

Leucèmia Limfocítica de cèl·lules T Grans Granulars (T-LGLL)

El sistema immunitari és una xarxa complexa constituïda per cèl·lules, teixits i òrgans que treballen de manera conjunta per mantenir l'organisme lliure d'infeccions i processos neoplàsics. Entre les cèl·lules que hi participen destaquen els limfòcits, que presenten la capacitat d'identificar agents patògens i generar respostes immunitàries tant innates com adaptatives.

Podem distingir tres subfamílies de limfòcits principals: Limfòcits B, responsables de la producció d'anticossos; limfòcits T, essencials en la resposta adaptativa; i limfòcits Natural Killer (NK), que formen part de la resposta immunitària innata.

Els limfòcits T pertanyen al sistema immunitari adaptatiu i s'originen a la medul·la òssia a partir d'un progenitor limfoide comú. Posteriorment es desplacen cap al timus, on maduren i adquireixen la capacitat de reconèixer antígens a través del receptor de superfície TCR.

Durant la seva maduració, pateixen un procés de recombinació dels gens TCR α , TCR β , TCR γ i TCR δ , paral·lel a canvis fenotípics que van des d'un estat CD4–CD8– fins al fenotip CD4+CD8+. Posteriorment, són sotmesos a un procés de selecció que elimina aquelles cèl·lules amb reactivitat envers antígens propis.

Finalment els limfòcits T es diferencien en dues subpoblacions principals:

- **Limfòcits T helper (CD4+CD8-):** Encarregats de modular la resposta immunitària a través de la secreció de citocines i l'activació d'altres cèl·lules.
- **Limfòcits T citotòxics (CD4-CD8+):** responsables d'eliminar cèl·lules infectades o tumorals.

Aquests limfòcits CD4+ o CD8+ madurs, posteriorment migren a sang perifèrica i als òrgans limfàtics secundaris, on entren en contacte amb l'antigen, procés essencial per a que cada subpoblació de limfòcits T desenvolupi el seu rol en la resposta immunitària i aquesta sigui específica i efectiva.

Catlab Informa

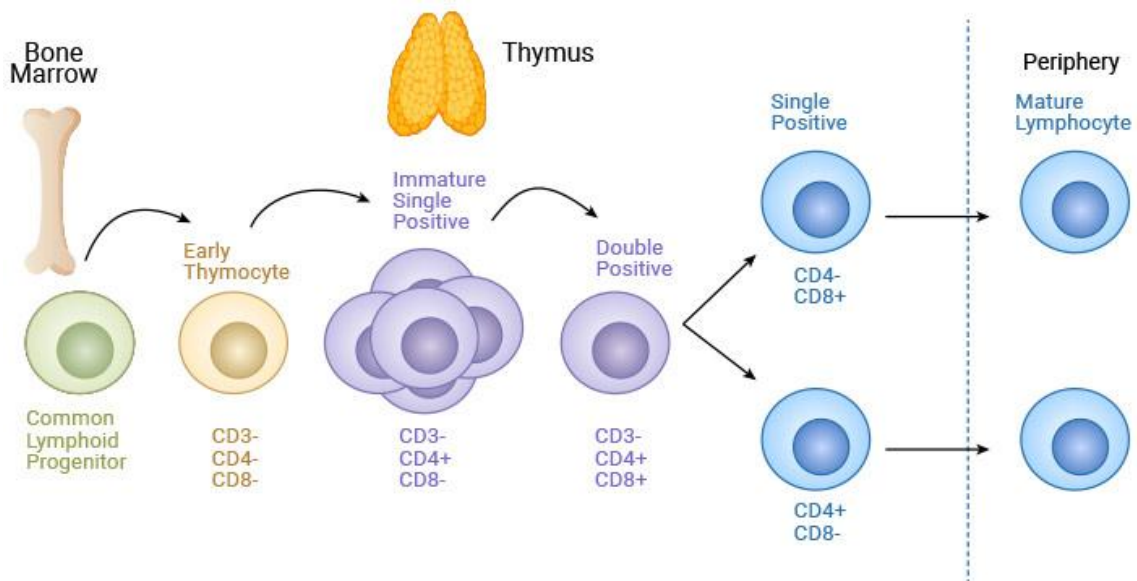


Figura 1: Esquema de la maduració dels limfòcits T [imatge a internet]. CUSABIO team. *T Cell Activation - The Switch for T Cell Executive Function* [citat el 25 de desembre de 2025]. Disponible a: <https://www.cusabio.com/c-21187.html>

NEOPLASIES DE CÈL·LULES T I NK MADURES:

Les neoplàsies de cèl·lules T i NK madures constitueixen un conjunt heterogeni de malalties malignes limfoides poc freqüents que impliquen, o bé, als limfòcits T, o bé, a les cèl·lules NK i que sovint comparteixen mecanismes fisiopatològics similars.

La seva incidència varia del 10% al 15% dels limfomes de cèl·lules madures a nivell mundial. Al nostre laboratori, Catlab, segons l'anàlisi dels estudis de síndromes limfoproliferatius realitzats durant el 2023, aquestes neoplàsies van representar només el 2% del total, confirmant-ne la baixa prevalença.

Segons l'última classificació de l'OMS de 2022 (WHO-HAEM5), les neoplàsies de cèl·lules T i NK madures es divideixen en nou famílies. Dins de la família de les "Leucèmies de cèl·lules T i NK madures" s'inclouen sis entitats caracteritzades per presentar-se en forma de malaltia leucèmica, i entre aquestes trobem la leucèmia de limfòcits T grans granulars (T-LGLL).

Aquest marc classificatori és essencial per contextualitzar la T-LGLL, que representa un repte diagnòstic per la seva similitud fenotípica amb poblacions reactives.

LEUCÈMIA LIMFOCÍTICA DE CÈL·LULES T GRANS GRANULARS:

La leucèmia limfocítica de cèl·lules T grans granulars és un trastorn limfoproliferatiu crònic poc freqüent que representa el 2-5% de les leucèmies limfocítiques de cèl·lules madures. De fet, és el fenotip més prevalent dins de les

Catlab Informa

síndromes limfoproliferatives cròniques de cèl·lules T i NK. Així ho mostra l'estudi publicat al Catlab Informa N° 149, que analitzà els resultats obtinguts del cribatge d'Euroflow a Catlab, on la leucèmia limfocítica de cèl·lules T grans granulars va suposar el 35% dels casos sobre el total de SLPC-T i NK diagnosticats al 2023.

