

Activitat *natural killer* a la leucèmia limfàtica crònica de línia B

Neus Villamor i Casas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DISCUSSIO

1. Tècnica de citotoxicitat natural

La tècnica per determinar la citotoxicitat natural que es capaç de desenvolupar una població efectora determinada es medeix a l'enfrontar aquesta població amb una línia cel·lular que servirà de diana. La línia cel·lular diana pot variar en sensibilitat front la lisi, definint-se línies diana NK-sensibles i NK-resistents. En la realització d'aquest estudi s'ha emprat la línia cel·lular diana K562, clàssicament definida com NK-sensible (34-35, 37, 43, 59-60, 152, 154, 156, 160-161, 164, 172, 178-180, 186, 188, 197, 376).

La citotoxicitat de la mostra es valora pel grau d'alliberament de l'isòtop radioactiu que reflecteix la mortalitat de la línia diana. El càlcul de la lisi considera l'alliberament basal espontani, l'alliberament màxim (mortalitat del 100% de la línia diana) i l'alliberament de la mostra a estudi. L'acceptació de l'assaig de citotoxicitat dependrà dels valors obtinguts en un control d'ANK coneguda o normal i del valor d'alliberament espontani de l'isòtop radioactiu. Al llarg d'aquest estudi sempre s'ha comptat amb una mostra control per acceptar els resultats de l'assaig. A més, s'ha valorat l'alliberament espontani de l'isòtop durant el període d'incubació. La xifra mitjà obtinguda és de 12,68% que, del que es despren de la literatura, és vàlida (24, 152, 172, 179-180, 378, 392). Finalment, la validesa de la tècnica s'ha comprovat amb l'estabilitat en l'ANK d'individus control al llarg del temps tal i com està descrit a la literatura (4, 204).

La metodologia utilitzada en la determinació experimental de l'ANK és similar per tots els autors (24, 34-35, 37, 59, 152, 154, 156, 160-161, 172, 178-180, 186, 188, 212, 376, 378). Nogensmenys, la manera d'expressar els resultats canvia en els diversos treballs. No existeix un valor ~~estàndard~~ estàndard en la

determinació de l'ANK ni existeixen valors de referència universals. Per tant, els valors de citotoxicitat han de referir-se a uns valors control del propi laboratori per una proporció D:E concreta, fent-se difícil la comparació entre les xifres de citotoxicitat dels treballs publicats (204). Per solventar aquest problema s'han proposat diverses formes d'expressió dels resultats si bé cap ha aconseguit la seva generalització ni permeten la comparació entre els resultats (113,154,204-206).

En aquest treball els resultats s'han expressat en valors teòrics de citotoxicitat. Els valors experimentals s'han ajustat a una funció matemàtica teòrica i s'han calculat els valors esperats de citotoxicitat per mètodes de regressió no lineal. La utilització de valors teòrics de citotoxicitat permet: 1) la inferència d'unitats de citotoxicitat independents de la proporció D:E utilitzada (unitats lítiques) i 2) el càlcul de la citotoxicitat esperada a proporcions D:E no realitzades a nivell experimental solventant possibles errors en la tècnica (manca de cel·lularitat o altres problemes observats en l'assaig). Els resultats de citotoxicitat s'han expressat en percentatge de lisi (%) a diverses proporcions D:E. No s'han utilitzat les unitats lítiques per que mostren una gran variabilitat en el valor obtingut per percentatges de citotoxicitat similars segons els punts de la corba que es disposi i de la forma de la mateixa. El model d'ajustament escollit s'ha fet en base a: 1) les dades de la literatura (205-206,403), 2) la seva facilitat de càlcul i 3) la possibilitat de validar gràficament i de forma immediata de l'ajustament als valors experimentals.

L'ajustament teòric dels valors experimentals s'ha considerat bona. Aquest tipus d'anàlisi no està descrit a la literatura i per la seva validesa ens basem en els valors estadístics de correlació i residuals d'ajustament obtinguts.

2. Efecte dels limfòcits B a l'ANK de controls

L'ANK es realitza generalment en SCM de SP, que en individus sans o en la majoria de patologies no hemopoètiques conté de forma majoritària limfòcits T i NK. A la SP de LLC-B i altres SLPC els limfòcits T i NK són reemplaçats pels limfòcits B neoplàsics. Per tant, per valorar l'ANK dels pacients amb LLC-B interessa saber l'efecte que tenen els limfòcits B sobre l'ANK. Per conèixer l'efecte dels limfòcits B a l'ANK s'han fet suspensions de CMN de controls amb un percentatge creixent de limfòcits B purificats. Sobre aquestes suspensions s'ha assajat l'ANK. Les modificacions observades s'han ajustat a una reducció de la citotoxicitat proporcional al percentatge de limfòcits B purificats afegits a la mostra inicial. Aquest efecte "dilutor" dels limfòcits B ja ha sigut descrit en pacients amb LLC-B per Alvarez-Mon *et al* i Srskaar *et al* (35,163) i ha sigut suggerit per altres autors (209,373). Per tant, a la LLC-B la citotoxicitat pot estar alterada, parcialment o totalment, per la presència de la població leucèmica no efectora que "dilueix" la cel·lularitat capaç de provocar la lisi natural.

3. Activitat *natural killer* a la LLC-B

Els pacients que componen aquesta tesi no difereixen en les característiques clínico-analítiques del que es habitual a la LLC-B excepte per un lleuger predomini de pacients en estadi 0 de Rai en el moment del diagnòstic (239,291,293-294). Quan s'analitza la literatura s'observa un augment progressiu de la proporció de pacients en estadi 0, possiblement per la generalització d'analítiques rutinàries i el diagnòstic de la malaltia en pacients asimptomàtics. La mediana d'edat, el predomini de sexe masculí, la proporció de cadascun dels estadis clínics i el nombre de pacients amb criteris de LLC-B quiescent, la distribució segons el patró histològic de la BMO o el TDL, així com la resta de característiques analítiques es similar al descrit prèviament (220,239,291,293-294,345).

L'estudi de l'ANK en pacients amb LLC-B s'ha realitzat en poques ocasions i incloent un nombre de casos escàs (entre 6 i 28) (35, 113, 125, 163, 209-210, 329, 373-375, 377-378). De fet, la sèrie aquí descrita és la més nombrosa de l'estudiada fins l'actualitat. Les publicacions prèvies no inclouent en la majoria de les ocasions la descripció de les característiques clínico-analítiques dels malalts i per tant no es poden comparar aquestes amb la dels malalts del present estudi.

L'ANK dels pacients amb LLC-B és inferior a la dels individus control. Aquest fet està en concordança amb el descrit prèviament (35, 113, 163, 210, 329, 373-375, 377-378, 383). Alguns autors descriuen una major alteració de la citotoxicitat quan més avançada està la malaltia (113, 329) mentre que altres no troben diferències segons l'estadi o la realització de tractament (378). Aquestes sèries inclouen 15 o menys malalts. Alvarez de Mon *et al* (35), en 27 pacients, no troben correlació entre l'estadi clínic de Rai i la citotoxicitat en els malalts no tractats excepte la normalització de l'activitat NK després de l'administració de tractament alquilant i de l'obtenció de l'estadi 0 de Rai. Malauradament, no es compara l'ANK amb la xifra limfocitària dels pacients (tractats o no tractats) a pesar de descriure l'efecte dilucional de la població leucèmica. Aquest fet impedeix contrastar els resultats del present estudi amb les dades publicades prèviament. Nogensmenys, en l'estudi de Alvarez-Mon *et al* (35) no existeix correlació entre l'ANK i els estadis de Rai, a l'igual que succeeix en la nostra sèrie. Els autors no analitzen la citotoxicitat en relació amb els estadis de Binet que sí que mostren significació en els malalts inclosos en aquest estudi. Per motius obvis, no es poden comparar els resultats que analitzen la relació entre les diverses característiques clíniques (patró de BMO, TDL, etc) amb dades referides a la literatura. En els malalts inclosos en aquest estudi l'ANK no ha mostrat relació amb cap característica clínica rellevant (edat, sexe, nombre de territoris afectats, patró histològic d'afectació medul·lar, temps de duplicació).

El grup de pacients amb LLC-B quiescent no es comporten de forma diferent, pel que respecta a la citotoxicitat, que la resta de pacients amb LLC-B. El diferent comportament biològic d'aquest subgrup de malalts no pot ser atribuït a un major efecte immunocontrolador de la població NK sobre la leucèmia. De forma similar altres paràmetres amb implicacions pronòstiques com la velocitat de duplicació de la xifra limfocitària o el patró infiltratiu a moll d'ós no tenen relació amb l'ANK.

De tota manera i com s'exposarà més tard, la relació observada entre la baixa ANK i els estadis avançats de la malaltia (estadi C de Binet o III+IV de Rai) és secundària a la major limfocitosi que presenten els pacients amb malaltia avançada. De la mateixa manera l'hepatomegàlia influeix de manera negativa a la citotoxicitat perquè s'observa en el grup que té xifres de limfòcits més elevades.

S'ha observat una correlació inversa lineal entre el recompte limfocitari i l'ANK dels pacients (ex: proporció 1:400 $r=-0,363$, $p=0,002$). Si bé s'ha suggerit per diversos autors l'efecte "dilutor" dels limfòcits B en l'ANK (35,163,209,373) no s'ha publicat cap treball on es relacioni la xifra de limfòcits o el percentatge de limfòcits B de la mostra efectora amb la citotoxicitat desenvolupada pels malalts. Per altra banda, en diversos treballs publicats es descriuen pacients amb ANK normal (fins el 17% dels malalts) si bé no es fa una descripció de les característiques clínic-analítiques d'aquests malalts (210,373,375,378). El 19% dels pacients inclosos en aquest estudi tenen una ANK normal. Predominen els estadis poc avançats (70% d'estadis 0) sense assolir significació estadística. En els pacients inclosos en aquest estudi la divisió dels mateixos segons una xifra determinada de limfòcits permet diferenciar grups amb citotoxicitat significativament diferent. De forma paral·lela, s'observa relació entre la citotoxicitat i la xifra de leucòcits o limfòcits CD19⁺ que es deguda a l'íntima relació entre els valors d'aquests paràmetres i la xifra de

limfòcits totals.

La relació entre la xifra de limfòcits i la citotoxicitat recolza l'efecte "dilutor" de la població leucèmica a la LLC-B. Per conèixer si la baixa citotoxicitat que expressen els pacients és únicament deguda a un efecte "dilutor" o si existeix algun trastorn intrínsec de la CNK a la LLC-B s'han de realitzar estudis de citotoxicitat amb poblacions efectores purificades. La metodologia més utilitzada a la literatura per purificar poblacions efectores és el rosseteig amb hematies de moltó. Aquest sistema presenta dos inconvenients: 1) la fracció E⁻ també desenvolupa ANK (àdhuc en proporció igual que la E⁺) (125,210), i 2) en general, aquest procediment de separació limfocitari inclou incubacions més o menys prolongades o repetitives a una temperatura de 4°C. El metabolisme cel·lular disminueix amb el fred i la citotoxicitat no és una excepció a aquesta regla (4,204). Per tant, en els treballs on es refereix una baixa ANK en poblacions purificades per rosseteig s'ha de valorar el possible l'efecte de la temperatura en els resultats finals. Possiblement, la millor manera de purificar poblacions efectores i valorar la citotoxicitat en pacients amb LLC-B sigui la separació per selecció de les poblacions amb antigens NK-específics que permeten les noves tecnologies (citometria de flux o AcMo lligats a partícules magnètiques).

Una altra dada que recolza l'efecte dilutor és l'increment en la citotoxicitat que s'observa a l'augmentar les proporcions D:E. Aquest efecte també ha sigut referit per altres autors (209).

La reducció en l'ANK en la LLC-B s'ha hipotetitzat que pot ser secundària a un efecte de cèl·lula diana permanent per part del limfòcit leucèmic. Aquest fet no ha pogut ser demostrat i existeixen dades que no donen suport aquest efecte (210,374,379,385). Per altra banda, el fet que un grup de pacients amb presència de limfòcits leucèmics **tinguin** una ANK normal contradiu aquesta hipòtesi.

La xifra de LGG no s'ha correlacionat de manera directa amb la citotoxicitat desenvolupada pels malalts. La manca de relació entre els LGG i la citotoxicitat també s'ha descrit en controls sans (4). Malgrat això, el grup de pacients amb una xifra de LGG superior a $0,5 \times 10^9/L$ desenvolupen una citotoxicitat superior que la resta de malalts. Ja que no s'observen diferències respecte les característiques clíniques ni el nombre de limfòcits entre els dos grups de pacients la major citotoxicitat s'ha de relacionar amb el major nombre de LGG.

La resta de paràmetres analítics no ha mostrat relació amb l'ANK (ex: nivells d'hemoglobina o plaquetes). La presència d'hipo-IgA s'ha relacionat amb activitat NK baixa. Si bé les CNK regulen el funcionalisme dels limfòcits B i s'han descrit poblacions limfocitàries NK supressores dels limfòcits B en pacients amb LLC-B que presenten hipogammaglobulinèmia (94,383), la relació detectada en els nostres pacients es deguda a que el grup amb nivells baixos d'IgA tenen uns recomptes limfocitaris més elevats.

La relació que existeix entre les poblacions limfocitàries i l'activitat NK sustenta l'efecte "dilutor" de la població limfoide B leucèmica sobre l'ANK. A la sèrie global es poden definir grups de citotoxicitat diferenciada dividint els pacients per la xifra mitja de cadascuna de les poblacions limfocitàries T i NK considerades de forma percentual. El grup amb major percentatge de limfòcits T i NK desenvolupa més activitat lítica, i per certs antígens de superfície (CD2, CD16 i CD11b) la citotoxicitat no difereix dels valors de normalitat. En els pacients no tractats, que tenen unes característiques similars a les de la sèrie global, s'observa una relació directa entre l'ANK i el percentatge de limfòcits CD16⁺ i CD11b⁺. Apostolopoulos *et al* (329) també refereixen aquest mateix efecte CD16 ANK en una sèrie de 15 malalts no tractats. Aquesta relació directa entre els valors percentuals de poblacions limfocitàries amb antígens

NK i l'ANK reflecteix l'efecte dilutor de la població leucèmica en l'activitat lítica. La manca de correlació lineal entre l'ANK i el percentatge de les poblacions T i NK en la sèrie global pot ser deguda a que la sèrie global inclou malalts tractats amb diversos fàrmacs. Si bé els pacients tractats tenen unes xifres similars a la dels malalts no tractats per cadascuna de les poblacions limfocitàries l'ANK de la sèrie global pot estar afectada per l'efecte citopàtic que provoca la quimioteràpia. Finalment, els pacients amb LLC-B tenen uns percentatges de limfòcits T i NK molt inferiors a la població control. Malgrat el gran increment en la població B de la mostra testada l'activitat lítica natural que desenvolupen no és indetectable. La deplecció de limfòcits B de la mostra a testar provoca un augment en ANK (163) i el grup de pacients inclosos en aquest estudi que tenen una major proporció de limfòcits NK tenen una ANK normal. Considerat tot en conjunt, l'ANK dels pacients amb LLC-B està interferida per la dilució de la població efectora pels limfòcits leucèmics.

