

NKCELPRO: Programa para microordenador aplicable al estudio de respuestas de citotoxicidad espontánea*

A. Portolés** y E. Márquez***

Centro de Investigaciones Biológicas
U.E.I. de Inmunofarmacología
C.S.I.C
Velázquez, 144. Madrid (España)

(Recibido el 11 de mayo de 1987)

A. PORTOLES and E. MARQUEZ. *NKCELPRO: Microcomputer Program with Application to the study of Spontaneous Cytotoxicity Response*. Rev. esp. Fisiol., 43 (4), 503-514, 1987.

A microcomputer program (NKCELPRO) which expedites the exact quantification of various parameters referring to NK cell activities is described. The program is written in BASIC language and computes the activities of cell-mediated cytotoxicity by collating and reducing radioactive count data obtained from ^{51}Cr releasing assays. The information generated by this program includes statistics such as the average values, fitting by last square regression line with its correlation coefficient, as well as determination of the percent specific lysis and lytic units/ 10^7 effector cells according to any reference value previously defined by the operator. Special program features allow for a certain flexibility in the experimental protocol design as well as in the graphic expression of the results. Data storage on a disk with filing purposes for subsequent studies is also available.

Key words: BASIC program, Cytotoxicity, NK cells.

La disponibilidad de microordenadores de costo reducido empezó a facilitar el desarrollo de programas especializados para acopio de datos y análisis de resultados en Biomedicina (12, 13). Así, unidades de investigación con posibilidades limitadas para utilización de ordenadores, pueden establecer sus propios sistemas de procesado e interpretación de datos, sin

tener que confiarlos a departamentos con ordenador central de mayor capacidad (4, 19) en los que, por otra parte, tampoco se está exento de errores (6).

En inmunobiología, donde interpretaciones matemáticas de algunos fenómenos han permitido avanzar en el conocimiento de la respuesta del huésped e incluso encontrar modelos probabilísticos relativos al empleo de inmunofármacos (12), se hace más necesario cada día disponer de recursos de programación, que asistidos por un ordenador, faciliten el manejo sin errores del gran número de datos y operaciones que conllevan los escrutinios inmunofarmacológicos. En este campo, es

* Investigación subvencionada por la CAICYT y Laboratorios Normon, S. A. (Proyecto Coordinado 541A/86.)

** A quien debe dirigirse la correspondencia.

*** Becario del C.S.I.C. adscrito al Proyecto 541A/86.

frecuente el interés particular despertado por algunas formulaciones matemáticas en relación con las respuestas citotóxicas (9) y el funcionamiento de células NK (19); posiblemente a causa de su intervención en los fenómenos de vigilancia inmunológica, que controlan la destrucción de tumores y de distintas células germinales hematopoyéticas (7). De aquí que la heterogeneidad funcional de las células NK, que no están restringidas por el sistema de histocompatibilidad (2), se exprese fundamentalmente a dos niveles de selectividad, ya sea inhibiendo metástasis tumorales (11, 17) o bien controlando ciertas infecciones víricas (20).

Se presenta un programa para microordenador que se adapta al estudio analítico de los resultados obtenidos en ensayos de citotoxicidad de células NK. Mediante este procedimiento se capacita al usuario para procesar la información relativa a los niveles de Cr^{51} liberado en la lisis de células diana y calcular, automáticamente, tanto los porcentajes de lisis como las unidades líticas correspondientes a una determinada respuesta efectora. En cada caso, se consideran distintos parámetros, expresando gráficamente las rectas de regresión para cada muestra (ajustándolas por mínimos cuadrados) y calculando también sus coeficientes de correlación, lo que permite formarse una idea exacta de la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Materialy Métodos

Ensayo biológico. — La determinación *in vitro* de respuestas citotóxicas naturales, mediadas por células, se basa en la técnica descrita por BRUNNER *et al.* (3). Para ello, se incuban durante 4 h, a 37° C y en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , volúmenes iguales (100 μl) de las suspensiones de células efectoras (E) y células diana (D). Estas últimas han de ser marcadas previamente, con 100 μCi de Cr^{51} por tratamientos con $\text{Na}_2 \text{Cr}^{51}\text{O}_4$