Habitualment aquesta entitat segueix un curs clínic indolent (85% dels casos) i es presenta per igual en ambdós sexes. Tot i que no té un pic d'edat clarament definit, la majoria dels casos es diagnostiquen en pacients d'entre 45 i 75 anys d'edat.

La T-LGLL es caracteritza per una expansió clonal de limfòcits T grans granulars citotòxics que es manifesta amb un increment persistent d'aquests en sang perifèrica, habitualment amb concentracions superiors a 2×10^9 cèl·lules/L, durant més de sis mesos, i sense una causa identificada.

L'evidència actual suggereix que l'origen fisiopatològic de la T-LGLL és una estimulació antigènica crònica de limfòcits T citotòxics, majoritàriament CD8⁺, en la qual les alteracions de les vies de supervivència i d'apoptosi afavoreixen la persistència i l'expansió clonal.

En aquest context, s'han proposat diversos mecanismes fisiopatològics que podrien contribuir a l'expansió clonal al llarg de diferents etapes, entre les quals destaca l'activació de la via JAK-STAT. Aquesta via JAK-STAT és una de les rutes més importants per regular la proliferació, supervivència, diferenciació i la resposta immune. En la T-LGLL s'adquireixen mutacions que activen a STAT3 promovent l'expansió d'aquests limfòcits citotòxics i l'increment d'expressió de proteïnes antiapoptòtiques com per exemple la BCL-2.

Pel què fa al perfil genètic, les alteracions moleculars són un dels criteris de suport per identificar la naturalesa clonal d'una proliferació de LGLL segons la **WHO-HAEM5 (2022–2024)**.

S'han descrit dues mutacions principals associades a les LGLL:

- **Mutacions en STAT3:** són mutacions especialment recurrents en les T-LGLL CD8⁺. L'activació de STAT3, tal i com s'ha comentat en l'apartat de fisiopatologia, s'ha relacionat amb la seva patogènesi, especialment amb la neutropènia, per aquest motiu, es creu que l'absència de la mutació en STAT3 en la variant CD4⁺ explica perquè aquesta variant no es presenta amb neutropènia.
- **Mutacions en STAT5b:** Aquestes s'han descrit en més de la meitat dels casos de T-LGLL CD4⁺ TCRαβ⁺, les quals són mutacions molt poc freqüents en T-LGLL CD8⁺.

Aquesta distribució diferencial pot ser útil per reforçar el diagnòstic i entendre diferències biològiques entre variants.

Catlab Informa

Tot i que la WHO-HAEM5 no estableix uns criteris estrictes per al diagnòstic de la T-cell large granular lymphocytic leukemia, diverses publicacions i guies clíniques han intentat concretar-los. En aquest sentit, Jevremovic D et al. (2019) proposen els següents criteris, dels quals cal complir dos dels tres criteris essencials.

Els criteris essencials són:

- Immunofenotip de limfòcits T aberrant amb pèrdua de l'expressió de CD5 i/o CD7 i/o CD16 i presència de receptors associats a NK.
- Monoclonalitat dels limfòcits T confirmada per PCR.
- Infiltració medul·lar de limfòcits citotòxics amb patró sinusoidal.

Adicionalment s'han descrit també criteris desitjables, que són:

- Presència de mutacions STAT3 o STAT5b.
- Recompte de limfòcits T citotòxics elevat en sang perifèrica habitualment $>2 \times 10^9/L$ (en alguns casos pot ser inferior).

La morfologia i l'immunofenotip de la T-LGLL sovint es solapen amb els dels limfòcits T efectors terminals normals, fet que complica el diagnòstic i requereix una integració diagnòstica estreta entre la citometria de flux, la biologia molecular i la clínica.

IMMUNOFENOTIP T-LGLL:

La major part dels casos de T-LGLL presenten un fenotip **CD3+CD8+** i expressen un **TCR α/β +**, això es deu a que es tracta d'un trastorn de cèl·lules T madures citotòxiques i, per tant, l'immunofenotip concorda amb el d'una cèl·lula T efectora terminalment diferenciada (CD8+CD57+CD28–CD45RA+). No obstant, el fenotip de la LGLL-T freqüentment mostra aberràncies característiques que permeten diferenciar-lo de poblacions reactives (pèrdua de CD5, pèrdua de CD7, sobreexpressió de CD16 o CD56, i increment de CD57).

La CFM és l'eina clau per identificar aquestes aberràncies i caracteritzar la clona de LGLL-T, especialment en fases inicials o en recomptes baixos.

Catlab Informa

L'immunofenotip esperat és:

CD2+, CD3+, CD8+, CD4-, CD57+, TCR $\alpha\beta$ +, CD16+ i marcadors d'efector citotòxic (TIA1+, Granzima B+, Granzima M+ i Perforina+).

És comuna l'expressió dèbil o la pèrdua dels marcadors Pan-T CD5 i CD7.

Més enllà de l'immunofenotip convencional, la T-LGLL també pot presentar-se com a CD4+, així com CD4- CD8-, CD4+ CD8+ i alguns TCR $\gamma\delta$ +. En el cas de les CD4+ el curs clínic sol ser més indolent i el perfil mutacional també varia ja que més de la meitat de casos presenten mutacions en STAT5b, i en canvi, hi ha absència de mutacions en STAT3.

FENOTIPS T-LGLL CLONALS EN PACIENTS SENSE T-LGLL:

S'ha descrit la presència d'expansions clonals persistents de limfòcits grans granulars en contextos **no neoplàsics**. Per aquest motiu, és clau conèixer en quines situacions apareixen aquestes poblacions clonals i diferenciar-les d'una veritable T-LGLL.

