09>.
92. Obeagu, E. I. (2024). Role of cytokines in immunomodulation during malaria clearance. *Annals of Medicine & Surgery*, 86(5), 2873–2882.
<https://doi.org/10.1097/ms9.0000000000002019>.
93. Ostan, R., Bucci, L., Capri, M., Salvioli, S., Scurti, M., Pini, E., Monti, D., & Franceschi, C. (2008). Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. In *NeuroImmunoModulation* (Vol. 15, Issues 4–6, pp. 224–240).
<https://doi.org/10.1159/000156466>.
94. Ovsyannikova, I. G., Haralambieva, I. H., Crooke, S. N., Poland, G. A., & Kennedy, R. B. (2020). The role of host genetics in the immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 susceptibility and severity. *Immunological Reviews*, 296(1), 205–219.
<https://doi.org/10.1111/imr.12897>.
95. Pagani, I., Ghezzi, S., Alberti, S., Poli, G., & Vicenzi, E. (2020). Genomic determinants of pathogenicity in SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. In *European Physical Journal Plus* (Vol. 138, Issue 2). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-03719-6>.
96. Parry, H. M., Stevens, T., Oldreive, C., Zadran, B., McSkeane, T., Rudzki, Z., Paneesha, S., Chadwick, C., Stankovic, T., Pratt, G., Zuo, J., & Moss, P. (2016). NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma. *Oncotarget*, 7(42), 68513–68526.
<https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.12097>.
97. Pérez Romero Rodríguez., S. (2018). *Fundamentos de Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica*.

98. Petrey, A. C., Qeadan, F., Middleton, E. A., Pinchuk, I. V, Campbell, R. A., & Beswick, E. J. (2021). Cytokine release syndrome in COVID-19: Innate immune, vascular, and platelet pathogenic factors differ in severity of disease and sex. *J Leukoc Biol*, 109(1), 55–66.
<https://doi.org/10.1002/JLB.3COVA0820-410RRR>.
99. Prinz, D., Klein, K., List, J., Knab, V. M., Menzl, I., Leidenfrost, N., Heller, G., Polić, B., Putz, E. M., Witalisz-Siepracka, A., Sexl, V., & Gotthardt, D. (2020). Loss of NKG2D in murine NK cells leads to increased perforin production upon long-term stimulation with IL-2. *European Journal of Immunology*, 50(6), 880–890. <https://doi.org/10.1002/eji.201948222>
100. Quatrini, L., Della Chiesa, M., Sivori, S., Mingari, M. C., Pende, D., & Moretta, L. (2021). Human NK cells, their receptors and function. In *European Journal of Immunology* (Vol. 51, Issue 7, pp. 1566–1579). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1002/eji.202049028>.
101. Raulet, D. H., & Vance, R. E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 6, Issue 7, pp. 520–531). <https://doi.org/10.1038/nri1863>
102. Ravetch, J., & Lanier, L. (2000). *Immune inhibitory receptors*.
103. Rudnicka, K., Matusiak, A., & Chmiela, M. (2015). CD25 (IL-2R) expression correlates with the target cell induced cytotoxic activity and cytokine secretion in human natural killer cells. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 885–894.
https://doi.org/10.18388/abp.2015_1152
104. Ruth, S. (2024). Epigenetic Regulation of Immune Cells in Health and Disease: A Comprehensive Review. *IDOSR JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 10(2), 1–7. <https://doi.org/10.59298/IDOSR/JST/24/102.17000>.
105. Sallard, E., Halloy, J., Casane, D., Decroly, E., & van Helden, J. (2021). Tracing the origins of SARS-COV-2 in coronavirus phylogenies: a review. In *Environmental Chemistry*

- Letters* (Vol. 19, Issue 2, pp. 769–785). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01151-1>.
106. Sancho-Martinez, I., & Martin-Villalba, A. (2009). Tyrosine phosphorylation and CD95: A Fascinating switch. *Cell Cycle*, 8(6), 838–842. <https://doi.org/10.4161/cc.8.6.7906>
 107. Sathe, P., Pang, S. H. M., Delconte, R., Elwood, N., & Huntington, N. D. (2017). Identification of novel human NK cell progenitor subsets. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122716>.
 108. Shapiro, H. M. (2003). Frontmatter. In *Practical Flow Cytometry*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471722731.fmatter>.
 109. Shibuya, A., & Shibuya, K. (2021). DNAM-1 versus TIGIT: Competitive roles in tumor immunity and inflammatory responses. In *International Immunology* (Vol. 33, Issue 12, pp. 687–692). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab085>.
 110. Sim, M. J. W., Brennan, P., Wahl, K. L., Lu, J., Rajagopalan, S., Sun, P. D., & Long, E. O. (2023). *Innate receptors with high specificity for HLA class I–peptide complexes*. <https://doi.org/10.1101/2023.02.06.527249>.
 111. Sinvani, L., Marziliano, A., Makhnevich, A., Liu, Y., Qiu, M., Zhang, M., Ardito, S., Carney, M., Diefenbach, M., Davidson, K., & Burns, E. (2021). *Factors Associated with Mortality in Hospitalized Older Adults with COVID-19: A Large Retrospective Cohort Study*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-148659/v1>.
 112. Sivori, S., Vacca, P., Del Zotto, G., Munari, E., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2019). Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 16, Issue 5, pp. 430–441). Chinese Soc Immunology. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0206-4>.
 113. Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L., Degli-Esposti, M. A., & Hayakawa, Y. (2005). Activation