(Amersham, Netherland) durante 1 h a 37° C. Las células diana se ajustan a una concentración $\approx 10^5$ células/ml en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino (Flow Lab) y, al establecer los cultivos mixtos, se varían las concentraciones de las células efectoras hasta conseguir distintas relaciones E:D (usualmente 200/1; 100/1; 50/1 y 25/1). El ensayo se realiza sobre placas de microtitulación con 96 pocillos de fondo redondo (Costar, Cambridge, Ma) y utilizando pipetas automáticas multicanal (Titertek, Flow Lab, Finland). Después de las 4 h de contacto a 37° C en atmósfera de CO_2 , se determina el grado de celulolisis midiendo la radiactividad del Cr^{51} liberado en alícuotas de 100 μl , obtenidas del sobrenadante separado de los cultivos. Para determinar la radiactividad (cpm) se utiliza un espectrómetro de centelleo (Beckman Gamma-5.500, Irvine, Ca).

Por otra parte, también hay que determinar el máximo de radiación liberada (MRL), incubando las células diana con 15% de saponina (Merck, RFA) que, normalmente, libera el 95-100% de radiactividad; la liberación espontánea (SR), utilizando como efectoras las propias células diana sin marcar con Cr^{51} que, usualmente, liberan menos del 20%; y el índice máximo de radiación que existe en el sistema experimental utilizado (MRI).

Además de los ensayos *in vitro*, pueden realizarse, de la misma manera, experimentos *ex vivo*, utilizando como efectoras células de animales sometidos previamente a distintos tratamientos. En ocasiones, cuando se trata de pocos ensayos o con inmunomodificadores de origen natural no totalmente purificados, las determinaciones de citotoxicidad natural pueden realizarse sobre placas de Petri ensayando volúmenes totales de 1 ml, en lugar de los 200 μl utilizados en las placas de 96 pocillos.

Descripción del Programa. — El programa se ha confeccionado para un mi-

croordenador Amstrad modelo CPC-6128, equipado con 128 K de memoria RAM y 48 K de memoria ROM, un monitor RGB de 12" con 25 líneas y un terminal de impresora (80 caracteres/línea) marca Seikosa, mod. SP-1000A. Está escrito en lenguaje BASIC, estableciendo un paquete integrado de tres programas, de forma que se puedan almacenar los datos relativos a los niveles de Cr⁵¹ liberado en las distintas relaciones E:D y en los controles (MRL, SR y MRI), calculando las cifras de los valores medios y su desviación estándar, así como los porcentajes de celulolisis específica (NK-cel. 1); analizar los datos obtenidos para cada muestra, mediante curvas de regresión por mínimos cuadrados y sus índices de correlación, para determinar la ecuación de la recta en cada caso y después, gráficamente, calcular y expresar las unidades líticas que corresponden a cualquier porcentaje de lisis que se desee utilizar como referencia, además de dar opción a archivar los diferentes datos (NK-cel. 2); y por último, consulta de experimentos previamente archivados, presentando los datos en pantallas sucesivas con opción a ser registradas en la impresora (NK-cel. 3). Los resultados de cada relación E:D, correspondientes a las distintas muestras, son matemáticamente procesados para determinar los valores de medias (\bar{x}) y desviaciones estándar según la fórmula (A):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{(n-1)}} \quad (A)$$

Estos datos permiten determinar los distintos porcentajes de lisis para cada relación E:D y muestra, según la fórmula (B):

$$\% \text{ lisis} = \frac{\bar{x} \text{ cpm en efectoras} - \bar{x} \text{ cpm en SR}}{\bar{x} \text{ spm en MRL} - \bar{x} \text{ de SR}} \times 100 \quad (B)$$

A partir del diagrama de dispersión correspondiente a las variables estadísticas multidimensionales de toda la nube de puntos obtenida, se calculan las *rectas de regresión* para las distintas muestras y sus respectivos *coeficientes de correlación*. Esto dará una idea de la dependencia funcional que puede existir entre los dos tipos de variables que se consideran en el análisis matemático como son el porcentaje de lisis y la relación E:D.