4. Poblacions limfocitàries

Els pacients amb LLC-B tenen una alteració en la distribució de les diverses poblacions limfoides. La malaltia comporta l'increment de població limfoide B en un estadi immadur. L'increment en la població limfoide B motiva la disminució percentual de limfòcits T i NK. Nogensmenys, quan s'analitzen els valors absoluts de les poblacions no leucèmiques s'observa un increment de les mateixes respecte dels valors en obtinguts en individus control. L'increment en el valor absolut s'observa en totes les poblacions estudiades (CD2, CD4, CD8, CD16, CD57, CD11b) excepte en la xifra de limfòcits CD56⁺ en el que el nombre de pacients i controls analitzat és molt petit.

L'increment absolut de les poblacions limfocitàries T i NK que s'observa en aquest estudi concorda amb les dades referides prèviament (131,220,273,275,329,380-383). L'increment dels valors absoluts és més acusat

com més avançat és l'estadi de la malaltia assolint significació estadística el nombre de limfòcits CD2, CD4 i CD56. La resta de poblacions també s'incrementen sense assolir significació potser influït per l'escàs nombre de pacients en estadis avançats. Diversos treballs publicats refereixen resultats on els pacients en estadis avançats tenen un major increment de les poblacions limfoides (131,273,275).

Les poblacions limfocitàries no han mostrat relació amb les principals característiques clíniques excepte la mencionada amb l'estadi clínic. La quiescència de la malaltia no es relaciona amb uns valors, percentuals o absoluts, limfocitaris T i NK diferents. Els pacients en estadi A amb LLC-B quiescent tenen una xifra de limfòcits CD19⁺ menys elevada que aquells malalts en estadi A amb LLC-B no quiescent que es correlaciona amb unes xifres de limfòcits totals inferior (20,3±10,7 vs 61,52±72,4; p=0,054). Kimby *et al* (382) descriuen un menor nombre de limfòcits B en malalts amb "limfocitosi monoclonal de significat indeterminat" que es clínicament se'ls pot considerar com LLC-B quiescents. De fet la diferència en la xifra de limfòcits entre els malalts amb estadi A segons la quiescència de la malaltia no ha de sorprendre ja que un dels criteris de definició és la limfocitosi inferior a 30x10⁹/L.

Generalment es descriu l'alteració del quocient CD4/CD8 en els malalts amb LLC-B (131,220,273,275,329,380-382). El valor del quocient CD4/CD8 dels pacients que componen la sèrie no difereix dels valors control. Quan s'analitza la literatura es fa evident que l'alteració és més acusada com més avançada està la malaltia (131,273,275,329,382) amb uns valors normals en els estadis menys avançats o en pacients amb criteris de LLC-B quiescent (329,382). L'elevat nombre de pacients en estadis poc avançats i de malalts amb LLC-B quiescent pot contribuir a la normalitat del quocient CD4/CD8 observat en la present sèrie.

S'observa una correlació inversa lineal entre els percentatges de les

poblacions limfocitàries T i NK amb la xifra de limfòcits i leucòcits. Al considerar les poblacions en valor absolut s'observa una correlació directa lineal entre la xifra de limfòcits i leucòcits i les poblacions T, NK, CD16⁺CD8⁺, CD16⁺CD57⁺ i CD11b⁺CD2⁺. Aquest fet ha sigut referit prèviament (273,329). En concordància amb l'exposat, s'objectiven diferències significatives en les poblacions limfocitàries quan es s'agrupen els pacients segons una xifra de limfòcits determinada.

Els pacients amb una xifra de LGG superior a $0,5 \times 10^9/L$ tenen un major nombre de limfòcits CD16⁺, CD57⁺ i CD11b⁺, sense que aquest fet es pugui atribuir a una limfocitosi més elevada.

La xifra de gammaglobulines, d'Ig G i d'Ig A han mostrat relació inversa amb el quocient CD16/CD8 i CD16/CD11b. A la literatura només està descrita la relació entre la xifra de gammaglobulines i el valor dels quocient CD4/CD8 (329).

Els malalts amb un TDL més llarg tenen una xifra més elevada de limfòcits CD4⁺ i un valor del quocient CD4/CD8 més elevat que els pacients amb un TDL més curt, si bé no s'assoleixen diferències significatives. No existeix cap estudi previ analitzant les subpoblacions limfocitàries i el TDL, però l'evidència que els pacients amb "limfocitosi B monoclonal de significat desconegut" descrit per Kimby *et al* (329) tenen un quocient normal està d'acord amb els resultats obtinguts.

Els pacients amb un patró infiltratiu a la BMO de tipus difús tenen una xifra superior de limfòcits CD4⁺ que la resta de malalts. No existeixen treballs que correlacionin el tipus de patró histològic amb les subpoblacions. De totes maneres, els patrons histològics difusos s'acostumen a veure en pacients en estadis avançats i més leucositòsics, en els que la xifra de CD4⁺ pot estar més augmentada. **Nogensmenys**, en els pacients d'aquesta sèrie amb un patró difús no es pot demostrar una

major xifra de limfòcits ($59,4 \pm 46,4$ vs $41,5 \pm 49,7$) si bé només quatre pacients tenen un patró difús i determinació de CD4.

A la LLC-B s'han descrit diverses alteracions en l'expressió dels antígens NK com per exemple l'increment de la població CD8⁺, CD57⁺, l'aparició de poblacions anòmales (CD4⁺CD11b⁺) i alteracions en la relació de l'antigen CD57 i CD16 (131,380-383). L'augment mig de la població CD57⁺ és més acusat (6 vegades el valor normal) que l'increment de la població CD16⁺ (4 vegades la normalitat) amb un increment percentual de la població CD16⁺CD57⁺ respecte dels controls. Els pacients de la sèrie mostren una major nombre de limfòcits que coexpressen CD16 i CD2 o CD8 que els individus control. La coexpressió d'antígens per part dels limfòcits CD16 no s'ha analitzat en les publicacions prèvies, però està dintre de la línia de major coexpressió d'antígens NK en la població T en pacients amb LLC-B (380-381).

Finalment, la realització de tractament comporta una alteració de les poblacions limfocitàries. No existeixen diferències entre el nombre de limfòcits entre els malalts tractats i no tractats però sí en el quocient CD2/CD19. En ambdós grups de pacients aquest quocient és inferior al valor control però és significativament inferior en el grup no tractat. Si bé aquest fet no s'ha analitzat a la literatura no ha de sorprendre ja que la disminució limfocitària provocada pel tractament ha d'incidir més sobre la població leucèmica.

5. Citotoxicitat en períodes d'incubació perllongats

La determinació de l'activitat lítica donarà uns resultats diferents si el període d'incubació entre D:E es perllonga ja que es permet el reciclatge cel·lular de la CNK per lisar noves cèl·lules diana (202). Malgrat que amb els assaigs de 18-20 hores s'obté menor variabilitat interindividual en els resultats i una menor oscil·lació IntraIndividual que

en assaigs més curts la gran majoria dels autors treballen en assaigs de 4 hores.

Per valorar la capacitat de reciclatge de la CNK dels pacients amb LLC-B s'han fet assaigs de citotoxicitat amb períodes d'incubació de 20 hores. La dinàmica de la CNK s'ha comparat amb la d'individus controls i amb la de malalts amb un defecte funcional, adquirit i citopàtic, de la CNK (hemofílics HIV positius).

Les característiques dels malalts estudiats inclosos en l'estudi d'incubació perllongada no difereixen en les característiques principals (edat, sexe, estadis clínics, limfòcits) de la sèrie global.

La citotoxicitat exercida pels pacients en el clàssic assaig de 4 hores d'incubació és inferior al valor d'ANK dels controls, com està descrit a la literatura i com succeeix en la sèrie global. Algun dels treballs que analitza l'ANK en pacients amb LLC-B ha utilitzat un assaig de 16 o 18 hores d'incubació (125,210,329,376). La citotoxicitat és inferior que la del grup control. No s'han fet comparacions entre la citotoxicitat obtinguda a 4 hores o en incubacions més perllongades.

El comportament de l'ANK en els pacients amb LLC-B és similar a l'observat en individus control. La perllongació de la incubació amb l'increment de temps per lisar les cèl·lules diana condueix a un increment significatiu de la citotoxicitat, com s'ha descrit en individus sans (202). En el present estudi, controls i pacients amb LLC-B incrementen la citotoxicitat a les 20 hores d'incubació, com és normal. De tota manera, l'increment de citotoxicitat que presenten els malalts no normalitza l'ANK comparant amb els valors controls a 20 hores, fet referit prèviament (210). En canvi, els nivells de citotoxicitat aconseguits a les 20 hores d'incubació són equiparables als valors control de citotoxicitat a 4 hores d'incubació. Per tant, es podria equiparar el tipus de resposta dels

pacients amb LLC-B amb el tipus C de citotoxicitat descrit per Zaretskaya *et al* (202).

L'increment en la citotoxicitat en incubacions perllongades que s'observa en els pacients amb LLC-B suggereix que no existeix de, forma predominant, un defecte citofuncional a la CNK dels malalts. Aquest fet es veu substentat encara més quan es compara el comportament lític dels pacients amb LLC-B amb les modificacions de la citotoxicitat motivades per la perllongació de l'estudi en malalts hemofílics amb CNK funcionalment alterades. El darrer grup de pacients no es capaç d'incrementar la citotoxicitat baixa a pesar de disposar de més temps per lisar les cèl·lules diana.

Encara que els resultats de l'estudi de citotoxicitat no descarten de forma indiscutible un defecte funcional de la CNK dels pacients amb LLC-B únicament és podria atribuir una cinètica de lisi més lenta. En canvi, si es considera l'efecte "dilutor" dels limfòcits B leucèmics en l'ANK el patró de comportament de la citotoxicitat és l'esperat. Es a dir, existeixen menys cèl·lules efectores disponibles, funcionalment són normals o escassament patològiques i triguen més temps a lisar el mateix nombre de cèl·lules diana que els individus control que poseeixen més cèl·lules efectores per la mateixa proporció D:E.

En els assaigs de 20 hores també s'ha observat la correlació inversa lineal entre l'ANK i la xifra de limfòcits. A més, s'ha objectivat una correlació directa lineal entre l'ANK i el percentatge de limfòcits CD16⁺ i CD11b⁺ (limfòcits NK). Aquestes dades concorden amb descripcions prèvies (329) i són congruents amb l'efecte "dilutor" dels limfòcits leucèmics com la principal causa que disminueix l'ANK a la LLC-B.

6. Progressió de la LLC-B.

A. Supervivència

En els pacients amb LLC-B s'han definit diverses característiques clíniques i analítiques que tenen influència en la supervivència dels malalts. Entre elles, els estadis clínics, el patró histològic d'infiltració a la BMO o el TDL han mostrat tenir gran influència en l'evolució dels malalts (291-293,302,307-308,315). En aquest estudi s'analitzen quins factors influeixen en la supervivència dels pacients incloent-hi paràmetres amb influència pronòstica ja coneguts i els paràmetres determinats en aquest estudi (ANK i poblacions limfocitàries).

Dels seixanta-set pacients inclosos en l'estudi quatre han mort en el moment de tancar la recollida de dades. Les causes que han conduït a la mort són les descrites a la literatura i estan en relació amb la malaltia (infeccions i transformació a limfoma d'alt grau) (220). En l'anàlisi univariada, considerant el moment de la inclusió a l'estudi, mostren influència en la supervivència dels malalts la xifra de plaquetes i prolimfòcits inicial, els estadis de Rai i Binet, les xifres inicials d'Ig G i d'IgA i l'ANK teòrica. La importància pronòstica de la xifra de plaquetes és un fet conegut i per aquest motiu s'ha inclòs en les dues classificacions clíniques per estadis (291-293). La major presència de cèl·lules no típiques de LLC-B (centròcits, prolimfòcits, etc.) també s'ha associat a una menor supervivència dels malalts (304-305). Els nivells d'immunoglobulines també s'ha associat amb la supervivència dels malalts (331). La relació que existeix entre l'ANK i la supervivència dels pacients amb LLC-B no s'ha analitzat en cap treball previ per la manca de treballs clínics sobre l'ANK a la LLC-B. No obstant, l'ANK és un factor d'importància en la supervivència i en la supervivència lliure de malaltia de diversos tipus de tumors sòlids (4).

Si l'estudi univariat de la supervivència es realitza des del moment del diagnòstic les variables que mostren influència són la xifra

d'hemoglobina i de plaquetes inicials i l'ANK. Les dues primeres característiques han demostrat la seva importància i s'han inclòs entre els criteris per estadis clínics (291-293).

L'anàlisi multivariada dels factors independents amb influència en la sobrevida dels pacients des del moment de la inclusió a l'estudi obté com a variables independents la xifra de plaquetes i d'hemoglobina inicial i l'ANK a proporció D:E 1:100. Ja s'ha discutit el significat de cadascuna d'aquestes variables en el paràgraf anterior. En l'anàlisi multivariada analitzant les variables des del moment del diagnòstic de la malaltia les que mostren influència en el pronòstic són les mateixes que el l'anàlisi anterior.

B. Progressió de la limfocitosi

La limfocitosi elevada és un factor de mal pronòstic a la LLC-B i és un paràmetre d'evolució de la malaltia (309,315-316). Dels cinquanta-tres pacients en risc de desenvolupar una limfocitosi progressiva quatre han presentat el fenomen evolutiu durant el període de seguiment. Els paràmetres que han influït en el desenvolupament de la limfocitosi progressiva, tant el l'anàlisi univariada com multi, han sigut la major limfocitosi en el moment de l'estudi i l'edat més avançada dels pacients. No existeixen factors de risc per desenvolupar limfocitosi progressiva quan es considera des del moment del diagnòstic. Aquest fet no ha de sorprendre ja que els malalts que tenien risc en el moment del diagnòstic han desenvolupat la limfocitosi abans de la seva inclusió a l'estudi.