La presència d'aquestes expansions clonals s'han descrit en els següents escenaris:

- **Pacients trasplantats**
- **Malalties autoimmunitàries i infeccions víriques cròniques**
- **Altres neoplàsies hematològiques**
- **Pacients d'edat avançada**

En molts casos, els pacients poden presentar poblacions clonals persistents durant més de sis mesos, però es troben asimptomàtics, sense citopènies i amb un recompte absolut de limfòcits grans granulars per sota del llindar diagnòstic de la LGLL (<500 cèl·lules/ μ L). En aquests casos parlem de la **limfocitosi T monoclonal de significat incert (T-CUS, per les seves sigles en anglès)**.

La publicació *T-cell clones of uncertain significance "When is the rogue clone dangerous"* de Gianpietro Semenzato (2024) suggereix que la presència d'aquestes poblacions clonals pot estar present en aproximadament el 1–2 % de la població sana, i és més freqüent en persones d'edat avançada.

Davant de la possibilitat de poblacions clonals reactives o neoplàsiques, la citometria de flux multiparamètrica és essencial per establir l'origen, detectar fenotips atípics i ampliar l'estudi molecular en cas necessari.

Catlab Informa

ESTRATÈGIA D'ANÀLISI PER CITOMETRIA DE FLUX (CFM):

Al laboratori de **Catlab** seguim l'estratègia d'anàlisi de les poblacions limfocitàries a través de l'algoritme proposat pel consorci d'**Euroflow**, però amb algunes modificacions adaptades a les necessitats diagnòstiques del nostre centre i al perfil de les mostres rebudes.

Aquesta estratègia consisteix en la realització en primer lloc d'un estudi amb el tub LST (Lymphoid Screening Tube). Aquest tub conté una combinació d'anticossos que ens permeten identificar el llinatge cel·lular causant de la limfocitosi, classificar les cèl·lules en les subpoblacions principals, detectar els fenotips aberrants més comuns i la clonalitat dels limfòcits B.

La taula següent descriu la configuració del Tub LST:

V450	V500	FITC	PE	PERCP-CY5.5	PE-CY7	APC	APC-H7
CD20/CD4	CD45	CD8/Smlgλ	CD56/Smlgκ	CD5	CD19/TCR γ/δ	CD3	CD38

Taula 1: Configuració del panell d'anticossos per a la caracterització i quantificació de les principals poblacions de limfòcits (T, B i NK) i l'avaluació de la clonalitat de les cèl·lules B mitjançant les cadenes lleugeres Kappa i Lambda.

Els marcadors que serviran per identificar les cèl·lules T, les seves subpoblacions i possibles aberràncies són:

- CD3: identificació dels limfòcits T
- TCRγ/δ: subtipus de receptor de la cèl·lula T (La majoria de limfòcits T seran α/β tant a la cèl·lula normal com a les atípiques)
- CD4 i CD8: subpoblacions principals de limfòcits T
- CD5 i CD56: aberràncies immunofenotípiques comunes en T-LGLL

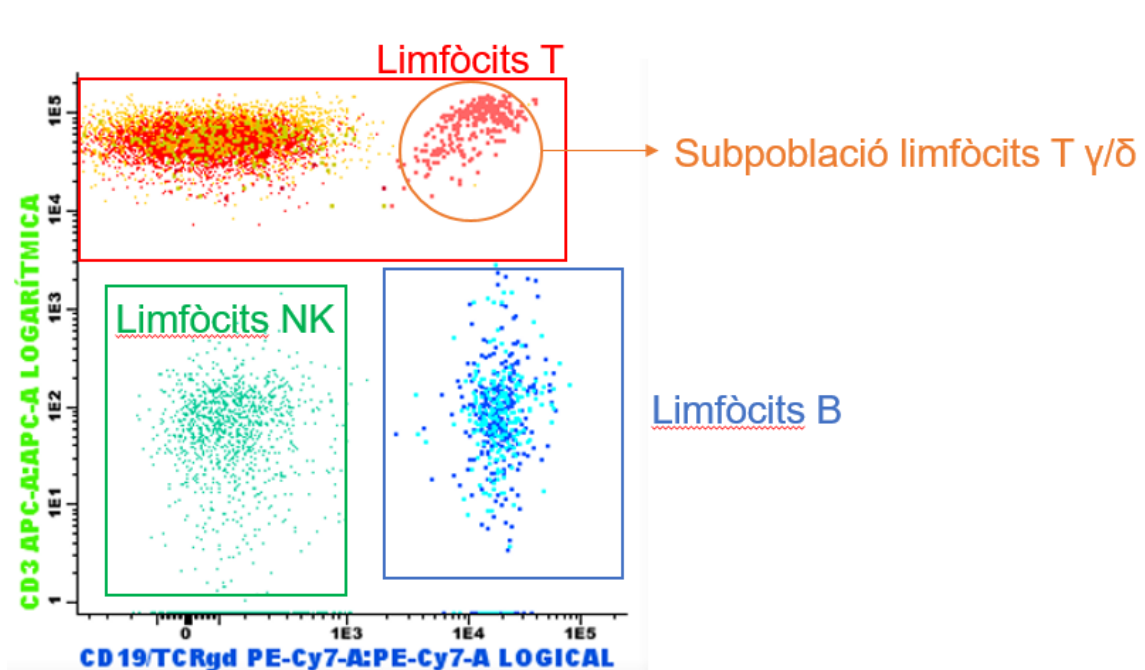


Figura 2: Dot plot on apareix el marcador CD3, que permet identificar la població de limfòcits T.