Mediante un método matemático previamente descrito (8), en el que se tienen en cuenta los momentos de distribución de los distintos datos respecto al origen de coordenadas, se relacionan los valores medios de abscisas ($m_1 = \bar{x}$) y ordenadas ($m_2 = \bar{y}$) con las desviaciones típicas correspondientes según las fórmulas que se indican (C):

$$\begin{aligned} \delta_1 &= \sqrt{\frac{\sum x^2}{n} - (\bar{x})^2} \\ \delta_2 &= \sqrt{\frac{\sum y^2}{n} - (\bar{y})^2} \end{aligned} \quad (C)$$

Aplicando estos valores a la solución del problema de *regresión mínimo cuadrática* y partiendo de la ecuación general de la recta ($y = ax + b$) se calculan los valores de la pendiente (a) y del término independiente (b), que representan a una recta en la que es mínimo el valor medio del cuadrado de la distancia. En estas condiciones la recta de regresión vendrá expresada por la fórmula (D):

$$y = ax + b = \frac{c\delta_2}{\delta_1} x + m_2 - \frac{c\delta_2}{\delta_1} m_1 \quad (D)$$

En esta fórmula se establece la correlación (c) en la dirección del eje OY para la

recta de regresión de Y sobre X en la que $a = C \cdot \delta_2 / \delta_1$. Al medir las distancias en la dirección del eje OX, utilizando un razonamiento análogo, se encontraría que la recta de regresión de X sobre Y viene dada por $a' = C \cdot \delta_1 / \delta_2$. En ambos casos, siempre es $b = m_2 - a \cdot m_1 = m_2 - (C \cdot \delta_2 / \delta_1) m_1$. Utilizando estos valores, con relación a una recta cualquiera, al hacer mínimo el valor medio de la distancia ortogonal se obtiene la *recta de regresión ortogonal*.

Por último, en el programa también se calculan automáticamente las unidades líticas (UL) que corresponden a cualquier porcentaje de lisis que se elija como referencia. Partiendo de la ecuación $y = a \cdot x + b$, calculada por ajuste de mínimos cuadrados para cada muestra, al sustituir los valores correspondientes resulta que y representa valores de E:D mientras que x indica los porcentajes de lisis, que pueden ser variados a voluntad del operador. De este modo, una vez obtenido el parámetro E:D, que corresponde a una muestra dada y para unas determinadas condiciones, se aplica la fórmula (E):

$$UL = \frac{1}{E:D} \times \frac{10^7 \text{ cel.}}{5.000} \quad (E)$$

En la fig. 1 se presenta el diagrama de flujo para el programa NKCELPRO, dando una idea de las distintas operaciones a realizar. Estas se inician con la carga, por el ordenador, de una rutina en código máquina para el manejo del banco de memoria desde el BASIC, para la fase de NK-cel.1. Sin embargo, para NK-cel.2 y NK-cel.3 la rutina se aplica al volcado de pantallas. Así, en un principio, se definen las variables de impresión, las características de las muestras y el código de reconocimiento, al mismo tiempo que se seleccionan los formatos de las muestras, dando opción a corregir errores y a realizar la correspondiente copia impresa en cada caso.

En las siguientes fases se van incluyendo los resultados experimentales de citolisis (cpm) en muestras y controles. El programa, al operar, da oportunidad de revisar los datos introducidos y corregir cualquier error durante la introducción de los mismos. A partir de estos recuentos se calculan las medias y desviaciones correspondientes a cada ensayo, se almacenan los datos, y después, en un estudio adicional, se calculan también los porcentajes de lisis y se ajusta por mínimos cuadrados de los datos obtenidos para cada muestra. Finalmente, a partir de un porcentaje de lisis, variable a voluntad del operador, se calculan las relaciones E:D y las UL en cada caso. Si se desea, los distintos informes y gráficos resultantes en pantalla pueden ser grabados en el terminal de impresora para su posterior archivado.

Resultados

Aplicación a datos experimentales. — De las distintas situaciones experimentales estudiadas, durante la aplicación de un programa, se han seleccionado tres tipos de ejemplos, que resultan suficientemente demostrativos según que las variaciones estén condicionadas por la naturaleza de células diana (15); por la estirpe murina, origen de las células efectoras (18); y por el empleo de distintos fármacos inmunomoduladores (1, 16). Los resultados inicialmente obtenidos, y sobre los que se aplica el programa, quedan resumidos en la tabla I. No se requiere un número determinado de datos, siempre que sean más de 2 y menos de 11; debiendo pulsar una f al terminar la entrada de datos correspondientes a cada columna; con ello, el análisis de resultados puede empezar sin ninguna selección o tratamiento preliminar.

Al iniciar el programa, una vez insertado el disco llamando a NK-cel.1, en el formato de la primera pantalla se incluyen

Tabla I. Resumen de datos, en los tres ejemplos de aplicación del programa informatizado NKCELPRO.