C. Progressió d'estadi clínic

La història natural de la majoria de pacients amb LLC-B és la progressió de la malaltia augmentat la infiltració leucèmica i progressant d'estadi. De la sèrie global de pacients, trenta-sis no han rebut

tractament. En aquest grup s'ha analitzat la progressió de la malaltia a estadis clínics superiors. Quatre malalts (11,1%) han progressat d'estadi. Les variables que han mostrat pes pronòstic per la progressió de la malaltia ha sigut la xifra de plaquetes.

7. ANK en el transcurs de la malaltia

Els treballs publicats sobre l'ANK en la LLC-B coincideixen en la menor activitat lítica dels malalts. Alvarez de Mon *et al* (35) descriuen la normalització de l'ANK en pacients que assoleixen l'estadi 0 de Rai després de realitzar tractament alquilant. L'evolució de l'activitat citotòxica segons els canvis clínico-analítics produïts no s'ha descrit en cap altre article mèdic. En el present treball s'ha determinat repetidament l'ANK del mateix pacient i s'ha anotat les variacions produïdes entre elles. L'anàlisi de les modificacions s'ha fet distribuint els pacients en tres grups. El primer està compost per pacients que no han rebut tractament al llarg de les diferents proves. Aquest grup permet valorar l'evolució natural de l'ANK en pacients amb LLC-B. El segon grup està compost per pacients que reben diversos tipus de quimioteràpia alquilant. S'analitzen les modificacions de l'activitat lítica i els paràmetres analítics en relació amb les modificacions provocades pel tractament citorreductor. El tercer grup està compost per pacients que reben tractament amb α -interferó. L'interferó és eficaç en estadis poc avançats de la malaltia i és un potent potenciador de l'ANK (11,13). En aquest tercer grup es valoren les modificacions en la citotoxicitat i les poblacions limfocitàries promogudes per l'agent immunomodulador.

A. Evolució de l'ANK en pacients no tractats

L'estadi clínic dels vuit malalts no tractats és de forma predominant A0 o AI. Cap dels pacients va progressar a estadis clínics més avançats. El predomini de pacients en estadis poc avançats ~~ente~~ el grup de

pacients sense tractament és lògic. Com s'ha descrit en l'apartat de tractament de la LLC-B es preferible reservar el tractament per pacients amb signes de mal pronòstic. El comportament de l'ANK no ha sigut homogeni. Tres malalts mantenen estables les xifres de citotoxicitat. Un pacient mostra un descens en l'activitat lítica sense una cuasa aparent que ho justifiqui. Quatre pacients incrementen la citotoxicitat, en dos de forma molt evident. En un d'aquests malalts l'increment es produeix després de recuperar-se d'un episodi infecció greu. Les CNK juguen un paper important en la lluita primària contra la infecció. La seva activitat antibacteriana pot provocar una disminució de la citotoxicitat (4). Per tant l'increment en l'ANK d'aquest pacient pot reflectir l'evolució normal de l'ANK en el transcurs d'una infecció. La resta de pacients no té una causa clínica que justifiqui l'increment de l'activitat lítica.

Les poblacions limfocitàries dels pacients que no reben tractament es mantenen estables en tots excepte en un. Aquest darrer malalt té un increment percentual i absolut de la població limfoide T i NK. Es un pacient en estadi A que desenvolupa una citotoxicitat normal, amb uns valors de limfòcits NK normals. Per tant, en aquest malalt concret no es pot dir que existeixi un defecte intrínsec de la CNK com han suggerit altres autors (210,329,373,375,377).

B. Evolució de l'ANK en malalts sota tractament alquilant

Els vuit malalts que realitzen tractament tenen un estadi clínic més avançat que el grup no tractat ja que únicament el 37,5% d'ells està en estadi 0. La majoria de pacients rebien CLB sol o en combinació amb PDN. Durant el període de tractament tots els pacients excepte un es van mantenir en l'estadi clínic mentre que un va progressar de AI a BII.

La xifra de limfòcits no es modifica de forma **significativa** en el període de control de la citotoxicitat. En aquest grup l'evolució de la

citotoxicitat també és heterogeni. Dos pacients mantenen estable la seva baixa citotoxicitat. Aquest pacients presenten una xifra de limfòcits superior a $50 \times 10^9/L$ amb una escassa proporció de limfòcits efectors. Un segon grup, compost per tres pacients, incrementa l'activitat lítica. En dos d'ells l'increment és coincident amb una reducció de la limfocitosi i el en tercer amb un increment de la població NK. L'íntima relació que existeix entre la limfocitosi i l'ANK i entre el percentual de les poblacions NK i l'ANK permet suposar una situació teòrica on la disminució de la limfocitosi o l'increment percentual de les poblacions NK es reflecteixi en un increment de l'ANK. El comportament d'aquests tres pacients concorda de forma plena amb la hipòtesi de l'efecte dilucional. Es més, la reducció de la citotoxicitat coincidint amb un increment en la xifra de limfòcits que s'hauria d'observar de forma teòrica també s'ha pogut demostrar en un pacient en determinacions posteriors.

Finalment, tres dels malalts tractats amb agents alquilants disminueixen la seva citotoxicitat. En dos d'ells no s'assisteix de forma immediata i paral·lela a l'increment de la citotoxicitat amb la disminució de la xifra de limfòcits. En aquells pacients en els que s'ha pogut practicar més determinacions posteriors s'ha assistit a un increment en l'ANK. Per tant, es pausable que inicialment existeix un efecte citotòxic que afecta als limfòcits leucèmics disminuint la xifra de limfòcits i, alhora, un efecte citotòxic sobre els limfòcits efectors que disminueix la seva capacitat lítica. Clàssicament s'ha dit que els alquilants són inhibidors de la citotoxicitat (4). A més, el comportament de la citotoxicitat en el grup de pacients tractats amb interferó substenta la citotoxicitat del CLB sobre les CNK, com s'exposarà més tard.

El comportament de l'ANK en relació amb les xifres de limfòcits i poblacions limfocitàries és l'esperat segons la hipòtesi de l'efecte dilucional.

C. Evolució de l'ANK en pacients tractats amb α_{2b} -interferó

Nou malalts en estadi A van ser inclosos en un **protocol terapèutic** que, en una primera fase, inclou la citorreducció per mitja de CLB i, en una segona fase, l'administració d'interferó per valorar l'efecte anti-tumoral afegit d'aquesta substància. Cap pacient va progressar a un estadi superior de Binet.

En la fase de citoreducció mitjançant l'administració de CLB s'obté una reducció de la xifra de limfòcits en tots els malalts. L'ANK no s'incrementa de forma global. El 75% pacients amb una ANK basal més baixa incrementen la citotoxicitat fins nivells propers a la normalitat. El 50% dels pacients amb citotoxicitat basal normal la mantenen mentres que el 50% restant presenten una disminució de l'ANK a pesar de la disminució de la xifra de leucòcits. Per tant, en aquells pacients amb una activitat NK menor el tractament pot incrementar-la mentres que en pacients amb citotoxicitat normal la introducció del tractament alquilant pot reduir-la possiblement per afectar també a les cèl·lules no leucèmiques. Aquest efecte citoreductor no selectiu s'observa pel decrement en totes les poblacions limfocitàries B, T i NK després de rebre CLB.

En la fase de tractament amb α -IFN s'observa una gran increment en la citotoxicitat desenvolupada pels malalts. El 85,7% dels mateixos té una citotoxicitat dintre les límits de la normalitat. Algun dels pacients desenvolupa una activitat lítica molt intensa (71,5% a una proporció D:E 1:200). A l'inici de l'estudi únicament el 44% posseïa una activitat lítica dintre dels límits de la normalitat. Aquest increment en la citotoxicitat no s'acompanya d'una reducció en la xifra de limfòcits. En canvi, l'administració d' α -IFN s'acompanya de redistribució de les poblacions T i NK, que retornen als nivells basals, i d'una disminució de la població leucèmica que no assoleix significació estadística.

L'interferó és un potent estimulant de l'ANK (11,13). L'increment de la citotoxicitat ja s'havia referit en assaig *in vitro* realitzats en malalts amb LLC-B. No obstant, no tots els autors coincidien en el grau de recuperació de citotoxicitat. Per un grup la recuperació és parcial i d'aquesta manera postulen que la CNK de la LLC-B és intrínsecament defectuosa (210,329,373,375,377) mentre que altres grups observen una recuperació total de la citotoxicitat després de la incubació amb IFN i el defecte de la CNK no està tant clar (210,373). L'aplicació d'IFN a la LLC-B és de recent introducció i s'ha limitat a protocols que inclouen pocs pacients. No s'ha analitzat l'efecte de la terapèutica sobre l'ANK. La bona resposta que mostra la part funcional de la CNK en els pacients en estadis poc avançats de LLC-B indiquen que els mecanismes d'estimulació i de lisi són normals en aquestes situacions i que l'efecte "dilutor" dels limfòcits B sigui la causa més important en la baixa activitat lítica d'aquest malalt.

Certs autors han relacionat la resposta al tractament amb l'increment en l'activitat lítica mentre que altres autors no troben correlació entre els dos paràmetres (162,179,183-185). De fet, els pacients tractats van respondre o no a l' α -IFN independentment de l'increment en l'ANK. Possiblement, l'efecte terapèutic de l'IFN no estigui mediat de forma directa per la capacitat en incrementar l'activitat NK.

En resum, els pacients amb LLC-B tenen una citotoxicitat baixa en comparació amb els controls. La citotoxicitat que desenvolupen mostra una relació inversa amb la limfocitosi i una relació directa amb el percentatge de limfòcits T i NK. En aquells casos en els que es disposa de determinacions seqüencials els canvis en la citotoxicitat segueixen el sentit concordant amb els paràmetres descrits, es a dir que l'activitat lítica s'incrementa quan disminueixen els limfòcits totals o quan augmenta el percentatge de limfòcits T i NK. La resposta en la citotoxicitat després d'incubacions perllongades no és diferent de la normal, obtenint-se xifres de citotoxicitat similars a la dels controls en períodes d'incubació normal.

L'IFN incrementa l'ANK *in vivo*, normalitzant-la. Es possible que els agents alquilants provoquin una disminució de la citotoxicitat per el mateix efecte citoreductor que tenen. Finalment, en estadis precoços de la malaltia la baixa citotoxicitat esta mediada per l'efecte dilucional dels limfòcits B mentres que en estadis avançats i molt leucocitòsics s'ha de descartar l'alteració intrínseca de la CNK per purificació de les mateixes amb, de forma ideal, un mètode específic per elles (AcMo), ràpid i que no precisi de pasos tècnics realitzats a 4°C.

CONCLUSIONS

Dels resultats obtinguts es desprenen les següents conclusions:

1. Tècnica de citotoxicitat

1. En l'estandarització de la tècnica s'ha observat una bona reproductibilitat i linearitat.
2. El càlcul dels valors teòrics de citotoxicitat després de l'ajustament dels valors experimentals a una corba teòrica de tipus von Krogh ha mostrat un bon ajustament, tant en individus control com en pacients amb LLC-B.

2. Efecte dels limfòcits B a l'ANK de controls

3. L'increment de la proporció de limfòcits B a la CMN d'individus control produeix una reducció en la mateixa que segueix un patró de regressió lineal.

3. Activitat natural killer a la LLC-B

4. L'ANK a la LLC-B està disminuïda respecte dels valors control.
5. Un 19,4% dels pacients desenvolupa una ANK normal. Les característiques d'aquest grup de pacients són: predomini de l'estadi 0 de Rai (69,9%) i major proporció a SP de limfòcits CD2⁺, CD4⁺, CD16⁺, CD57⁺, CD11b⁺ i CD56⁺.

6. L'ANK mostra una relació lineal inversa amb el recompte de leucòcits i limfòcits dels pacients. Aquesta relació es manifesta en:
 1. increment de la citotoxicitat a mesura que augmenta la proporció D:E.
 2. la menor citotoxicitat dels pacients en estadis avançats, en els que presenten hepatomegàlia o hipoIg A i que corresponen a malalts amb major limfocitosi.
 3. la relació observada entre l'ANK i el percentatge de limfòcits CD2⁺, CD4⁺, CD16⁺, CD57⁺, CD11b⁺ i CD56⁺, tenint en compte que el percentatge de limfòcits està en relació amb la limfocitosi.
 4. en els malalts que no han rebut tractament on l'ANK té relació lineal directa amb el percentatge de limfòcits CD16⁺ i CD11b⁺.
7. Els pacients amb uns percentatges més alts de les poblacions CD2⁺, CD16⁺ i CD57⁺ poseeixen una activitat lítica normal.
8. L'ANK té relació amb la major presència de LGG.
9. El comportament de l'ANK en la LLC-B quan es realitzen incubacions perllongades és normal, si bé no ateny els valors de normalitat.
10. Els estudis seqüencials mostren, en general, coincidència entre:
 1. l'increment de l'ANK i la disminució de la xifra de limfòcits, i a la inversa.
 2. l'increment de l'ANK i l'increment percentual de les poblacions limfocitàries T i NK.

11. El tractament subcutani amb α -IFN és capaç de normalitzar l'ANK sense incrementar el nombre de limfòcits T i NK.

4. Poblacions limfocitàries

12. Els pacients amb LLC-B tenen un menor percentatge de limfòcits T i NK i un major percentatge de limfòcits CD19⁺ que el grup control, mostren uns valors absoluts per cadascuna de les poblacions analitzades superiors a les del grup control i tenen un quocient CD2/CD19 està molt disminuït.
13. Les poblacions limfocitàries estan relacionades amb la xifra de limfòcits. Aquest fet ha influït en els valors absoluts més elevats de limfòcits CD2⁺, CD4⁺ i CD19⁺ que s'observa en els estadis avançats de la malaltia (III=IV o C), en la relació lineal directa entre el valor absolut de limfòcits T i NK i la xifra de limfòcits i en la relació lineal inversa entre els percentatges de les diverses poblacions i la xifra de limfòcits.
14. El patró de tipús difús s'associa a uns valors superiors de limfòcits CD4⁺.