Catlab Informa

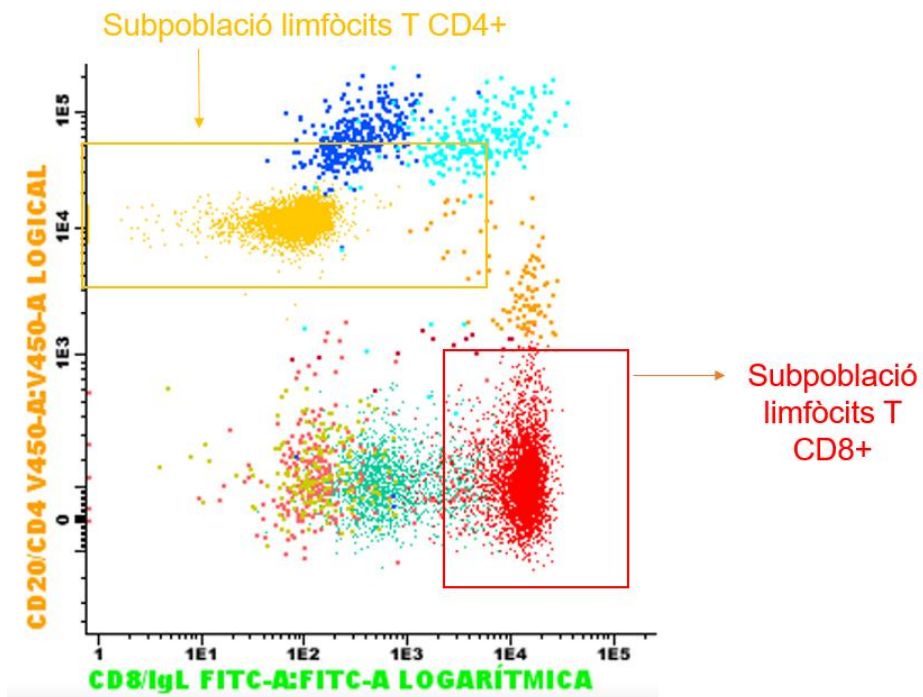


Figura 3: Dot plot on apareixen els marcadors CD4 i CD8, que permet identificar les subpoblacions de limfòcits T.

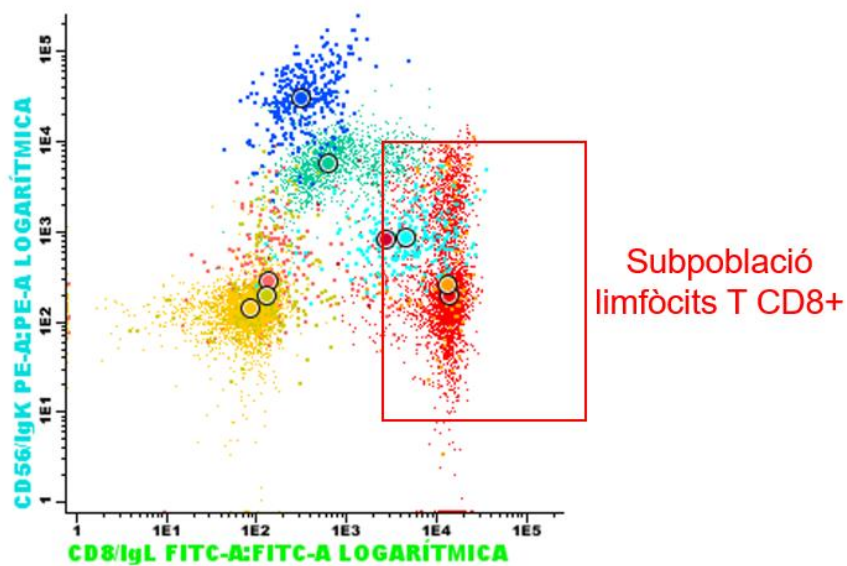


Figura 4: Dot plot on apareixen els marcadors CD56 i CD8, que permet identificar les subpoblacions de limfòcits T CD8+ que expressen parcialment CD56.

Catlab Informa

En el cas de detectar una població T expandida, aberrant o suggestiva de LGLL ampliarem l'estudi per confirmar-ne la clonalitat i estudiar el fenotip segons el tipus cel·lular.

L'anàlisi de la clonalitat es farà a través de l'estudi molecular confirmatori del reordenament del TCR, que consisteix en realitzar una PCR ("gold-standard"), tot i això, prèviament disposem d'una estratègia orientativa per citometria de flux que es basa en l'**anticòs anti-TRBC1**.

L'ús de l'anticòs TRBC1 permet una avaluació sensible, ràpida i senzilla de la clonalitat de les cèl·lules T. Es basa en el reconeixement de l'expressió d'una de les dues isoformes o variants de la regió constant de la cadena beta del TCR (TRBC1 o TRBC2) que son mútuament excloents. El resultat serà suggestiu de clonalitat si l'expressió de TRBC1 és <3 % o >97 %, tot i que alguns autors (Shi M. et al., 2019) consideren adequat un punt de tall de TRBC1 <15 % o >85 % per avaluar la clonalitat. Aquesta tècnica ha demostrat una **concordança del 96%** amb les tècniques moleculars per a l'avaluació de la clonalitat de les cèl·lules T $\alpha\beta$ (Muñoz-García, N. et al., 2021).

Un cop demostrada la clonalitat de les cèl·lules haurem de fer el fenotip extensiu de la població d'interès a través del panell T per poder filiar-la.

- **Panell T:** aquest panell es compon de sis tubs complementaris que integren marcadors de diferenciació, activació, citotoxicitat i receptors TCR, configuració que permet una caracterització fenotípica exhaustiva de la clona i la identificació de possibles aberracions fenotípiques.

	V450	V500	FITC	PE	PERCP-CY5.5	PE-CY7	APC	APC-H7
TUB-1	CD4	CD45	CD7	CD28	CD3	CD2	CD26	CD8
TUB-2	CD4	CD45	-	CD45RO	CD3	CD45RA	CD27	CD8
TUB-3	CD4	CD45	CD8	CD25	CD5	-	Cy-TCL1	CD3
TUB-4	CD4	CD45	CD57	CD30	CD11c	TCR $\gamma\delta$	CD3	CD8
TUB-5	CD4	CD45	Cy Perfo	Cy Granz	CD3	CD2	CD94	CD8
Control perf	-	CD45	Cy control negatiu perforina	-	CD3	-	-	-
TUB-6	CD4	CD45	CD8	CD279	HLADR	-	CD3	CD10

"Cy": marcador citoplasmàtic

Taula 2: Configuració del panell T per a la caracterització de les diferents subpoblacions de limfòcits T.

Finalment, si es demostra una expansió de limfòcits granulars amb un fenotip aberrant i monoclonalitat confirmada per PCR, s'aplicaran els criteris de la WHO-HAEM5 per classificar-la com a T-LGLL. Addicionalment es recomanarà realitzar l'estudi de les mutacions STAT3 i STAT5b, ja que la seva presència reforça el diagnòstic i ajuda a predir el curs clínic.