Ejemplo 1: Según diferencias de sensibilidad en células diana.					Ejemplo 2: Según diferencias de raza de los ratones usados.					Ejemplo 3: Según el efecto del inmunomodificador (b) aplicado.				
Grupos exper.	cpm para distintas E:D				Grupos exper.	cpm para distintas E:D				Grupos exper.	cpm para distintas E:D			
	200:1	100:1	50:1	25:1		200:1	100:1	50:1	25:1		200:1	100:1	50:1	25:1
K562	137	132	124	110	SWISS	329	263	253	230	PBS control	472	423	390	270
	135	130	126	120		332	316	261	224		475	420	360	280
	138	128	124	122		327	277	272	228		470	410	350	298
	137	131	127	121		319	318	275	249	CLNA	405	310	265	210
	139	128	125	118		318	312	289	—		402	318	258	205
CCRF-CEM	229	161	118	100	BALB/c	345	323	—	—	410	306	240	208	
	230	182	120	107		440	300	170	210	FXBA	431	380	310	224
	222	208	126	104		470	210	390	290		445	368	308	230
	231	159	122	100	480	410	310	250	422		375	298	218	
	228	160	119	111	C3H	170	180	140	—	IPTL	456	410	322	260
—	151	108	106	180		140	140	—	458		406	318	278	
P 815	210	136	112	106	190	210	160	—	460	418	306	283		
	238	132	118	109	130	230	—	—	PPNL	459	420	318	227	
	240	140	120	110						463	426	305	243	
	216	132	131	114						468	432	312	236	
	252	126	119	102										
248	—	111	105											
Controles (a)														
MRL:	376.2 ± 3.5				961.1 ± 21.1				1344.6 ± 47.4					
SR:	121.7 ± 1.7				172.5 ± 4.7				345.5 ± 7.4					
MRI:	779 ± 6.8				2143 ± 218				2313.2 ± 32.3					