5. Supervivència i progressió de la malaltia

15. Les variables que tenen influència sobre la sobrevida, des del moment d'inclusió a l'estudi, en l'anàlisi univariada són la xifra de prolimfòcits i de plaquetes inicials, l'estadi de Rai i de Binet, l'ANK, els nivells d'Ig G i Ig A inicials. Les variables que han mostrat valor predictiu en l'anàlisi multivariada han sigut la xifra de plaquetes i d'hemoglobina inicial i l'ANK a la proporció 1:100. En el grup amb

LLC-B no quiescent s'han aïllat les mateixes variables amb influència sobre la supervivència.

16. Les variables amb influència sobre l'aparició d'uns recomptes limfocitaris superiors a $50 \times 10^9/L$ des del moment de la inclusió en l'estudi han sigut, tant a l'anàlisi univariada com multi, la xifra de limfòcits i l'edat dels pacients.
17. La xifra de plaquetes ha mostrat influència pronòstica en la progressió de la malaltia.

BIBLIOGRAFIA

1. Takasugi M, Mickey RM, Terasaky PI. Reactivity of lymphocytes from normal donors on cultured tumor cells. *Cancer Res* 1973; 33: 2898-2902.
2. Ritz J, Schmidt RE, Michon J, Hercend T, Scholssman SF. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 1988; 42: 181-211.
3. Ritz J. The role of natural killer cells in immune surveillance. *N Eng J Med* 1989; 320: 1748-1749.
4. Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in human disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 53: 1-23.
5. Royer HD, Reinherz EL. T lymphocytes: ontogeny, function, and relevance to clinical disorders. *N Eng J Med* 1987; 317: 1136-1142.
6. Nossal GJV. The basic components of the immune system. *N Eng J Med* 1987; 316: 1320-1325.
7. Roder JC, Haliotis T, Klein M, Korec S, Jett JR, Ortaldo JR, Herberman RB. A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature (Lond.)* 1980; 284: 553-558.
8. Biron CA, Pedersen KF, Welsh RM. Aberrant T cells in beige mutant mice. *J Immunol* 1987; 138: 2050-2056.
9. Ortaldo JR. Cytokine production by CD3- large granular lymphocytes. En: CW Reynolds & RH Wiltrot, eds - *Functions of the natural immune system*, Plenum Press, NY, 1988.
10. Reynolds CW, Sharrow SO, Ortaldo JR, Herberman RB. Natural killer activity in the rat.- II. Analysis of surface antigens on LGL by flow cytometry. *J Immunol* 1982; 127: 2204-2211.
11. Tursz T. Les lymphocytes tueurs naturels. *Presse Med* 1985; 14: 219-223.
12. Herberman RB. *Natural killer cell mediated immunity against tumors*. Academic Press. New York. 1980.
13. Ortaldo JR, Herberman RB. Heterogeneity of natural killer cells.

- Ann Rev Immunol* 1984; 2: 359-394.
14. Pelici PG, Allavena P, Subar M et al. T cell receptor (α, β, τ) gene rearrangements and expression in normal and leukemic large granular lymphocytes/natural killer cells. *Blood* 1987; 70: 1500-1508.
 15. Ortaldo JR, Mathieson BJ, Wiltrout RH. Characterization and functions of natural killer cells. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1989; 140: 444-450.
 16. Herberman RB. *NK cells and other natural effector cells*. Academic Press. New York. 1982.
 17. Schmidt RE, Hercend T, Schlossman SF, Ritz J. Functional surface structures on human natural killer cells. *Klin Wochenschr* 1985; 63: 1189-1200.
 18. Perussia B, Trinchieri G. NK cells: a discrete leukocyte subset of still undefined origin mediating biologically relevant functions upon specific stimulation. *Ann Int Pasteur Immunol* 1989; 140: 438-443.
 19. Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kurzinger K, Sringer T. Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J Immunol* 1981; 127: 590-595.
 20. Schmidt RE, Bartley GT, Lee SS et al. Expression of the NTKa clonotype in a series of human natural killer clones with identical cytotoxic specificity. *J Exp Med* 1986; 163: 821-825.
 21. Ohno T, Kanoh T, Arita Y et al. Fulminant clonal expansion of large granular lymphocytes. Characterization of their morphology, phenotype, genotype, and function. *Cancer* 1988; 62: 1918-1927.
 22. Phillips JH, Lanier LL. A model for the differentiation of human natural killer cells. *J Exp Med* 1985; 161: 1464-1482.
 23. Hackett J, Bosma GC, Bosma MJ, Bennett M, Kumar V. Transplantable progenitors of natural killer cells are distinct from those of T and B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 3427-3431.
 24. Rooney CM, Wimperis JZ, Brenner MK, Patterson J, Hoffbrand AV, Prentice HG. Natural killer cell activity following T-cell depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1986; 62: 413-420.

25. Peter HH. The origin of human NK cells. An ontogenic model derived from studies in patients with immunodeficiencies. *Blut* 1983; 46: 239-248.
26. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Eng J Med* 1989; 320: 1731-1735.
27. Roman-Roman S, Baixeras A, Genevée C, Hercend T, Triebel F. The T-cell receptor V δ genes predominantly used by human peripheral $\tau/\delta+$ T lymphocytes are not rearranged in CD3- natural killer cells. *Human Immunol* 1989; 26: 75-83.
28. Young HA, Ortaldo JR, Herberman RB, Reynolds CW. Analysis of T-cell-receptor in highly purified rat and human large granular lymphocytes (LGL): lack of functional 1.3 Kb β -chain mRNA. *J Immunol* 1986; 136: 2701-2708.
29. Loughran TP, Starkebaum G, Aprile JA. Rearrangement and expression of T-cell receptor genes in large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 1988; 71: 822-824.
30. Reynolds CW, Ortaldo JR. Natural killer activity: the definition of a function rather than a cell type. *Immunology Today* 1987; 8: 172-174.
31. Ortaldo JR, Longo DL. Human natural lymphocyte effector cells: definition, analysis of activity, and clinical effectiveness. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 999-1010.
32. Garni-Wagner BA, Witte P, Tutt MM et al. Is there a common NK/T cell progenitor in the thymus?. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 28-32.
33. Iwatani Y, Amino N, Kabutomori O et al. Effects of different sample preparations on enumeration of large granular lymphocytes (LGLs), and demonstration of a sex difference of LGLs. *Am J Clin Pathol* 1988; 90: 674-678.
34. Fontana L, De Rossi G, De Sanctis G et al. Decreased NK activity in hairy cell leukemia (HCL): An analysis at the cellular level. *Blut* 1986; 53: 107-113.
35. Alvarez-Mon M, Casas J, Laguna R, Jordá J, Durántez A. Clinical signification of natural killer activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1987; 38: 268-273.

36. Bender BS, Chrest FJ, Adler WH. Phenotypic expression of natural killer cell associated membrane antigens and cytolytic function of peripheral blood cells from different aged humans. *J Clin Lab Immunol* 1986; 21: 31-36.
37. Gastl G, Schalmz F, Huhn D, et al. Large granular lymphocytes: morphological and functional proprieties. I. Results in normals. *Blut* 1983; 46: 297-310.
38. Polli N, Matutes E, Robinson D, Catovsky D. Morphological heterogeneity of Leu7, Leu11 and OKM1 positive lymphocyte subsets: an ultrastructural study with the immunogold method. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 331-339.
39. West WH, Cannon GB, Kay D, Bonnard GD, Herberman RB. Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells. *J Immunol* 1977; 118: 355-361.
40. Horwitz DA, Bakke AC. An Fc receptor-bearing, thrid population of human mononuclear cells with cytotoxic and regulatory function. *Immunol Today* 1984; 5: 148-153.
41. Masuci G, Masuci MG, Bejarano MT, Klein E. Comparison of highly NK active human lymphocyte subsets separated by various procedures involving E, EA rosetting, density gradients and adherence to immune complexes. *J Immunol Methods* 1983; 63: 57-67.
42. Sánchez Madrid F, Cebrián M, Landázuri MO et al. Report of the IV International Workshop on Leukocyte differentiation antigens (Vienna, 1989). *Inmunología* 1898; 8: 35-46.
43. Hercend T, Griffin JD, Bensussan A et al. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. *J Clin Invest* 1985; 75: 932-943.
44. Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor fuctions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J Immunol* 1983; 2133-2141.
45. Bray RA, Gottschalk LR, Landay AL, Gebel HM. Differential surface marker expression in patients with CD 16+ lymphoproliferative disorders: in vivo model for NK differentiation. *Human Immunol* 1987; 19: 105-115.

46. Hiserodt JC, Herberman RB. Natural Killer cells and tumor immunity: 1987. *Year Immunology* 1989; 4: 201-207.
47. Schattner A, Dugan DB. Natural killer cells - toward clinical application. *Am J Hematol* 1985; 18: 435-443.
48. Perussia B, Trinchieri G, Jackson A, Warner NL, Faust J, Rumpold H, et al. The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1984; 133: 180-189.
49. Ythier A, Hercend T. Subsets of human peripheral blood natural killer cells. Progress in immunology VI. Academic Press Inc. 1986. Toronto.
50. Lanier LL, Kipps TJ, Phillips JH. Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J Exp Med* 1985; 162: 2089-2106.
51. Schmidt RE, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, Ritz J. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med* 1986; 164: 351-356.
52. Ortaldo JR, Sharrow SO, Timonen T, Herberman RB. Determination of surface antigens on highly purified human NK cells by flow cytometry with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1981; 127: 2401-2409.
53. Nishikawa K, Saito S, Morii T et al. Differential expression of the interleukin 2 receptor β (p75) chain on human peripheral blood natural killer subsets. *International Immunol* 1990; 2: 481-486.
54. Moretta A, Tambussi G, Bottino C et al. A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function. *J Exp Med* 1990; 171: 695-714.
55. Abo T, Miller CA, Gartland L, Balch CM. Differentiation stages of human natural killer cells in lymphoid tissues from fetal to adult life. *J Exp Med* 1983; 157: 273-284.
56. Janossy G, Coustain-Smith E, Campana D. The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnosis of acute leukemia: a study of 500 cases. *Leukemia* 1989; 3: 170-181.

57. Sheridan W, Winton EF, Chan WC et al. Leukemia of non-T lineage natural killer cells. *Blood* 1988; 72: 1701-1707.
58. Griffin JD, Hercend T, Beveridge R, Schlossman SF. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. *J Immunol* 1983; 130: 2947-2951.
59. Scala G, Allavena P, Ortaldo JR, Heberman RB, Oppenheim JJ. Subsets of human large granular lymphocytes (LGL) exhibit accessory cell functions. *J Immunol* 1985; 134: 3049-3055.
60. Procopio ADG, Allavena P, Ortaldo JR. Noncytotoxic functions of natural killer (NK) cells: large granular lymphocytes (LGL) produce a B cell growth factor (BCGF). *J Immunol* 1985; 135: 3264-3271.
61. Pistoia V, Cozzolino F, Torcia M, Castigli E, Ferrarini M. Production of B cell growth factor by a Leu-7+, OKM1+ non-T cell with the features of large granular lymphocytes (LGL). *J Immunol* 1985; 134: 3179-3184.
62. Michael A, Hackett JJ, Bennett M, Kumar V, Yuan D. Regulation of B lymphocytes by natural killer cells. Role of IFN- τ . *J Immunol* 1989; 142: 1095-1101.
63. Kannaourakis G, Johnson GR, Begley CG, Werkmeister JA, Burns GF. Enhancement of in vitro beta-thalassemic and normal hematopoiesis by a noncytotoxic monoclonal antibody 9.103: evidence for negative regulation of hematopoiesis by monocytes and natural killer cells. *Blood* 1988; 72: 1124-1133.
64. Savary CA, Lotzová E. Natural killer cell-mediated inhibition of growth of myeloid and lymphoid clonogenic leukemias. *Exp Hematol* 1989; 17: 183-187.
65. Cuturi MC, Anegón I, Sherman F et al. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med* 1989; 169: 569-583.
66. Hansson M, Petersson M, Koo CG, Wigzell H, Kiessling R. Natural killer cells as regulators of hematopoiesis. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 50-54.
67. Mangan KF. Immunologic control of hemopoiesis: implications for quality of the graft after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Procee* 1987; 19: 23-28.

68. Matera L, Avanzi G, Cesano A, Bellone G, Malavasi F, Pegoraro L. Characterization of hemopoietic regulatory factors released by unstimulated LGL. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 92-98.
69. Pross HF, Baines MG. Low natural killer (NK) cell activity in the peripheral blood of metastasis-free cancer patients is associated with reduced metastasis-free survival time. En "19th International Leukocyte Conference. Alberta. Canada," 1989 (Abstract).
70. Schantz SP, Goepfert H. Multimodality therapy and distant metastasis: The impact of natural killer cell activity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987; 113: 1207-1213.
71. Katz P, Mitchell SR, Cupps TR, Evans M, Whalen G. Suppression of B cell responses by natural killer cells is mediated through direct effects on T cells. *Cell Immunol* 1989; 119: 130-42.
72. Pohajdak B, Gomez J, Orr FW, Khalil N, Talgoy M, Greenberg AH. Chemotaxis of large granular lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 278-284.
73. Natuk RJ, Welsh RM. Accumulation and chemotaxis of natural killer/large granular lymphocytes at sites of virus replication. *J Immunol* 1987; 138: 877-883.
74. Micheal A, Hackett J, Kumar V, Yuan D. Interaction of B lymphocytes and NK cells. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 75-79.
75. Escudier E, Fleury J, Cordonnier C, Vernant JP, Bernaudin JF. Large granular lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluids from immunocompromised patients with cytomegalovirus pneumonitis. *AJCP* 1986; 86: 641-645.
76. Pilaro AM, Sayers TJ. Chemotaxis of rat peripheral blood large granular lymphocytes to activators of protein kinase C. En *Natural killer cells and host defense*, EW Ades & C Lopez (eds). S. Karger AG. Basilea. 1989, pag 84-87.
77. Leibson PJ, Hunter-Laszlo M, Douvas GS, Hayward AR. Impaired neonatal natural killer-cell activity to herpes simplex virus: decreased inhibition of viral replication and altered response to lymphokines. *J Clin Immunol* 1986; 6: 216-224.
78. Formenti SC, Turner RR, de Martini RM et al. Immunophenotypic analysis of peripheral blood leukocytes at different stages of HIV

- infection. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 300-307.
79. Sirianni MC, Soddus S, Malorni W, Arancia G, Aiuti F. Mechanism of defective natural killer cell activity in patients with AIDS is associated with defective distribution of tubulin. *J Immunol* 1988; 140: 2565-2568.
 80. Robinson WE, Mitchell WM, Chambers WH, Schuffman SS, Montefiori DC, Oeltmann TN. Natural killer cell infection and inactivation in vitro by the human immunodeficiency virus. *Hum Pathol* 1988; 19: 535-540.
 81. Sirianni MC, Tagliaferri F, Aiuti F. Pathogenesis of the natural killer cell deficiency in AIDS. *Immunol Today* 1990; 11: 81-82.
 82. Garcia-Peñarrubia P, Koster FK, Kelley RO, McDowell TD, Bankhurst AD. Antibacterial activity of human natural killer cells. *J Exp Med* 1989; 169: 99-113.
 83. Abo T, Sugawara S, Amenomori A et al. Selective phagocytosis of gram-positive bacteria and interleukin 1-like factor production by a subpopulation of large granular lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 3189-3197.
 84. Toosi Z, Paris MR, Purvis SF, Ellner JJ. Regulation of human T-cell production of interleukin 2 by Leu11 (CD16) positive large granular lymphocytes. *Cell Immunol* 1989; 118: 413-424.
 85. Zambello R, Trentin L, Agostini C et al. Release of natural killer cytotoxic factor in patients with natural lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Leuk Res* 1989; 13: 315-322.
 86. Munger WE, Reynolds CW, Henkart PA. LGL secretory granule-associated, 60-kd BLT esterase augments the lytic activity of cytolytic granules against nucleated target cells. In Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 212-215.
 87. Oshimi K, Shinkai Y, Okumura K, Oshimi Y, Mizoguchi H. Perforin gene expression in granular lymphocyte proliferative disorders. *Blood* 1990; 75: 704-708.
 88. Degliantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis MK, Perussia B, Trinchieri G. Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. *J Exp Med* 1985; 162: 1512-1530.