Catlab Informa

En els casos on es detecti una població clonal però el pacient sigui asimptomàtic i el recompte cel·lular sigui <500 cèl·lules/ μ L caldrà considerar que ens trobem davant d'una **Limfocitosi T Monoclonal de Significat Incert (T-CUS)**. A Catlab es proposa un seguiment evolutiu a 6 – 12 mesos per determinar si la població es manté estable o evoluciona cap a una T-LGLL partint de la següent estratègia:

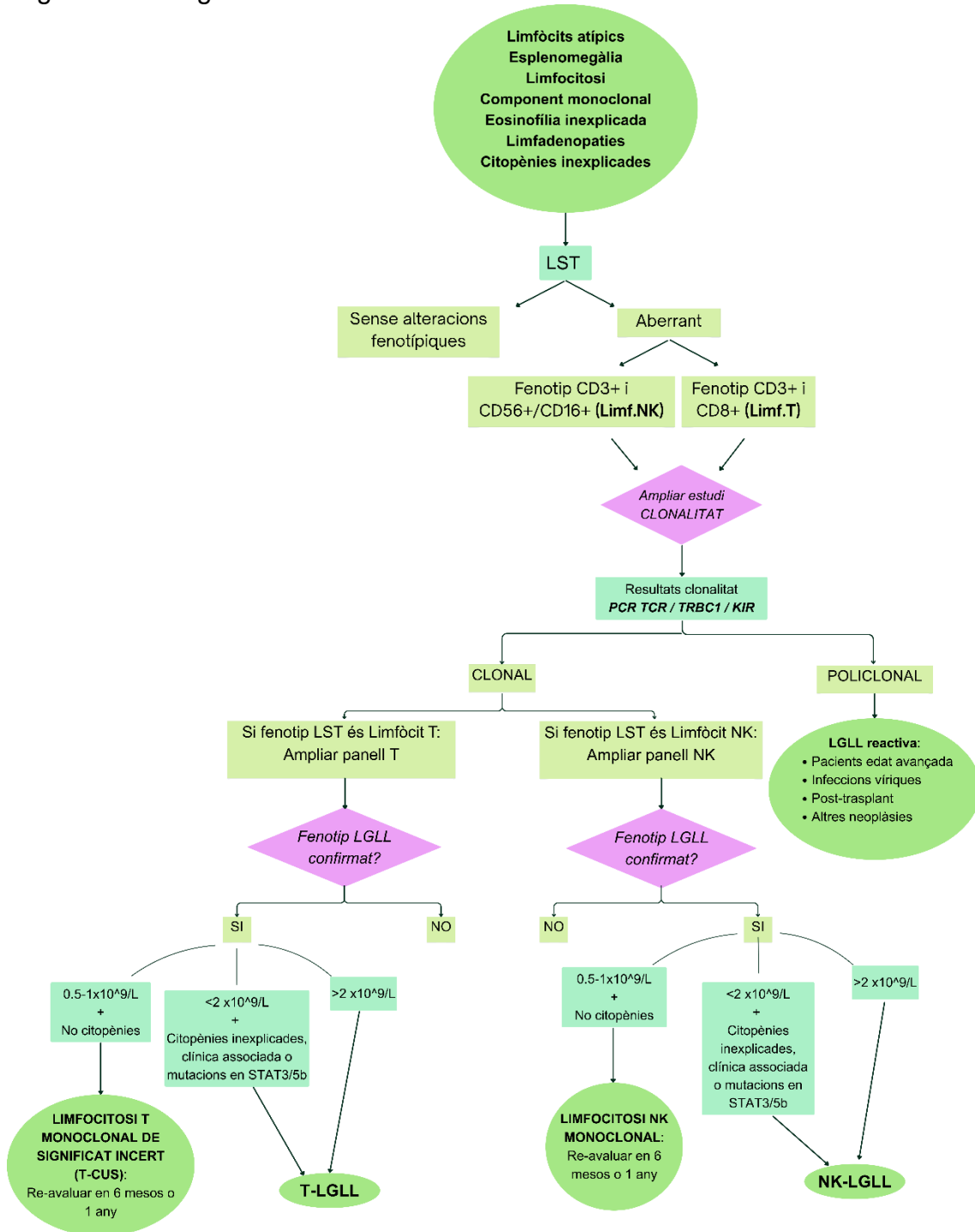
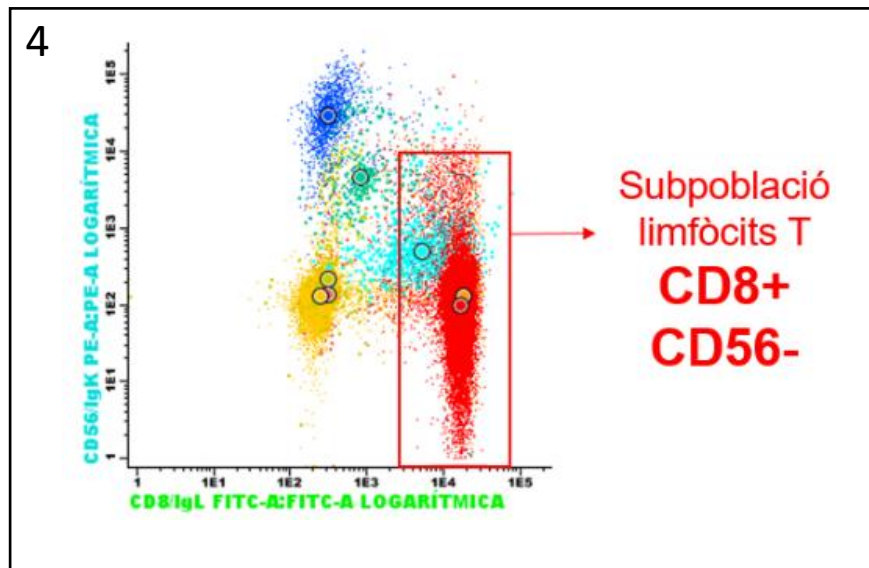
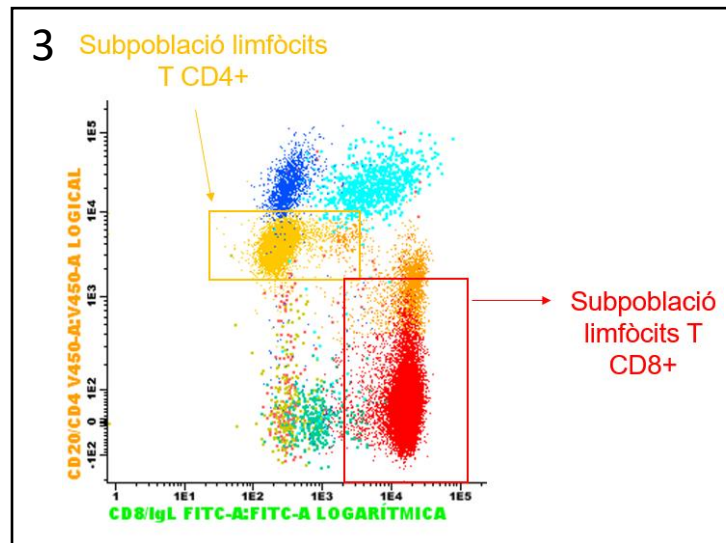
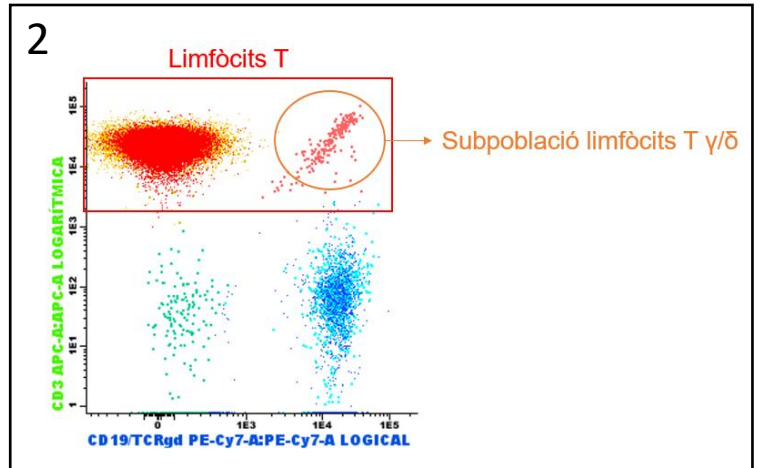
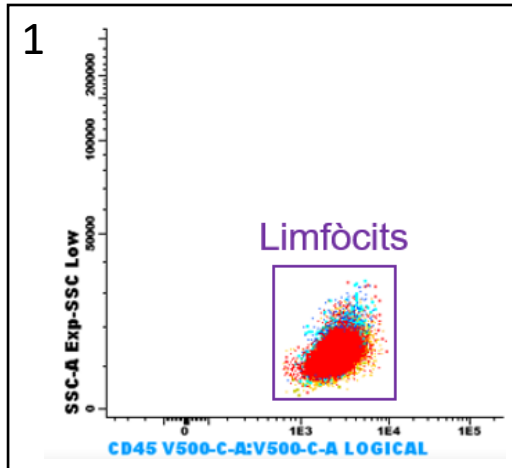