PARÁMETROS DE CITOTOXICIDAD CALCULADOS POR ORDENADOR

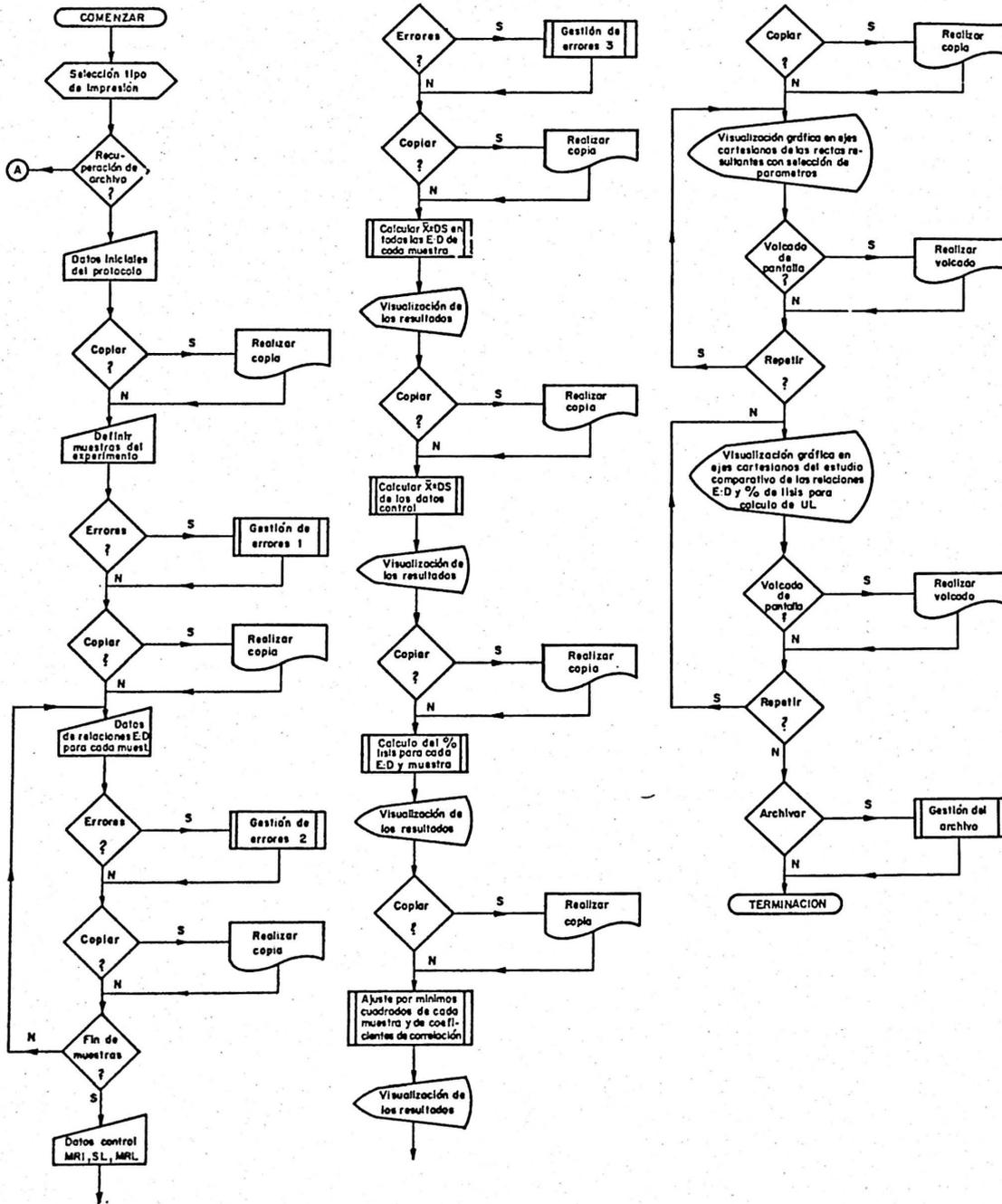


Fig. 1. Diagrama de flujo del programa NKCELPRO.