89. Wright SC, Bonavida B. Studies of the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. VII. Functional **comparison** of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; 138: 1791-1798.
90. Ortaldo JR, Ransom JR, Sayers TJ, Herberman RB. Analysis of cytostatic/cytotoxic lymphokines: relationship of natural killer cytotoxic factor to recombinant lymphotoxin, recombinant tumor necrosis factor and leukoregulin. *J Immunol* 1986; 137: 2857-2863.
91. Bialas T, Trapani J, Dupont B, Welte K, Flomenberg N. Characterization of partially purified natural killer cytotoxic factor. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 227-232.
92. Katz P, Mitchell SR, Cupps TR, Evans M, Whalen G. Natural killer cells enhance the early events in B cell activation. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 59-63.
93. Kimata H, Shanahan F, Brogan M, Targan S, Saxon A. Modulation of ongoing human immunoglobulin synthesis by natural killer cells. *Cell Immunol* 1987; 107: 74-88.
94. Kay NE, Perri RT. Evidence that large granular lymphocytes from B-CLL patients with hypogammaglobulinemia down-regulate B-cell immunoglobulin synthesis. *Blood* 1989; 73: 1016-1019.
95. Lobo PI, Wright AE. In vitro assays to study role of T cell-derived factors on human B lymphocytes should take into consideration inhibiting effect of large granular lymphocyte subset (CD5-, CD16+) that can contaminate B cell preparations. *J Immunol Methods* 1988; 115: 239-246.
96. Brenner MK, Vyakarnam A, Reittie JE et al. Human large granular lymphocytes induce immunoglobulin synthesis after bone marrow transplantation. *Eur J Immunol* 1987; 17: 43-47.
97. Abruzzo LV, Mullen CA, Rowley DA. Immunoregulation by natural killer cells. *Cell Immunol* 1986; 98: 226-278.
98. Robles CP, Pollack SB. Regulation of the secondary in vitro antibody response by endogenous natural killer cells: kinetics, isotype preference, and non-identity with T supressor cells. *J Immunol* 1986; 137: 2418-2424.
99. Grunebaum E, Malatzky-Goshen E, Shoenfeld Y. **Natural killer cells and autoimmunity.** *Immunol Res* 1989; 8: 292-304.

100. Goss GD, Wittwer MA, Bezwoda WR et al. Effect of natural killer cells on syngeneic bone marrow: in vitro and in vivo studies demonstrating graft failure due to NK cells in an identical twin treated by bone marrow transplantation. *Blood* 1985; 66: 1043-1046.
101. Lefkowitz M, Jorkasky D, Kornbluth J. Increase in natural killer activity in cyclosporine-treated renal allograft recipients during rejection. *Human Immunol* 1987; 19: 139-149.
102. Ghayur T, Seemayer TA, Lapp WS. Kinetics of natural killer cell cytotoxicity during the graft-versus-host reaction. Relationship between natural killer cell activity, T and B cell activity, and development of histopathological alterations. *Transplantation* 1987; 44: 254-260.
103. Dokhelar MC, Wiels J, Lipinski M, Tetaud C, Devergie A, Gluckman E, et al. Natural killer cell activity in human bone marrow recipients. *Transplantation* 1981; 31: 61-65.
104. Lopez C, Kirkpatrick D, Sorell M, O'Reilly RJ. Association between pre-transplant natural kill and graft-versus-host disease after stem-cell transplantation. *Lancet* 1979; november 24: 1103-1106.
105. Noble RL, Warren RP. Age-related development of human natural killer cell activity. *N Eng J Med* 1985; 313: 641-642.
106. Facchini A, Mariani E, Mariani AR, Papa S, Vitale M, Manzoli FA. Increased number of circulating Leu 11+ (CD16) large granular lymphocytes and decreased NK activity during human ageing. *Clin Exp Immunol* 1987; 68: 340-347.
107. Alés-Martínez JE, Alvarez-Mon M, Merino F, et al. Decreased TcR-CD3+ T cell numbers in healthy aged humans. Evidence that T cell are masked by reciprocal increase of TcR-CD3-CD2+ natural killer cells. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1827-1830.
108. Brahmí Z, Thomas JE, Park M, Park M, Dowdeswell IR. The effect of acute exercise on natural killer-cell activity of trained and sedentary human subjects. *J Clin Immunol* 1985; 5: 321-328.
109. Gregory CD, Lee H, Scott IV, Golding PR. Phenotypic heterogeneity and recycling capacity of natural killer cells in normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1987; 11: 135-145.
110. Gupta S, Fanous E. Autologous mixed lymphocyte reaction (AMLR) in

- man. XVI. The AMLR and monoclonal antibody-defined T cell subsets and HNK 1+ natural killer cells in normal human pregnancy. *J Reprod Immunol* 1986; 9: 1-9.
111. Ostensen ME, Thiele DL, Lipsky PE. Tumor necrosis factor- α enhances cytolytic activity of human natural killer cells. *J Immunol* 1987; 138: 4185-4191.
112. Finberg RW. Natural killer cells: function in search of a phenotype. *Year Immunol* 1989; 4: 193-200.
113. Allen JI, Syropoulos HJ, Grant B, Eagon JC, Kay NE. Cimetidine modulates natural killer cell function of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Lab Clin Med* 1987; 109: 396-401.
114. Leung KH. Inhibition of human NK cell and LAK cell cytotoxicity and differentiation by PGE₂. *Cell Immunol* 1989; 123: 384-395.
115. Leung KH. Inhibition of human natural killer cell and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity and differentiation by vitamin D₃. *Scand J Immunol* 1989; 30: 199-208.
116. Phillips JH, Takeshita T, Sugamura K, Lanier LL. Activation of natural killer cells via the p75 interleukin 2 receptor. *J Exp Med* 1989; 170: 291-296.
117. Kornbluth J, Hoover R. Gene expression associated with natural killer function. En *Natural killer cells and host defense*, EW Ades & C Lopez (eds). S. Karger AG. Basilea. 1989, pag 69-74.
118. June CH, Ledbetter JA, Rabinovitch PS, Hellstrom KE, Hellstrom I. Calcium mobilization and enhanced natural killer function in large granular lymphocytes result from cross-linking the CD2 E-rosette and CD16 Fc-receptor. En McMichael AJ - *Leucocyte typing III. White cell differentiation antigens*. Oxford University Press. Oxford. 1987: 127-131.
119. Egawa SE, Abc T, Hiwatashi N. Enhancement of human natural killer activity by the monoclonal Leu-11 antibodies. *Cell Immunol* 1987; 104: 386-399.
120. Cassatella MA, Anegón I, Cuturi MC, Giskey P, Trinchieri G, Perussia B. Fc γ R (CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. *J Exp Med* 1989; 169: 549-567.
121. Bergelson LD, Dyatlovitskaya EV, Klyuchareva TE et al. The role of glycosphingolipids in natural immunity. **Gangliosides** modulate

- the cytotoxicity of natural killer cells. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1979-1983.
122. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 170: 827-845.
 123. Uchida A. Lack of spontaneous and inducible natural killer cell activity in human bone marrow: presence of adherent suppressor cells. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1983-84; 3: 181-192.
 124. Hellstrand K, Hermodsson S. Interleukin-2 can induce suppression of human natural killer cell cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 410-416.
 125. Khonina NA, Shubinsky GZ, Lozovoy VP. Regulation of natural killer activity in normal donors and patients with chronic lympholeukemia (CLL) by T- and non-T-cell interaction. *Eksp Biol Med* 1987; 103: 321-323.
 126. Reynolds CW, Hiserodt JC. Recognition and lysis of targets by NK cells. En *Natural killer cells and host defense*, EW Ades & C Lopez (eds). S. Karger AG. Basilea. 1989, pag 164-166.
 127. Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T et al. A definition of natural killer cells. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: XIII.
 128. Müllbacher A, King NJC. Target cell lysis by natural killer cells is influenced by B2-microglobulin expression. *Scand J Immunol* 1989; 30: 21-29.
 129. Harel-Bellan A, Quillet A, Marchiol C, DeMars R, Tursz T, Fradelizi D. Natural killer susceptibility of human cells may be regulated by gens in the HLA region on chromosome 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5688-5692.
 130. Harris DT, Koren HS, Devlin RB, Jaso-Friedmann L, Evans DL. Analysis of a human natural killer cell antigen receptor. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 172-176.
 131. Kay NE, Perri RT, Immunobiology of malignant B cells and immunoregulatory cells in B-chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lab Med* 1988; 8: 163-177.
 132. Nitta T, Yagita H, Sato K, Okumura K. Involvement of CD56

- (NKH-1/leu-19 antigen) as an adhesion **molecule** in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 1989; 170: 1757-1761.
133. Schlichter L, Sidell N, Hagiwara S. Potassium channels mediate killing by human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 451-455.
 134. Uggla C, Une C, Axberg I, Jondal M, Knowles RW, Orn A. Decreased natural killer (NK) susceptibility of human NK target cells after phosphatidylinositol-specific phospholipase C treatment. *Scand J Immunol* 1989; 29: 83-89.
 135. Hercend T, Lanier LL. Heterogeneity of NK cells. En Ades EW, Lopez C - *Natural killer cells and host defense*. S. Karger AG. Basilea. 1989: 1-3.
 136. Uggla CK, Geisberg M, Jondal M, Knowles RW. Agonistic effects of anti-CD2, and anti-CD16 antibodies on human natural killer killing. *Scand J Immunol* 1989; 29: 507-515.
 137. Lanier LL, Phillips JH, Testi R. Membrane anchoring and spontaneous release of CD16 (FcRIII) by natural killer cells and granulocytes. *Eur J Immunol* 1989; 19: 775-778.
 138. Macintyre EA, Wallace DW, O'Flynn K, Abdul-Gaffar R, Tetteroo PAT. Binding of monoclonal antibody to CD16 causes calcium mobilization in large granular lymphocytes but inhibits NK killing. *Immunology* 1989; 66: 459-465.
 139. Roozmond RC, Urli DC, Jansen J, Bonavida B. Liposomes can function as targets for natural killer cytotoxic factor but not for tumor necrosis factor. *J Immunol* 1989; 142: 1209-1216.
 140. Liu Y, Müllbacker A, Waring P. Natural killer cells and cytotoxic T cells induce DNA fragmentation in both human and murine target cells in vitro. *Scand J Immunol* 1989; 30: 31-37.
 141. Lindemann A, Herrmann F, Oster W, Mertelsmann R. Lymphokine activated killer cells. *Blut* 1989; 59: 375-384.
 142. Aoki R, Usuda T, Miyakoshi H, Tamura K, Herberman R. Low NK syndrome (LNKS): clinical and immunologic features. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1987; 6: 116-128.
 143. Holmes GP, Kaplan JE, Gantz NM et al. Chronic **fatigue** syndrome: a working case definition. *Ann Intern Med* 1988; 108: 387-389.
 144. James SP, Jones EA. Abnormal natural killer **cytotoxicity** in

- primary biliary cirrhosis: evidence for a functional deficiency of cytolytic effector cells. *Gastroenterology* 1985; 89: 165-171.
145. Neighbour PA. Studies of interferon production and natural killing by lymphocytes from multiple sclerosis patients. *Ann NY Acad Sci* 1984; 436: 181-191.
146. Kastrukoff LF, Morgan NG, Aziz TM, Zecchini D, Berkowitz J, Paty DW. Natural killer (NK) cells in chronic progressive multiple sclerosis patients treated with lymphoblastoid interferon. *J Neuroimmunol* 1988; 20: 15-23.
147. Weber WE, Buurman WA, Vandermeeren MM, Medaer RH, Raus JC. Fine analysis of cytolytic and natural killer T lymphocytes in the CSF in multiple sclerosis and other neurologic diseases. *Neurology* 1987; 37: 419-425.
148. Tretin L, Zambello R, Marcer G et al. Peripheral blood NK cells in patients with extrinsic allergic alveolitis: phenotype and functions. *Sarcoidosis* 1986; 3: 47-51.
149. Plaeger-Marshall S, Spina CA, Giorgi JV et al. Alterations in cytotoxic and phenotypic subsets of natural killer cells in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J Clin Immunol* 1987; 7: 16-23.
150. Jothy S, Gilmore N, El'Gabalawy H, Prchal J. Decreased population of Leu-7+ natural killer cells in lymph nodes of homosexual men with AIDS-related persistent lymphadenopathy. *Can Med Assoc J* 1985; 132: 141-144.
151. Pierce GF, Polmar SH, Schacter BZ, Brovall C, Hornick DL, Sorensen RU. Natural cytotoxicity in immunodeficiency diseases: preservation of natural killer activity and the in vivo appearance of radioresistant killing. *Hum Immunol* 1986; 15: 85-96
A24
152. Gascon P, Zoumbos N, Young N. Analysis of natural killer cells in patients with aplastic anemia. *Blood* 1986; 67: 1349-1355.
153. Livnat S, Seigneuret M, Storb R, Prentice RL. Analysis of cytotoxic effector cell function in patients with leukemia or aplastic anemia before and after marrow transplantation. *J Immunol* 1980; 124: 481-490.
154. Gastl G, Niederwieser D, Marth C et al. Human large granular lymphocytes and their relationship to natural killer cell activity in various disease states. *Blood* 1984; 64: 288-295.