Figura 5: Esquema de l'estratègia d'anàlisi per CFM utilitzada a Catlab per a l'estudi de la T-LGLL i NK-LGLL.

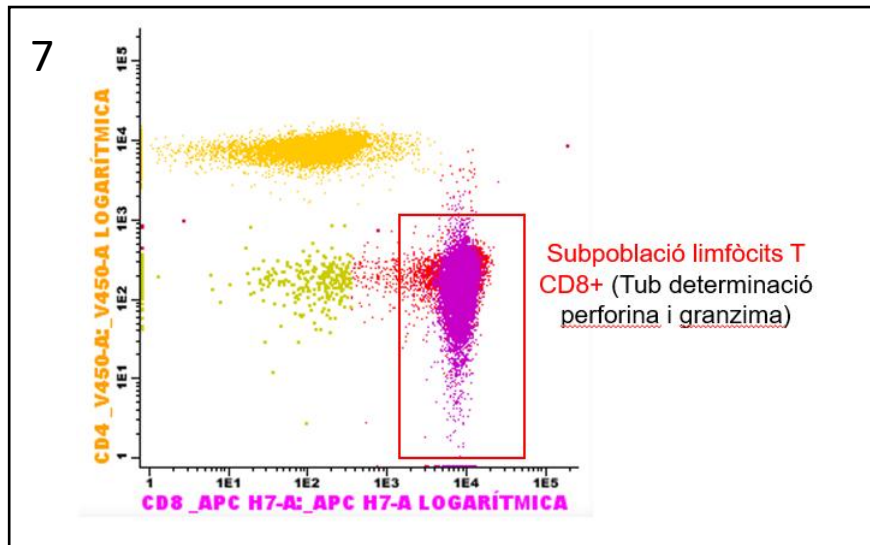
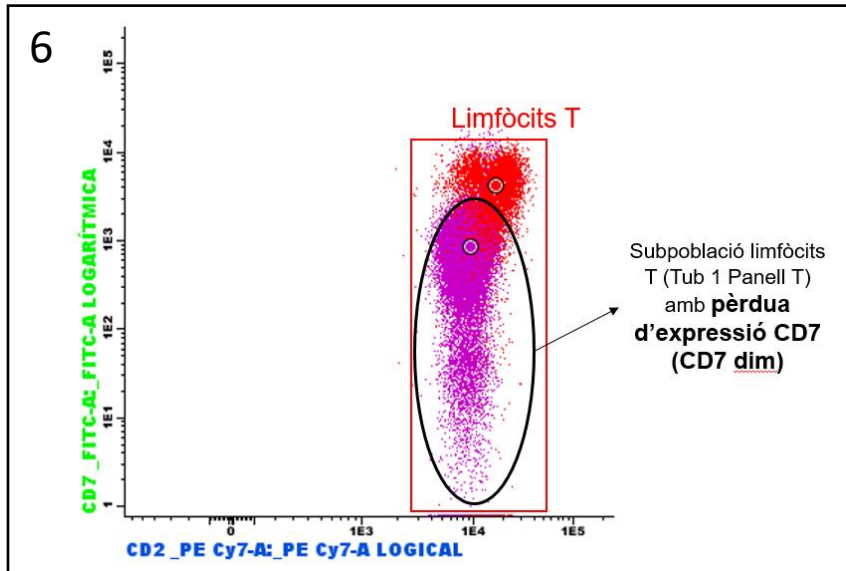
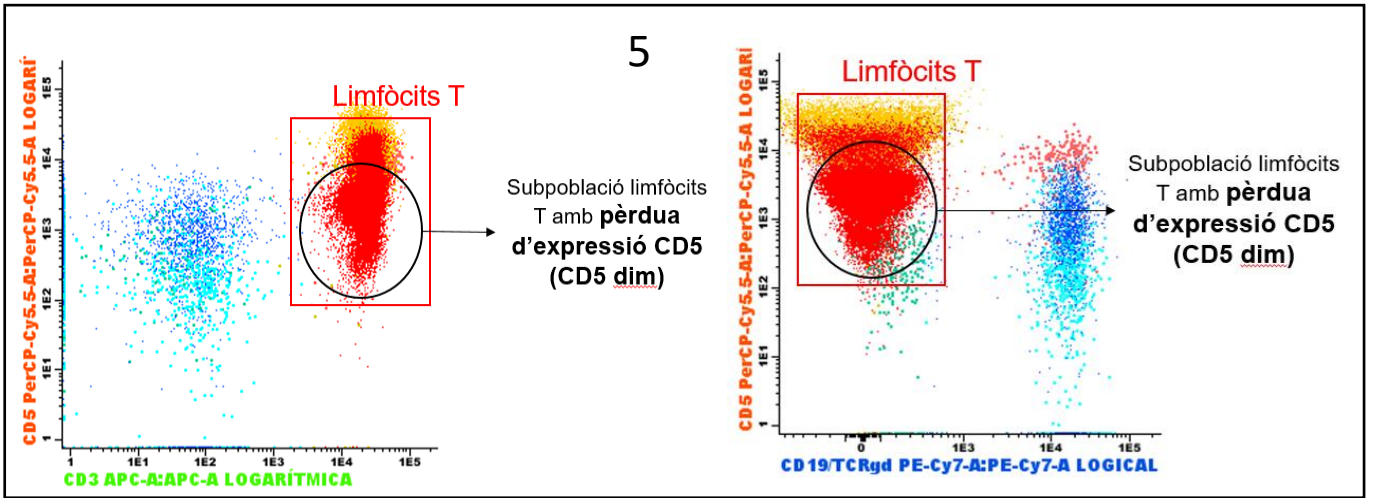
Catlab Informa

EXEMPLE DE T-LGLL DIAGNOSTICADA A CATLAB:

A continuació es presenta un cas clínic il·lustratiu de T-LGLL diagnosticada a Catlab.