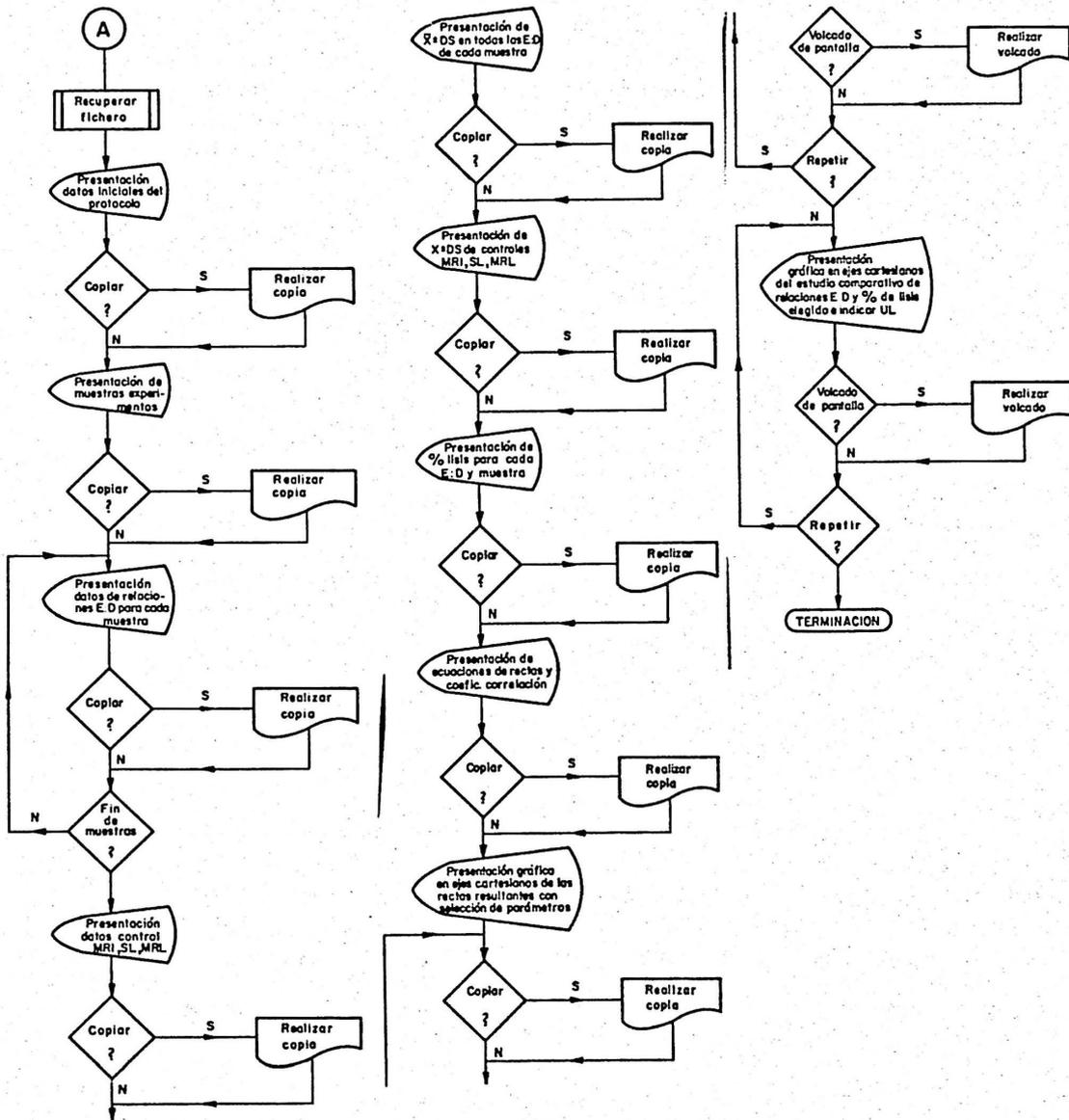


Fig. 1. Diagrama de flujo del programa NKCELPRO (continuación).

datos relativos a fecha, placa de la muestra, código de archivo, objetivos del experimento, bibliografía y cualquier posible información a tener en cuenta para una correcta identificación del experimento. Después de completar toda esta información, aparece una nueva pantalla inquiriendo datos sobre los distintos grupos de muestras y su código particular, lo que permitirá al usuario reconocer en adelante los distintos grupos de resultados que se irán incluyendo en pantallas sucesivas, una para cada muestra. Cuando se ha introducido toda la información sobre los valores de cpm procedentes del contador de centello, para las distintas muestras ensayadas (ejemplos en tabla I), aparece una nueva pantalla en la que se

introducen los datos relativos a las cpm de los tres controles (MRI, SE y MRL). A partir de aquí, el programa empieza a suministrar información en pantallas sucesivas sobre los valores de las medias y desviaciones para terminar calculando, en cada caso, los porcentajes de lisis y el ajuste por mínimos cuadrados de los valores de cada muestra según sus respectivas relaciones E:D.

En este punto se inicia la segunda fase del estudio a requerimiento de NK-cel.2 que, una vez introducido, según las instrucciones operatorias que aparecen convenientemente explicadas en pantalla, recupera de un fichero transitorio la información generada por NK-cel.1. Durante el proceso NK-cel.2 van apareciendo en

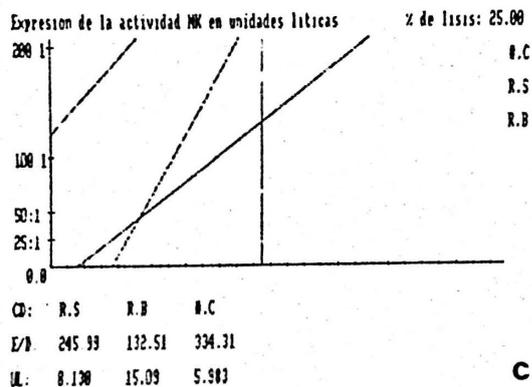
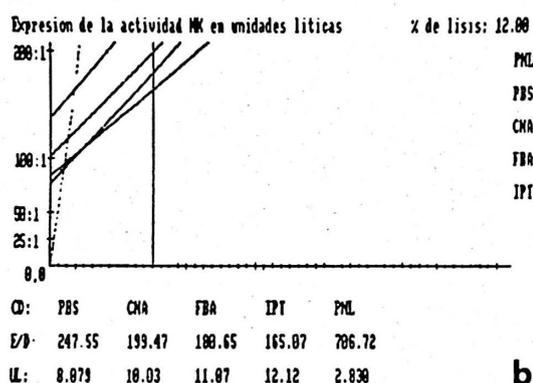
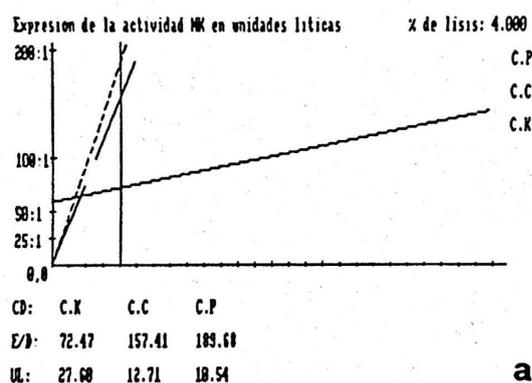


Fig. 2. Representaciones del ordenador, según imagen de pantalla, relativas a la correlación gráfica existente entre % de lisis (abscisas) y relaciones E:D (ordenadas) para las UL de cada muestra y de acuerdo con las fórmulas antes indicadas.