155. Froom P, Aghai E, Dobinsky JB, Quitt M, Lahat N. **Reduced natural killer activity in patients with Fanconi's anemia and in family members.** *Leuk Res* 1987; 11: 197-199.
156. Partanen S, Ruutu T, Vuopio P, Andersson LC. **Acquired pure red-cell aplasia: a consequence of increased natural killer cell activity?.** *Leuk Research* 1984; 8: 117-122.
157. Porzolt F, Heimpel H. **Impaired T-cell and NK-cell function in patients with preleukemia.** *Blut* 1982; 45: 243-248.
158. Takagi S, Kitagawa S, Takeda A, Minato N, Takaku F, Miura Y. **Natural killer-interferon system in patients with preleukaemic states.** *Br J Haematol* 1984; 58: 71-81.
159. Sorskaar D, Forre O, Lie SO. **Increased natural killer cell activity and numbers of Leu-7 and Leu-11b (CD16)-positive cells in bone marrow of children in remission from acute lymphoblastic leukaemia.** *Scand J Immunol* 1989; 29: 65-72.
160. Matera L, Giancotti FG. **Natural killer activity and low-affinity E rosettes in acute leukemias.** *Acta Haemat* 1983; 70: 158-162.
161. Dickinson AM, Proctor SJ, Jacobs E et al. **Natural killer cell activity in childhood acute lymphoblastic leukaemia in remission.** *Br J Haematol* 1985; 59: 45-53.
162. Galvani DW, Owens W, Nethersell ABW, Cawley JC. **The beneficial effects of αIFN in CGL are probably not mediated by NK cells.** *Br J Haematol* 1989; 71: 233-237.
163. Srskaar D, Forre O, Stavem P. **Natural killer cells in chronic leukemia. Function and markers.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 87: 159-164.
164. Niederwieser D, Gastl G, Rumpold H, Marth CH, Kraft D, Huber CH. **Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT).** *Br J Haematol* 1987; 65: 301-305.
165. Bowden RA, Day LM, Amos DE, Meyers JD. **Natural cytotoxic activity against cytomegalovirus-infected target cells following marrow transplantation.** *Transplantation* 1987; 44: 504-508.
166. Hercend T, Takvorian T, Nowill A et al. **Characterization of natural killer cells with antileukemia activity following**

- allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1986; 67: 722-728.
167. Delmon L, Ythier A, Moingeon P et al. Characterization of antileukemia cells' cytotoxic effector function. *Transplantation* 1986; 42: 252-255.
168. Tursz T, Dokhelar MC, Lipinski M, Amiel JL. Low natural killer cell activity in patients with malignant lymphoma. *Cancer* 1982; 50: 2333-2335.
169. Frydecka I. Natural killer cell activity during the course of disease in patients with Hodgkin's disease. *Cancer* 1985; 56: 2799-2803.
170. Levy S, Tempe JL, Aleksijevic A et al. Depressed NK cell activity of peripheral blood mononuclear cells in untreated Hodgkin's disease: Enhancing effect of interferon in vitro. *Scand J Haematol* 1984; 33: 386-390.
171. Jezewska E, Björkholm M, Giscoombe R, Holm G, Tullgren O. Surface markers and cytotoxic activity of blood natural killer cells studied at the single cell level in Hodgkin's disease. *Clin Exp Immunol* 1985; 61: 96-102.
172. Rucio LP, Procopio A, Uccini S, Marcorelli E, Baroni CD. Natural killer activity in spleens and lymph nodes from patients with Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1982; 42: 2063-2068.
173. Al Sam S, Jones DB, Payne SV, Wright DH. Natural killer (NK) activity in the spleen of patients with Hodgkin's disease and controls. *Br J Cancer* 1982; 46: 806-810.
174. Baumann MA, Milson TJ, Patrick CW, Libnoch JA, Keller RH. Correlation of circulating natural killer cell count with prognosis in large cell lymphoma. *Cancer* 1986; 57: 2309-2312.
175. Greil R, Gattringer C, Knapp W, Huber H. Growth fraction of tumor cells and infiltration density with natural killer-like (HNK1+) cells in non-Hodgkin lymphomas. *Br J Haematol* 1986; 62: 293-300.
176. Schuurman HJ, Kluin PM, de Gast GC, Kater L. HNK-1+ cells in non-Hodgkin's lymphoma: lack of relation with transferrin receptor expression on malignant cells. *Br J Cancer* 1985; 51: 171-177.
177. Oshimi K, Oshimi Y, Yamada O, Mizoguchi H. Lysis of lymphoma cells by autologous and allogeneic natural killer cells. *Blood* 1985; 65: 638-643.

178. Foa R, Lauria F, Lusso P et al. Phenotypic and functional characterization of the circulating NK compartment in hairy cell leukaemia. *Clin Exp Immunol* 1986; 64: 392-398.
179. Gastl G, Aulitzky W, Leiter E, Flener R, Huber C. Alpha-interferon induces remission in hairy cell leukemia without enhancement of natural killing. *Blut* 1986; 52: 273-279.
180. Ruce LP, Propopio A, Maccallini V et al. Severe deficiency of natural killer activity in the peripheral blood of patients with hairy cell leukemia. *Blood* 1983; 61: 1132-1137.
181. Smith BR, Rosenthal DS, Ault KA. Natural killer lymphocytes in hairy cell leukemia: presence of phenotypically identifiable cells with defective functional activity. *Exp Hematol* 1985; 13: 189-193.
182. Demeter J, Pálóczi K, Lehoczky D, Benczúr M. Hairy cell leukaemia: observations on natural killer activity in different clinical stages of the disease. *Br J Haematol* 1989; 71: 239-244.
183. Sigaux F, Chapuis F, Castaigne S, Degos L, Flandrin G, Gluckman JC. Hairy-cells are not lysed by NK cells. *Blut* 1987; 54: 319-320.
184. Griffiths SD, Cawley JC. α -Interferon and lymphokine-activated killer cells in hairy cell leukemia. *Leukemia* 1988; 2: 377-381.
185. Lahat N, Aghai E, Kotler A et al. Discordant effect of interferon on natural killer cell activity and tumor cell sensitivity to lysis in hairy cell leukemia. *Blood* 1988; 71: 1141-1143.
186. Komiyama A, Kawai H, Miyagawa Y, Akabane T. Childhood lymphoblastic leukemia with natural killer activity: establishment of the leukemia cell lines retaining the activity. *Blood* 1982; 60: 1429-1436.
187. Kaplan J, Ravindranath Y, Inoue S. T-cell acute lymphoblastic leukemia with natural killer cell phenotype. *Am J Hematol* 1986; 22: 355-364.
188. Komiyama A, Yamada S, Kawai H, Miyagawa Y, Akabane T. Childhood acute lymphoblastic leukemia with natural killer activity. Clinical and cellular features of three cases. *Cancer* 1984; 54: 1547-1553.
189. Falcao RP, Ismael SJ. Leu 7+, Leu 11a- acute T-lymphoblastic

- leukemia having low K cell activity and no NK cell activity. *Am J Hematol* 1987; 24: 101-105.
190. Bassan R, Rambaldi A, Barbui. The chronic proliferative disease of large granular lymphocytes. *Haematologica* 1989; 74: 85-94.
 191. Loughran TP, Starkebaum G. Large granular lymphocyte leukemia. Report of 38 cases and review of the literature. *Medicine* 1987; 66: 397-405.
 192. Gastl G, Rumpold H, Kraft D et al. Abnormal expansions of granular lymphocytes: reactive lymphocytosis or chronic leukemia? Case report and literature review. *Blut* 1986; 52: 73-89.
 193. Chan WC, Link S, Mawle A, Ckeck I, Bynes RK, Winton EF. Heterogeneity of large granular lymphocyte proliferations: delineation of two major subtypes. *Blood* 1986; 68: 1142-1153.
 194. Tagawa S, Tokumine Y, Ueda E et al. Leu 11+ T π cell chronic lymphocytic leukemia with partially activated natural killer function and its further activation by recombinant IL2 in vitro. *Blood* 1986; 68: 846-852.
 195. Loughran TP, Draves KE, Starkebaum G, Kidd P, Clark EA. Induction of NK activity in large granular lymphocyte leukemia: activation with anti-CD3 monoclonal antibody and interleukin 2. *Blood* 1987; 69: 72-78.
 196. Koizumi S, Seki H, Tachinami T et al. Malignant clonal expansion of large granular lymphocytes with a Leu-11+, Leu-7- surface phenotype: in vitro responsiveness of malignant cells to recombinant... *Blood* 1986; 68: 1065-1073.
 197. Fernandez LA, Pope B, Lee C, Zayed E. Aggressive natural killer cell leukemia in an adult with establishment of an NK cell line. *Blood* 1986; 67: 925-930.
 198. Imamura N, Kusunoki Y, Kajihara H, Okada K, Kuramoto A. Aggressive natural killer cell leukemia/lymphoma with N901-positive surface phenotype: evidence for the existence of a third lineage in lymphoid cells. *Acta Haemat* 1988; 80: 121-128.
 199. Bassan R, Rambaldi A, Allavena P, Abbate M, Marini B, Barbui T. Association of large granular lymphocyte/natural killer cell proliferative disease and second hematologic malignancy. *Am J Hematol* 1988; 29: 85-93.
 200. Bassan R, Pronesti M, Buzzetti M et al. Autoimmunity and B-cell

- dysfucnytion in chronic proliferative disorders of large granular lymphocytes/natural killer cells. *Cancer* 1989; 63: 90-95.
201. Shau H, Gray D, Mitchell MS. Studies on the relationship of human natural killer and lymphokine-activated killer cells with lysosomal staining and analysis of surface marker phenotypes. *Cell Immunol* 1988; 115: 13-23.
 202. Zaretskaya YM, Burkhanov RA, Dolbin AG, Metodiev KT. Factors responsible for fluctuations in human NK cell activity in vitro. *J Immunol Methods* 1983; 64: 321-326.
 203. McGinnes K, Chapman G, Marks R, Penny R. A fluorescence NK assay using flow cytometry. *J Immunol Methods* 1986; 86: 7-15.
 204. Pross HF, Maroun JA. The standardization of NK cell assays for use in studies of biological response modifiers. *J Immunol Methods* 1984; 68: 235-249.
 205. Merrill SJ, Sathananthan S. Approximate Michaelis-Menten kinetics displayed in a stochastic model of cell-mediated cytotoxicity. *Mathematical Biosciences* 1986; 80: 223-238.
 206. Bloom ET, Korn EL. Quantification of natural cytotoxicity by human lymphocyte subpopulations isolated by density: Heterogeneity of the effector cells. *J Immunol Methods* 1983; 58: 323-335.
 207. Froelich CJ, Sibbitt WL, Bankhurst AD. Enrichment of natural killer cells by negative selection: comparison to percoll gradient separation method. *J Immunol Methods* 1983; 64: 327-333.
 208. Ravnik SE, Gage S, Pollack SB. Self-generating density gradients of Percoll provide a simple and rapid method that consistently enriches natural killer cells. *J Immunol Methods* 1988; 110: 161-168.
 209. Behelak Y, Banerjee D, Richter M. Immunocompetent cells in patients with malignant disease. I The lack of naturally occurring killer cell activity in the unfractionated circulating lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cancer* 1976; 38: 2271-2277.
 210. Ziegler HW, Kay NE, Zarling JM. Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer* 1981; 27: 321-327.
 211. Thurlow PJ, McArthur G, McKenzie IFC. Investigation of T and

- natural killer cell function with monoclonal antibodies. *Transplantation* 1986; 41: 104-111.
212. Rola-Pleszczynski M, Lieu H, Sullivan AK, Girard M. Membrane markers, target cell specificity, and sensitivity to biological response modifiers distinguish human natural killer cytotoxic from human natural killer cells. *J Clin Invest* 1985; 76: 1927-1931.
213. Wahlin B, Alsheikhly A, Perlmann P, Schreiber RD, Mller-Eberhard HJ. Enumeration and characterization of human killer and natural killer cells by a modified single-cell assay. *Scand J Immunol* 1984; 19: 529-539.
214. Morishita Y, Martin PJ, Bean MA, Yamada H, Hansen JA. Antigen-specific functions of a CD4+ subset of human T lymphocytes with granular morphology. *J Immunol* 1986; 136: 2095-2102.
215. Timonen T, Ortaldo JR, Herberman RB. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 1981; 153: 569-582.
216. Lefever A, Micha S. Kinetic analysis of lymphokine-activated killer (LAK) cells: lytic parameters and determination of LAK cell frequency. *Scand J Immunol* 1989; 29: 417-426.
217. Lanier LL, Le AM, Cwirla S, Federspiel N, Phillips JH. Antigenic, functional, and molecular genetic studies of human natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes not restricted by the major histocompatibility complex. *Fed Proc* 1986; 45: 2823-2828.
218. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 4480-4486.
219. Gale RP, Foon KA. Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24: 209-229.
220. Gale RP, Foon KA. Chronic lymphocytic leukemia. Recent advances in biology and treatment. *Ann Intern Med* 1985; 103: 101-120.
221. Linet MS, Cartwright RA. Chronic lymphocytic leukemia: epidemiology and etiologic findings. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 353-357.
222. Gale RP. Current issues in chronic lymphocytic leukemia. *Nouv rev*

- Fr Hematol* 1988; 30: 263-265.
223. Bizzozero OJ, Jhonson KG, Ciocco A, et al. Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki 1946-1964. II. Observations on type-specific leukemia, survivorship, and clinical behavior. *Ann Intern Med* 1967; 66: 522-530.
224. Goguel A, Cavigneaux A, Bernard J. Les leucemies benzeniques de la region parisienne entre 1950 et 1965 (étude de 50 observations). *Nouv Rev Fr Hematol* 1967; 7: 465-480.
225. McMichael AJ, Spirtas R, Kupper LL, et al. Solvent exposure and leukemia among rubber workers: an epidemiologic study. *J Occup Med* 1975; 17: 234-239.
226. Fraumeni JF, Vogel CL, de Vita VT. Familial chronic lymphocytic leukemia. *Ann Intern Med* 1969; 71: 279-284.
227. Butturini A, Gale RP. Oncogenes in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1988; 12: 89-92.
228. Gathings WE, Kubagawa H, Cooper MD. A distinctive pattern of B cell immaturity in perinatal humans. *Immunol Rev* 1981; 57: 107-126.
229. Oscier DG, Fitchett M, Hamblin TJ. Chromosomal abnormalities in B-CLL. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 397-398.
230. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Eng J Med* 1990; 323: 720-724.
231. Han T, Sadamori N, Block AMW et al. Cytogenetic studies in chronic lymphocytic leukemia, prolymphocytic leukemia and hairy cell leukemia: a progress report. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 393-395.
232. Pittman S, Catovsky D. Prognostic significance of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1984; 58: 649-660.
233. Gahrton G, Juliusson G. Clinical implication of chromosomal aberrations in chronic B-lymphocytic leukamemia cells. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 389-392.
234. Bird ML, Ueshima Y, Rowley JD, Haren JM, Vardiman JW. Chromosome abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia and their clinical correlations. *Leukemia* 1989; 3: 182-191.