Catlab Informa



Catlab Informa

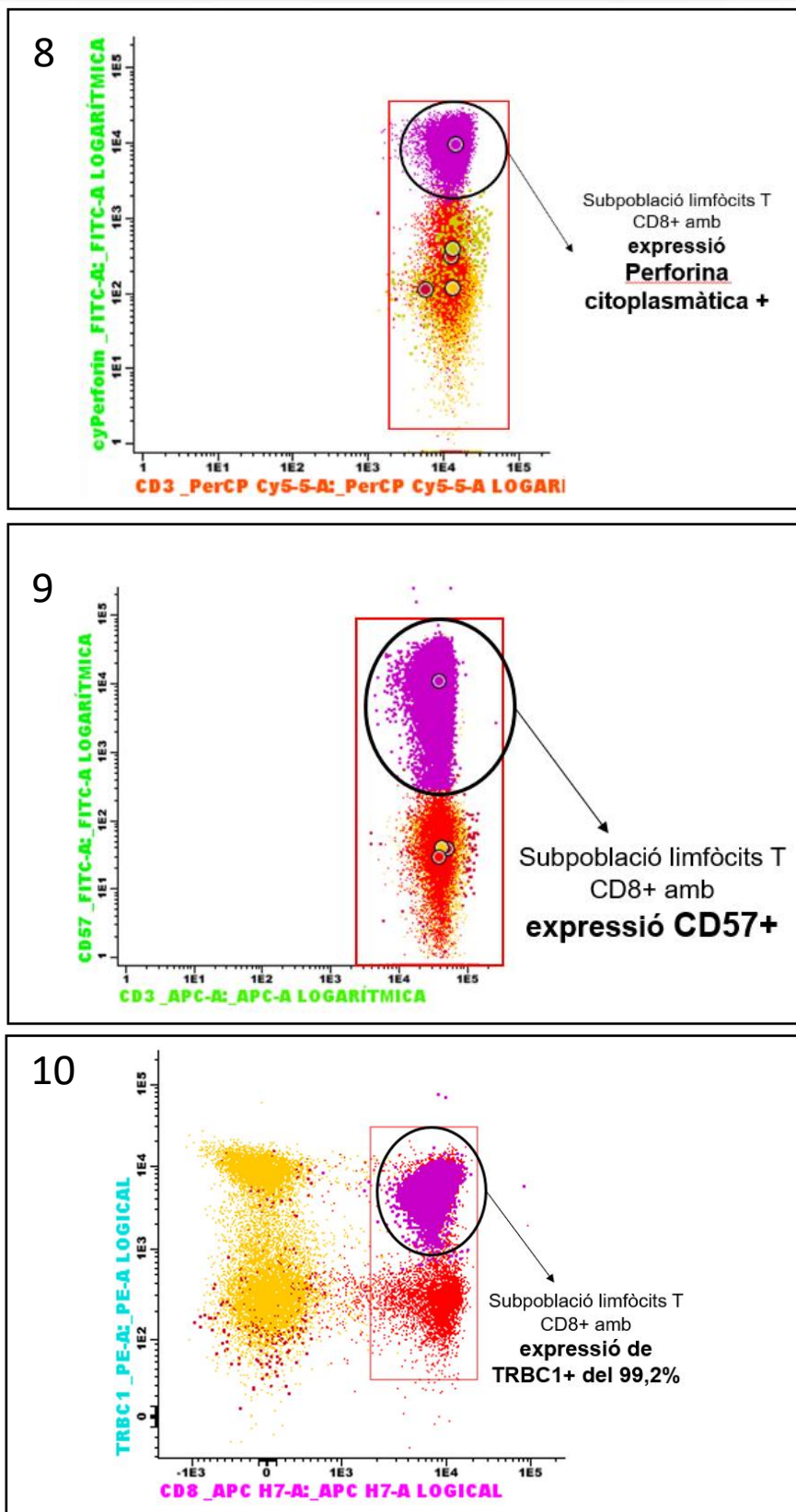


Figura 6: Detecció d'una població de limfòcits T aberrants corresponents a una T-LGLL a través de la citometria de flux multiparamètrica a Catlab. El fenotip final obtingut per a la població patològica ha estat: CD3+, CD8+, CD56-, CD56dim, CD26-, CD28-, CD2+, CD7dim, CD57+, CD11c+, CD30-, CD94+, CytPerforina+, CytGranzima+.

Catlab Informa

En definitiva, la correcta caracterització de les proliferacions limfocitàries de tipus granular (T i NK) requereix integrar les dades clíniques, morfològiques, fenotípiques i moleculars. En aquest context, la CFM, aplicant els protocols estandarditzats d'Euroflow, constitueix una eina essencial per al diagnòstic diferencial entre aquestes entitats (T-LGLL, NK-LGLL, T-CUS i NK-CUS). L'aplicació d'aquests protocols garanteix la reproductibilitat entre centres i a Catlab hem implementat aquesta metodologia harmonitzada per poder aportar resultats robustos i clínicament rellevants, consolidant la citometria com a pilar fonamental en l'avaluació de les proliferacions limfocitàries T.

Judit Vidal Pérez

Facultativa resident d'Anàlisi Clíniques

jvidalperez@catlab.cat

Carlos Lázaro

Facultatiu de Citometria de Flux

Tel. 93.748.56.00 – ext. 35041 / 626.18.46.51

clazaro@catlab.cat

Judith Vidal Martínez

Facultativa Responsable de Citometria de Flux

Tel. 93.748.56.00 – ext. 35041 / 616.26.48.91

jvidal@catlab.cat

Bibliografia:

1. Muñoz-García N, Morán-Plata FJ, Villamor N, Lima M, Barrena S, Mateos S, et al. High-sensitive TRBC1-based flow cytometric assessment of T-cell clonality in T $\alpha\beta$ -large granular Lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022;14(2):408. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers14020408>.
2. Kwong Y-L, Zhang H, Wang X, Tse E. Epidemiology of mature T-cell and NK-cell neoplasms: east and west. *Lancet Reg Health West Pac* [Internet].

Catlab Informa

- 2025;62(101646):101646. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lanwpc.2025.101646>.
3. Attygalle AD, Karube K, Jeon YK, Cheuk W, Bhagat G, Chan JKC, et al. The fifth edition of the WHO classification of mature T cell, NK cell and stroma-derived neoplasms. *J Clin Pathol* [Internet]. 2025 [citado el 2 de noviembre de 2025];78(4):217–32. Disponible a: <https://jcp.bmj.com/content/78/4/217.full>.
 4. Ullah F, Markouli M, Orland M, Ogbue O, Dima D, Omar N, et al. Large granular Lymphocytic leukemia: Clinical features, molecular pathogenesis, diagnosis and treatment. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2024;16(7):1307. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers16071307>.
 5. Horna, P., Weybright, M.J., Ferrari, M. et al. Dual T-cell constant β chain (TRBC)1 and TRBC2 staining for the identification of T-cell neoplasms by flow cytometry. *Blood Cancer J.* 14, 34 (2024). Disponible a: <https://doi.org/10.1038/s41408-024-01002-0>.
 6. Kalasauskas, D., Keric, N., Abu Ajaj, S., von Cube, L., Ringel, F., & Renovanz, M. (2020). Psychological Burden in Meningioma Patients under a Wait-and-Watch Strategy and after Complete Resection Is High—Results of a Prospective Single Center Study. *Cancers*, 12(12), 3503. Disponible a: <https://doi.org/10.3390/cancers12123503>.
 7. Sun L, Su Y, Jiao A, Wang X, Zhang B. T cells in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2023;8(1):235. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-023-01471-y>.
 8. Marchand T, Lamy T, Loughran TP. A modern view of LGL leukemia. *Blood* [Internet]. 2024 Jun 10;144(18):1910–23. Disponible a: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006497124015672>.
 9. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, Le Beau MM, Orazi A, Siebert R, editors. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.
 10. Muñoz-García, N.; Lima, M.; Villamor, N.; Morán-Plata, F.J.; Barrera, S.; Mateos, S.; Caldas, C.; Balanzategui, A.; Alcoceba, M.; Domínguez, A.; et al. Anti-TRBC1 Antibody-Based Flow Cytometric Detection of T-Cell Clonality: Standardization of Sample Preparation and Diagnostic Implementation. *Cancers* 2021, 13, 4379. Disponible a: <https://doi.org/10.3390/cancers13174379>.

Catlab Informa

11. Semenzato G, Teramo A, Calabretto G, Zambello R. T-cell clones of uncertain significance. When is the rogue clone dangerous?. *Haematologica* 2025;110(1):37-46; Disponibile a: <https://doi.org/10.3324/haematol.2024.286023>.
12. Shi M, Jevremovic D, Otteson GE, Timm MM, Olteanu H, Horna P. Single Antibody Detection of T-Cell Receptor $\alpha\beta$ Clonality by Flow Cytometry Rapidly Identifies Mature T-Cell Neoplasms and Monotypic Small CD8-Positive Subsets of Uncertain Significance. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 Jan;98(1):99-107. doi: 10.1002/cyto.b.21782. Epub 2019 Apr 11. PMID: 30972977.