Las unidades corresponden a la intersección de la recta, representativa de cada muestra, con la vertical situada en el % de lisis elegido a voluntad para cada caso. Los parámetros seleccionados en estos ejemplos fueron: a) Escala en abscisas = 20, incremento = 1, intervalo de estudio de 0 a 100 y salto = 0,01, para un 4% de lisis; b) Escala de abscisas = 10, incremento = 2, intervalo de estudio de 0 a 50 y salto = 0,02, para un 12% de lisis; y c) Escala de abscisas = 10, incremento = 2, intervalo de estudio de 0 a 60 y salto = 0,05, para un 25% de lisis.

Table II. Versatilidad en la expresión de resultados según el programa NKCELPRO, para condiciones experimentales tipo.

Distintas modalidades experimentales	% de lisis	Rectas de regresión	UL para un 30% de lisis
<i>Según las células diana</i>			
Células K562	6,071	$y = 3,299 x + 59,28$	14,22
Células CCRF-CEM	41,75	$y = 39,11 x + 0,963$	2,07
Células P815	44,11	$y = 47,17 x + 0,992$	21,71
<i>Según la estirpe de origen de células efectoras</i>			
Ratones Swiss	19,75	$y = 23,87 x + (-100,78)$	5,12
Ratones Balb/c	36,87	$y = 6,049 x + (-18,71)$	7,28
Ratones C3H	12,21	$y = 8,511 x + 121,52$	2,84
<i>Según tratamiento</i>			
Sin tratamiento	12,69	$y = 9,005 x + 139,49$	4,88
Cloridina	6,02	$y = 8,044 x + 102,94$	5,81
Fenoxibenzamina	8,72	$y = 8,613 x + 77,30$	5,95
Isoproterenol	11,26	$y = 6,703 x + 84,64$	7,00
Propranolol	11,79	$y = 58,82 x + 0,925$	1,13

pantalla, de un modo automático, las correspondientes ecuaciones de las diferentes rectas y el coeficiente de correlación en cada caso, con opción a su impresión, como sucede en cualquier presentación de resultados. A partir de aquí se inicia un estudio detallado, mediante gráficos, de las respuestas correspondientes a cada muestra. En esta fase del programa los valores medios de las distintas medidas de cpm, se localizan en un sistema de coordenadas, en el que se establece una correspondencia entre las distintas relaciones E:D (ordenadas) y los porcentajes de citolisis (abscisas). Con ello se obtienen puntos entre los que es posible establecer las rectas de regresión por mínimos cuadrados (fig. 2). Los parámetros variables son: a) la escala del eje de abscisas, considerando el número de puntos gráficos («pixels»/unidad); b) el grado de incremento según la distancia en unidades que se establece en el gráfico; c) el intervalo de estudio abarcado en porcentajes de citolisis; d) el salto o intervalo entre trazos para distintos valores de x en la ecuación

de la recta; y e) el % de lisis que se elige como patrón de referencia para, en función de este parámetro, calcular las UL/10⁷ células efectoras.

Tomando como base esta visualización gráfica en ejes cartesianos de las rectas resultantes, sobre la que es posible modificar distintos parámetros, se puede obtener la expresión de la actividad NK en unidades líticas.

En la tabla II, aplicado a los tres ejemplos numéricos citados, se da idea de los resultados que se pueden obtener en este programa. Todos estos datos permiten una gran versatilidad tanto para un análisis comparativo como para la representación de resultados.

Utilidad del programa. — Al considerar los resultados obtenidos durante la aplicación del programa NKCELPRO a muy distintos estudios de respuesta citotóxica natural espontánea o activada por interferón, se ha observado como ventajas que, con los datos suministrados por el ordenador, es posible obtener rápida-

mente un estudio comparativo entre el efecto de distintos inmunofármacos, la variable sensibilidad de diferentes células tumorales utilizadas como diana o las variaciones de respuesta condicionadas por la edad o naturaleza del huésped, origen de las células efectoras. Asimismo, partiendo de los datos previamente archivados, se puede realizar fácilmente un examen comparativo de los efectos modificadores de un tratamiento a nivel de las células NK.