235. Geisler CH, Philip P, Hansen MM. B-cell **chronic** lymphocytic leukaemia: clonal chromosome abnormalities **and prognosis** in 89 cases. *Eur J Haematol* 1989; 43: 397-403.
236. Rai KR, Sawitsky A. Chronic lymphocytic leukemia. *Med Clin North Am* 1984; 68: 697-711.
237. Cutler SJ, Axtell L, Heise H. Ten-thousand cases of leukemia: 1940-1962. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39: 993-1026.
238. Galton DAG. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Canad Med Ass J* 1966; 94: 1005-1010.
239. Montserrat E, Viñolas N, Reverter JC, Rozman C. Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and prognosis of early clinical stages. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 359-361.
240. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* 1989; 42: 567-584.
241. Dighiero G. An attempt to explain disordered immunity and hypogammaglobulinemia in B-CLL. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 283-288.
242. Kurec AS, Davey FR. Impaired synthesis of immunoglobulin in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1987; 25: 131-142.
243. Lennert K. Linfomas con bajo grado de malignidad. En Lennert K (eds): *Linfomas no Hodgkin: clasificación de Kiel. Procesos tumorales malignos de los ganglios linfáticos, excluida la enfermedad de Hodgkin*. Barcelona. Espaxs. 1984.
244. Raphael M, Debré P, Guigui B, Binet JL. Lymph node biopsy in chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance of histopathological, morphometry and immunohistological findings. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 379-383.
245. Woessner S, Lafuente R, Florensa L. *La citología óptica en el diagnóstico hematológico*. Ediciones Medici. Barcelona. 1984.
246. Frisch B, Bartl R. Histologic classification **and staging** of chronic lymphocytic leukemia. A retrospective **and prospective** study of 503 cases. *Acta haemat* 1988; 79: 140-152.

247. Charron D, Dighiero G, Raphael M, Binet JL. **Bone marrow patterns and clinical staging in chronic lymphocytic leukaemia.** *Lancet* 1977; 2: 819.
248. Carbone A, Santoro A, Pilotti S, Rilke F. **Bone marrow patterns and clinical staging in chronic lymphocytic leukaemia.** *Lancet* 1978; 1: 606.
249. Duhamel G. *Histopathologie clinique de la moelle osseuse.* Paris. Masson et Cie. 1974.
250. Gray JL, Jacobs A, Block M. Bone marrow and peripheral blood lymphocytosis in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1974; 33: 1169-1178.
251. Rywlin AM. *Histopathology of the bone marrow.* Boston. Little Brown and company. 1976.
252. Hernández Nieto L, Rozman C. Síndromes linfoproliferativos. En Hernández Nieto L, Rozman C (eds). *Biopsia medular en la clínica hematológica.* Barcelona. Salvat. 1980.
253. Hernández Nieto L, Montserrat E, Muncunill J, Rozman C. Bone marrow patterns and clinical staging in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1977; i: 1269.
254. Lipshutz MD, Mir R, Rai KR, Sawitsky A. Bone marrow biopsy and clinical staging in chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer* 1980; 46: 1422-1427.
255. Bartl R, Frisch B, Burkhardt R, Hoffmann-Fezer G, Demmler K, Sund M. Assessment of marrow trephine in relation to staging in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1982; 51: 1-15.
256. Raphael M, Ployart F, Diebold J et al. Relecture par un groupe de pathologistes des biopsies médullaires de leucémie lymphoïde chronique. A propos de 109 cas avec analyse statistique et corrélations anatomo-cliniques. *Ann Pathol* 1983; 3: 119-126.
257. Matutes E, Worner I, Sainati L, de Oliveira MP, Catovsky D. Advances in the lymphoproliferative disorders. Review of our experience in the study of over 1000 cases. *Biol Clin Hematol* 1989; 11: 53-62.
258. Melo JV, Catovsky D, Galton DAG. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1986; 63: 377-387.
259. Foon KA, Todd RF. **Immunologic classification of leukemia and**

- lymphoma. *Blood* 1986; 68: 1-31.
260. Orfao A, Gonzalez M, San Miguel JF et al. Surface phenotype and clinical stages in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica* 1987; 72: 39-43.
261. Pianezze G, Gentilini I, Casini M, Fabris P, Coser P. Cytoplasmic immunoglobulins in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 1987; 69: 1011-1014.
262. Bardales RH, Al-Katib AM, Carrato A, Koziner B. Detection of intracytoplasmic immunoglobulin by flow cytometry in B-cell malignancies. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 83-89.
263. Merle-Beral H, Blanc C, Chastang C, Debre P. Phenotypic heterogeneity of B- and T-cell differentiation antigens in B-CLL. *Eur J Haematol* 1988; 41: 197-203.
264. Royston I, Madja JA, Baird SM, Meserve BL, Griffiths JC. Huan T-cell antigens defined by monoclonal antibodies: the 65000 dalton antigen of T cell (T 65) is also found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulin. *J Immunol* 1980; 125: 725-731.
265. Freedman AS, Nadler LM. B cell development in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24: 230-239.
266. Freedman AS, Boyd AW, Bieber FR et al. Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1987; 70: 418-427.
267. Merle-Beral H, Boumsell L, Michel A, Debré P. CD1 expression on B-CLL lymphocytes. *Br J Haematol* 1989; 71: 209-212.
268. Haegert DG, Smith JL. Co-expression of T3 and surface immunoglobulin in neoplasms of 'early' B cells: a report of 2 cases. *Eur J Haematol* 1987; 38: 213-219.
269. Cafaro A, Napolitano M, Zoli V et al. Phenotype of chronic lymphocytic leukemia (CLL) B-cells. *Blut* 1987; 54: 43-47.
270. Riva M, Schena M, Bergui L, Tesio L, Gaidano G, Marchisio P, et al. Comparative analysis of normal and malignant CD5+ B lymphocytes. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 289-291.
271. Shaw RK, Szwed C, Boggs DR et al. Infection and immunity in chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Intern Med* 1980; 106: 467-478.

272. Kay NE, Johnson JD, Stanek B, Douglas SD. T-cell subpopulations in chronic lymphocytic leukemia: abnormalities in distribution and in vitro receptor maturation. *Blood* 1979; 54: 540-544.
273. Vuillier F, Tortevoeye P, Binet JL, Dighiero G. CD4, CD8 and NK subsets in B-CLL. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 331-334.
274. Hautekeete ML, De Bock RF, Van Bockstaele DR, Colpin GC, Berneman ZN, Peetermans ME. Flow cytometric analysis of T-lymphocyte subpopulations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with clinical stage. *Blut* 1987; 55: 447-452.
275. Terstappen LWM, Grooth BG, van Berkel W, ten Napel CHH, Greve J. Abnormal distribution of CD8 subpopulations in B-chronic lymphocytic leukemia identified by flow cytometry. *Leuk Res* 1988; 12: 551-557.
276. Briggs PG, Kraft N, Atkins RC. T cells and CD45R expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1990; 14: 155-159.
277. Inoshita T, Whiteside TL. Imbalance of T-cell subpopulations does not result in defective helper function in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1981; 48: 1754-1760.
278. Chiorazzi N, Fu SM, Montazeki G, Hunket HG, Rai K, Gee T. T-cell helper defect in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 1979; 122: 1087-1090.
279. Foa R, Lauria F, Catovsky D, Galton DAG. Reduced T-colony forming capacity in B-chronic lymphocytic leukemia -II. Correlation with clinical stage and findings in B-prolymphocytoid leukemia. *Leuk Res* 1982; 6: 329-333.
280. Lauria F, Foa R, Mantovani V, Fiero MT, Catovsky D, Tura S. T-cell functional abnormality in B-chronic lymphocytic leukemia: evidence of a defect of the T-helper subset. *Br J Haematol* 1983; 54: 277-283.
281. Kunicka JE, Platsoucas CD. Defective helper function of purified T4 cells and excessive suppressor activity of purified T8 cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. T4 suppressor effector cells are present in certain patients. *Blood* 1988; 71: 1551-1560.
282. Bloem AC, Clevers JC, Bast EJEG, Ballieux RE. T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia-1. Decreased frequency of T lymphocytes secreting suppressor factor. *Clin Exp Immunol* 1986; 63: 188-193.

283. Kay NE. Abnormal T-cell subpopulation function in CLL: excessive suppressor (CD4) and deficient helper (CD4) activity with respect to B-cell proliferations. *Blood* 1981; 57: 418-420.
284. Sieber G, Herrmann F. Increased suppressor- and normal helper Tcell activity in patients with B-cell chronic lymphatic leukemia (B-cell). *Br J Haematol* 1983; 55: 561- 563.
285. Urbano-Ispizua A, Montserrat E, Martí A, Feliu E, Vives-Corrons JL, Rozman C. Immunohistochemical study of bone marrow sections in CLL. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 325-326.
286. Hijmans W, Schuit HRE, Hulsing-Hersselink E. An immunofluorescence study on intracellular immunoglobulins in humans bone marrow cells. *Ann NY Acad Sci* 1971; 177: 290-305.
287. De Rossi G, Granati L, Girelli G et al. Incidence and prognostic significance of autoantibodies against erythrocytes and platelets in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 403-406.
288. Chapel HM, Bunch C. Mechanisms of infection in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24; 291-296.
289. Siber GR, Schur PH, Aisenberg AC et al. Correlation between serum IgG2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med* 1980; 303: 178-182.
290. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. *Br J Haematol* 1989; 72: 141-149.
291. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-234.
292. Binet JL, Catovsky D, Chandra P et al. Chronic lymphocytic leukaemia: proposals for revised prognostic staging system. *Br J Haematol* 1981; 48: 365-367.
293. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.
294. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Comparison of the (A,B,C) staging and the Rai's staging from a

- large prospective series (935 patients). *Nouv Rev Fr hematol* 1988; 30: 363-367.
295. Foon KA, Gale RP. Staging and therapy of **chronic** lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24: 264-274.
296. Rundles RW, Moore JO. Chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1978; 42: 941-945.
297. Jaksic B, Vitale B. Total tumor mass score (TTM): a new parameter in chronic lymphocytic leukaemia. *J Haematol* 1981; 49: 405-413.
298. Mandelli F, DeRossi G, Mancini P et al. Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from the GIMEMA group. *J Clin Oncol* 1987; 5: 398-406.
299. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM et al. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood* 1987; 69: 929-936.
300. Phillips EA, Kempin S, Passe S et al. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia and their implications for therapy. *Clin Haematol* 1977; 6: 203-222.
301. Rozman C, Montserrat E, Feliu E et al. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 150 cases. *Blood* 1982; 59: 1001-1005.
302. Baccarini M, Cabol M, Gobbi M, Lauria F, Tura S. Staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1982; 59: 1191-1196.
303. Molica S, Alberti A. Investigation of nuclear clefts as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1988; 41: 62-65.
304. Scott CS, Stark AN, Head C, Roberts BE. Diagnostic features and survival in typical and prolymphocytoid variants of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* 1989; 7: 175-179.
305. Melo JV, Catovsky D, Gregory WM, Galton DAG. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features. *Br J Haematol* 1987; 65: 23-29.
306. Rozman C, Montserrat E. Bone marrow biopsy in **chronic** lymphocytic leukaemia. *Hematol Reviews* 1989; 3: 121- 129

00931

307. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM et al. Bone marrow histological pattern - the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 1984; 64: 642-648.
308. Han T, Barcos M, Enrich L et al. Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic studies in 20 patients. *Blood* 1984; 2: 562-570.
309. Rai KR, Montserrat E. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24: 252-256.
310. Orfao A, Gonzalez M, San Miguel J et al. Bone marrow histopathologic patterns and immunologic phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Blut* 1988; 57: 19-23.
311. Rozman C, Montserrat E. Bone marrow biopsy in chronic lymphocytic leukaemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 369-371.
312. Pangalis GA, Boussiatis VA, Kittas C. B-chronic lymphocytic leukemia. Disease progression in 150 untreated stage A and B patients as predicted by bone marrow pattern. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 373-375.
313. Raphael M, Chastang C, Binet JL. Is a bone marrow biopsy a prognostic parameter in B-CLL?. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 377-378.
314. Desablens B, Claisse JF, Piprot-Choffat, Gontier MF. Prognostic value of bone marrow biopsy in chronic lymphoid leukemia. *Nouv Rev Hematol* 1989; 31: 179-182.
315. Montserrat E, Sánchez-Bisonó J, Viñolas N, Rozman C. Lymphocytic doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *J Haematol* 1986; 62: 567-575.
316. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60: 2712-2716.
317. Kimby E, Mellstedt H, Nilsson B et al. Blood lymphocyte characteristics as predictors of prognosis in chronic lymphocytic leukemia of B-cell type. *Hematol Oncol* 1988; 6: 47-55.
318. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Prognostic and therapeutic advances in CLL management: The experience of the French Cooperative group. *Semin Hematol* 1987;