- of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*, 42(4), 501–510.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>.
114. Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), 1–20.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>.
 115. Soleimanian, S., Yaghobi, R., Karimi, M. H., Geramizadeh, B., & Roozbeh, J. (2022). Loss of CCR7 Expression on CD57 + CD56/ CD16 + NK Cells Correlates with Viral Load in CMV Reactivated Kidney Transplant Recipients. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 16(1), 52–62. <https://doi.org/10.52547/ijkd.6721>.
 116. Tan, L., Wang, Q., Zhang, D., Ding, J., Huang, Q., Tang, Y. Q., Wang, Q., & Miao, H. (2020). Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer Nature.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0148-4>.
 117. Tripathi, S. (2021). *Immune Response to Viral Infections*.
 118. Van Damme, W., Dahake, R., Delamou, A., Ingelbeen, B., Wouters, E., Vanham, G., Van De Pas, R., Dossou, J. P., Ir, P., Abimbola, S., Van Der Borght, S., Narayanan, D., Bloom, G., Van Engelse, I., Ag Ahmed, M. A., Kiendrébéogo, J. A., Verdonck, K., De Brouwere, V., Bello, K., ... Assefa, Y. (2020). The COVID-19 pandemic: Diverse contexts; Different epidemics - How and why? In *BMJ Global Health* (Vol. 5, Issue 7). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2020-003098>.
 119. van Eeden, C., Khan, L., Osman, M. S., & Tervaert, J. W. C. (2020a). Natural killer cell dysfunction and its role in covid-19. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 17, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21176351>.
 120. Vargas-Inchaustegui, D. A., Demberg, T., & Robert-Guroff, M. (2011). A CD8 α - subpopulation of macaque circulatory natural killer cells can mediate both antibody-

- dependent and antibody-independent cytotoxic activities. *Immunology*, 134(3), 326–340.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03493.x>.
121. Wang, X., & Zhao, X. Y. (2021). Transcription Factors Associated With IL-15 Cytokine Signaling During NK Cell Development. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.610789>.
 122. WHO. (2022). *COVID-19 Weekly Epidemiological Updagte. Edition 115*.
 123. Woelk, J., Hornsteiner, F., Aschauer-Wallner, S., Stoitzner, P., Baier, G., & Hermann-Kleiter, N. (2025a). Regulation of NK cell development, maturation, and antitumor responses by the nuclear receptor NR2F6. *Cell Death and Disease*, 16(1).
<https://doi.org/10.1038/s41419-025-07407-4>.
 124. Wu, X., Zhou, H., Huang, W., & Jia, B. (2020). Strategies for qualified triage stations and fever clinics during the outbreak of COVID-2019 in the county hospitals of Western Chongqing. *Journal of Hospital Infection*, 105(2), 128–129.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.03.021>.
 125. Wu, Y., Tian, Z., & Wei, H. (2017). Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00930>.
 126. Yan, J., Wolff, M. J., Unternaehrer, J., Mellman, I., & Mamula, M. J. (2005). Targeting antigen to CD19 on B cells efficiently activates T cells. *International Immunology*, 17(7), 869–877. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh266>.
 127. Zhang, B., Liu, S., Tan, T., Huang, W., Dong, Y., Chen, L., Chen, Q., Zhang, L., Zhong, Q., Zhang, X., Zou, Y., & Zhang, S. (2020). Treatment With Convalescent Plasma for Critically Ill Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection. *Chest*, 158(1), e9–e13. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.03.039>.

128. Zhou, Y., Fu, B., Zheng, X., Wang, D., Zhao, C., Qi, Y., Sun, R., Tian, Z., Xu, X., & Wei, H. (2020). Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *National Science Review*, 7(6), 998–1002. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa041>.

8. Anexo

CNBI-114-2021

30 de septiembre de 2021

Doctor,

Juan Carlos Batista

Investigadora Principal

E. S. D.

Estimado Dr. Batista:

El CNBI en su reunión ordinaria del día martes 28 de septiembre de 2021, ha discutido su solicitud de exención de revisión por parte de un comité de bioética de la investigación para el estudio: "Caracterización de las células NK en pacientes hospitalizados por SARS CoV-2 en Panamá", del cual es usted investigadora principal.

Luego de presentar la nota con fecha 24 de septiembre de 2021, el CNBI en pleno ha aprobado la exención de revisión ya que este proyecto **no requiere** de aprobación bioética, por tratarse de un estudio de investigación donde no intervienen participantes humanos

Sin más que agregar.

Atentamente,



Jessica Candanedo

Presidenta Ad hoc

Comité Nacional de Bioética de la Investigación