- 24: 275-290.
319. Anderson KA, Boyd AW, Fisher DC, Schlossman SF, Nadler LM. Hairy cell leukemia: a tumor of pre-plasma cells. *Blood* 1985; 35: 92-102.
320. Baldini L, Mozzana R, Cortelezzi A et al. Prognostic significance of immunoglobulin phenotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1985; 65: 340-344.
321. Geisler C, Larsen JK, Andersen E et al. The CLL2 study: preliminary results of flow cytometry immunophenotyping in the first 500 patients. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 335-337.
322. Hamblin JL, Oscier DG, Stevens JR, Smith JL. Long survival in B-CLL correlates with surface IgM kappa phenotype. *Br J Haematol* 1987; 66: 21-26.
323. Han T, Ozer H, Gavigan M et al. Bening monoclonal B cell lymphocytosis, a bening variant of CLL: clinical, immunologic, phenotypic and cytogenetic studies in 20 patients. *Blood* 1984; 64: 244-252.
324. Bassan R, Pronesti M, Buzzetti M et al. Surface immunoglobulin intensity and p67 (CD5) antigen expression define different forms of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica* 1987; 72: 221-225.
325. Dadmarz R, Cawley JC. Heterogeneity of CLL: high CD23 antigen and αIFN receptor expression are features of favourable disease and of cell activation. *Br J Haematol* 1988; 68: 279-282.
326. Tötterman TH, Carlsson M, Funderud S, Simonsson B, Öberg G, Nilsson K. Chronic B-lymphocytic leukemia - Expression of B cell activation markers in relation to activity of the disease. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 279-281.
327. Faguet GB. Common chronic lymphatic leukemia antigen (cCLLa); distribution, fate and clinical applications. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 305-310.
328. Kimby E, Mellstedt H, Björkholm M, Holm G. Clonal cell surface structures related to differentiation, activation and homing in B-cell chronic lymphocytic leukemia and monoclonal lymphocytosis of undetermined significance. *Eur J Haematol* 1989; 43: 452-459. 00978
329. Apostolopoulos A, Symeonidis A, Zoumbos N. Prognostic

- significance of immune function parameters in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Haematol* 1990; 44: 39-44.
330. Davey FR, Kurec AS, Tomar RH, Smith JR. Serum immunoglobulins and lymphocyte subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 60-65.
331. Rozman C, Montserrat E, Viñolas N. Serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. Natural history and prognostic significance. *Cancer* 1988; 61: 279-283.
332. Semenzato G, Foa R, Agostini C et al. High serum levels of soluble interleukin 2 receptor in patients with B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1987; 70: 396-400.
333. Han T, Henderson ES, Emrich LJ, Sandberg AA. Prognostic significance of karyotypic abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia: an update. *Semin Hematol* 1987; 24: 257-263.
334. Montserrat E, Alcalá A, Parody R et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia in advanced stages. A randomized trial comparing chlorambucil plus prednisone versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone. *Cancer* 1985; 56: 2369-2675.
335. Burghouts J, Prüts E, Van Lier HJJ. Response to therapy as prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1980; 63: 217-221.
336. Papaphilis AD, Kamper EF, Kattamis C, Pangalis GA. Activity of ribonuclease H in cells of chronic B-lymphocytic leukaemia: correlation with clinical stage. *Br J Haematol* 1988; 70: 301-306.
337. Shiu W, Schor S, Chang J, Crowther D. Migration of leukaemic lymphocytes (chronic lymphocytic leukaemia) through a 3-D collagen gel: a possible prognostic factor. *Eur J Haematol* 1987; 38: 117-122.
338. Vives Corrons JL, Rozman C, Pujades MA et al. Combined assay of adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase, and lactate dehydrogenase in the early clinical evaluation of B-chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1988; 27: 157-162. 00644
339. Han T, Fitzpatrick J, Bhargava A. Serum lactate dehydrogenase in chronic lymphocytic leukemia (Abstract). *Clin Chem* 1983; 2: 1215-1216.
340. Knospe WH, Gregory SA, Trobaugh FE, Stedronsky JA, Scheek R. Chronic lymphocytic leukemia: correlation of clinical course and

- therapeutic response with in vitro testing and morphology of lymphocytes. *Am J Hematol* 1977; 2: 73-101.
341. Moayeri H, Sokai JE. In vitro leukocyte thymidine uptake and prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Med* 1979; 66: 773-778.
342. Simonsson B, Nilsson K. ³H-thymidine uptake in chronic lymphocytic leukemia cells. *Scan J Haematol* 1980; 24: 160-173.
343. Källander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1984; 54: 2450-2455.
344. Juliusson G, Robèrt K-H, Nilsson B, Gahrton G. Prognostic value of B-cell mitogen-induced and spontaneous thymidine uptake in vitro in chronic B-lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 1985; 65: 429-436.
345. Fourth International Workshop on CLL. Meeting Report. *Leuk Res* 1989; 13: 505-510.
346. Rozman C, Montserrat E. Critical factors in new therapeutic approaches in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 453-455.
347. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia: When and how to treat. *Blut* 1989; 59: 467-474.
348. Jaksic B, Brugiattelli M. High dose continuous chlorambucil vs intermittent chlorambucil plus prednisone for the treatment of B-CLL - IGCI CLL-01 trial. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 437-442.
349. Rozman C, Montserrat E. Advances in therapy of chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologia* 1988; 21: 17-23.
350. Shustik C, Mick R, Silver R, Sawitsky A, Rai K, Shapiro L. Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol* 1988; 6: 7-12.
351. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Therapy of chronic lymphocytic leukemia patients. Results from the French cooperative trials. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 443-448.
352. Montserrat E, Alcalá A, Alonso C et al. A randomized trial comparing chlorambucil plus prednisone vs cyclophosphamide, melphalan, and prednisone in the treatment of chronic lymphocytic leukemia stages B and C. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 429-432.

353. Hansen MM, Andersen E, Christensen BE et al. CHOP versus prednisolone + chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia (CLL): preliminary results of a randomized multicenter study. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30:433- 00698
354. French Cooperative group on Chronic Lymphocytic Leukemia. CHOP regimen versus intermittent chlorambucil-prednisone in stage B chronic lymphocytic leukemia. Short term results from a randomized clinical trial. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 449-452.
355. Valesquez WS, McLaughlin P, Swan F et al. Dexametasone, high dose ara-C and cisplatin (DHAP). Combination for progressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1986; (suppl 1) 68: 234 A (abstract).
356. French Cooperative group on Chronic Lymphocytic Leukaemia. Long-term results of the CHOP regimen in stage C chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1989; 73: 334 - 340.
357. Johnson RE. Total body irradiation of chronic lymphocytic leukemia: relationship between therapeutic response and prognosis. *Cancer* 1976; 37: 2691-2696.
358. Delpero JR, Gastaut JA, Letreut YP, Caamano A, Mathieu-Tubiana N, Maraninchi D. The value of splenectomy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 59: 340-345.
359. Bunch C. Immunoglobulin replacement in chronic lymphocytic leukaemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 419-422.
360. Dillman RO, Shawler DL, Sobol RE et al. Murine monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1982; 59: 1036-1045.
361. Foon KA, Schroff RW, Bunn RA et al. Effects of monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1984; 64: 1085-1093.
362. Foon KA, Bottino GC, Abrams PG et al. Phase II trial of recombinant leukocyte A interferon in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Am J Med* 1985; 78: 216-220.
363. Pangalis GA, Griva E. Recombinant alfa-2b-interferon therapy in untreated, stages A and B chronic lymphocytic leukemia. A preliminary report. *Cancer* 1988; 61: 869-872.
364. Rozman C, Montserrat E, Viñolas N, Urbano-Ispizua A, Ribera JM,

- Gallart T, Compornolle C. Recombinant $\alpha 2$ -Interferon in the treatment of B chronic lymphocytic leukemia in early stages. *Blood* 1988; 71: 1295-1298.
365. Molica S, Alberti A. Recombinant alpha-2a interferon in treatment of B-chronic lymphocytic leukemia. A preliminary report with emphasis on previously untreated patients in early stage of disease. *Haematologica* 1990; 75: 75-78.
366. Talpaz M, Roseblum M, Kurzrock R, Reuben J, Kantarjian H, Gutterman J. Clinical and laboratory changes induced by alpha interferon in chronic lymphocytic leukemia - A pilot study. *Am J Hematol* 1987; 24: 341-350.
367. Ziegler-Heitbrock HWL, Schlag R, Thiel E. Favorable response of early stage B CLL patients to treatment with IFN- $\alpha 2$. *Blood* 1989; 73: 1426-1430.
368. O'Connell MJ, Colgan JP, Oken MM, Ritts RE, Kay NE, Itri LM. Clinical trial of recombinant leukocyte A interferon as initial therapy for favorable histology non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. An Eastern Cooperative Oncology Group pilot study. *J Clin Oncol* 1986; 2 :128-136.
369. Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, Redman J, McCredie KB. Fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 461-466.
370. Grever M. Fludarabine therapy of chronic lymphocytic leukemia. En Gale RP, Rai K - *Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Advances, Future directions*. New York, Liss 1988.
371. Cheson BD, Bennett JM, Rai KR et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-Sponsored Working Group. *Am J Hematol* 1988; 29: 152-163.
372. Chronic Lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. International Workshop on chronic lymphocytic leukemia. *Ann Int Med* 1989; 110: 236-238.
373. Platsoucas CD, Fernandes G, Gupta SL et al. Defective spontaneous and antibody-dependent cytotoxicity mediated by E-rosette-positive and E-rosette-negative cells in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: augmentation by *in vitro* treatment with interferon. *J Immunol* 1980; 125: 1216-1223
00523

374. Pattengale PK, Gidlund M, Nilsson K et al. Lysis of fresh human B-lymphocyte-derived leukemia cells by interferon-activated natural killer (NK) cells. *Int J cancer* 1982; 29: 1-7.
375. Foa R, Lauria F, Lusso P et al. Discrepancy between phenotypic and functional features of natural killer T-lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1984; 58: 509-516.
376. Kay NE, Zarling JM. Impaired natural killer activity in patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with a deficiency of azurophilic cytoplasmic granules in putative NK cells. *Blood* 1984; 63: 305-309.
377. Alvarez de Mon M, Casas J, Laguna R, Toribio ML, Landázuri MO, Durántez A. Lymphokine induction of NK-like cytotoxicity in T cells from B-CLL. *Blood* 1986; 67: 228-232.
378. Kay NE, Zarling J. Restoration of impaired natural killer cell activity of B-chronic lymphocytic leukemia patients by recombinant interleukin-2. *Am J Hemat* 1987; 24: 161-167.
379. Khonina NA, Shubinskii GZ. Natural killer cells lysing the blood B-lymphocytes of patients with chronic lympholeukemia. *Eksp Onkol* 1988; 10: 44-46.
380. Velardi A, Prchal JT, Prasthofer EF, Grossi CE. Expression of NK-lineage markers on peripheral blood lymphocytes with T-helper (Leu 3+/T4+) phenotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1985; 65: 149-155.
381. Foa R, Fierro MT, Lusso P et al. Reduced natural killer T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia identified by three monoclonal antibodies: Leu-11, A10, AB8.28. *Br J Haematol* 1986; 62: 151-154.
382. Kimby E, Mellstedt H, Nilsson B, Björkholm, Holm G. Differences in blood T and NK cell populations between chronic lymphocytic leukemia of B cell type (B-CLL) and monoclonal B-lymphocytosis of undetermined significance (B-MLUS). *Leukemia* 1989; 3:501-504. 00967
383. Kay NE, Perri RT. Natural killer function in B-chronic lymphocytic leukemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30:343-345.
384. Burton JD, Weitz CH, Kay NE. Malignant chronic lymphocytic leukemia B cells elaborate soluble factors that down-regulated T cell and NK function. *Am J Hematol* 1989; 30: 61-67.

385. Spitz DL, Zucker-Franklin D, Nabi ZF. Unmasking of cryptic natural killer (NK) cell recognition sites on chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *Am J Hematol* 1988; 28: 155-161.
386. Manusow D, Weinerman BH. Subsequent neoplasia in chronic lymphocytic leukemia. *JAMA* 1975; 232: 267-269.
387. Davis JW, Weiss NS, Armstrong BK. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JNCI* 1987; 78: 91-94.
388. Vives JL, Aguilar JL. Técnicas de laboratorio en hematología. Salvat Editores. Barcelona. 1987.
389. Garavoy MR, Carpenter CB. Citotoxicidad mediada por linfocitos. En "El laboratorio en inmunología clínica", NR Rose & H Friedman. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1984 (340-347).
390. Johnson GD. Immunofluorescence. En Catty D - *Antibodies. Volume II*. Oxford University Press. 1989: 179-200.
391. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. Alan R. Liss, Inc. New York. 1988.
392. Hackett J, Tutt M, Lipscomb M, Bennett M, Koo G, Kumar V. Origin and differentiation of natural killer cells. II. Functional and morphological studies of purified NK-1.1+ cells. *J Immunol* 1986; 136: 3124-3131.
393. Armitage P. *Statistical methods in clinical research*. Oxford 1971. Scientific Publishers.
394. Cox DR. Regression models and life-tables. *J Royal Statistical Society* 1972 (series B); 34: 187-220.
395. Cox DR. *Analysis of binary data*. London 1970. Methuen & Co.
396. Dixon WJ ed. *BMDP (Biomedical Package) statistical software*. Berkeley CA 1983. University of California Press.
397. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation for incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 54: 457-481.
398. Lee ET. *Statistical methods for survival data analysis*. Belmont CA 1981. Lifetime Learning Publications.
399. Peto R, Pike MC. Conservation of the approximation $\sum(O-E)^2/E$ in the logrank test for survival data on tumor incidence data. *Biometrics* 1973; 29: 579-584.

400. Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient: Analysis and examples. *Br J Cancer* 1977; 35: 1-39.
401. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry*. San Francisco CA 1969. Freeman WH.
402. International Committee for Standardization in Haematology (ICSH). Protocol for evaluation of automated blood cell counters. *Clin Lab Haemat* 1984; 6: 69-84.
403. Pross HF, Baines MG, Rubin P, Schragge P, Patterson MS. Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity. *J Clin Immunol* 1981; 1: 51-63.