Discusión

Con el programa NKCELPRO en lenguaje BASIC, a través del rápido análisis de datos obtenidos en un contador de radiaciones gamma, se pueden determinar con facilidad respuestas de citotoxicidad natural en cultivos celulares. Por otra parte, mediante la modificación de distintos parámetros de representación gráfica, se consigue más versatilidad a la hora de interpretar los resultados con propósitos comparativos.

Según las distintas situaciones experimentales analizadas, en la que existen variaciones condicionadas por la diferente naturaleza de las estirpes murinas, por el tipo de células diana utilizado o por la presencia de distintos fármacos inmunomodificadores, siempre se produjo una adaptación satisfactoria del modelo logístico a los datos y situaciones experimentales. La opción de archivar y volver a disponer rápidamente de los diferentes resultados de un ensayo permite auxiliar a un equipo de investigación, evitando el trasiego manual de datos, sin necesidad de acudir a costosos ordenadores de carácter departamental. La información facilitada por el programa NKCELPRO permite estudiar comparativamente la actividad de inmunomodificadores biológicos, en proyectos en los que se han de analizar gran número de muestras y evitando un largo tratamiento matemático de datos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la aportación de sus datos experimentales a M. L. Alonso, E. Baixeras, P. Moya, J. M. Rojo y E. Ronda, así como el trabajo de delineación de A. Hurtado y la ayuda para el tratamiento de datos realizada por M.^a L. del Pozo.

Resumen

Se describe el programa NKCELPRO para microordenador, que facilita la valoración correcta de distintos parámetros relativos a actividades de células NK. El programa está escrito en BASIC para la interpretación de datos sobre actividades de citotoxicidad mediada por células. Recopila y clasifica resultados de recuentos radiactivos obtenidos a partir de ensayos con liberación de Cr^{51} . La información generada a partir del programa incluye estudios estadísticos, con el cálculo de las medias y sus desviaciones estándar, líneas de regresión ajustadas por mínimos cuadrados y coeficientes de correlación para cada muestra. Asimismo, para cualquier valor de referencia previamente definido por el operador, se pueden determinar automáticamente el porcentaje de lisis específica y las unidades líticas/ 10^7 células efectoras. Otras particularidades del programa permiten una cierta flexibilidad en el diseño del protocolo experimental así como en la expresión gráfica de los resultados. También es posible efectuar el almacenamiento de datos sobre un disco, con propósitos de archivado y para estudios subsiguientes.

Palabras clave: Programación en BASIC, Citotoxicidad, Células NK.

Bibliografía

1. Barasoain, I., Rejas, M. T., Ojeda, G., Portolés, M. P. y Rojo, J. M.: *Int. J. Immunopharma.*, 8, 509-515, 1986.
2. Becker, S., Fenyö, E. M. y Klein, E.: *Eur. J. Immunol.*, 6, 882-885, 1976.
3. Brunner, K. T., Engers, H. D. y Cerottini, J. C.: «*In vitro* methods in cell mediated immunity» (B. R. Bloom y J. R. David, eds.). Academic Press, Nueva York, 1971. pp. 423-428.
4. Bureau, K. D., Wood, S. M. y Buffler, P.: *Comput. Biomed. Res.*, 18, 369-373, 1970.
5. Canty, T. G. y Wunderlich, J. R.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 45, 761-765, 1970.
6. Hasman, A. y Chang, S. C.: *Comput. Biomed. Res.*, 15, 145-149, 1982.

7. Herberman, R. B. y Holden, H. T.: *Adv. Cancer Res.*, 27, 305-377, 1978.
8. Majó-Torrent, J.: «Métodos Matemáticos de la Técnica». Vicens-Vives, Barcelona, 1966, pp. 201-211.
9. Merrill, S. J.: *Mathemat. Biosci.*, 62, 219-235, 1982.
10. Merrill, S. J.: *J. Math. Biology*, 17, 153-162, 1983.
11. Mule, J. J., Shu, S. y Rosenberg, S. A.: *Immunol.*, 135, 646-652, 1985.
12. Portolés, A.: Inmunofarmacología. Nuevos horizontes en Biomedicina y Farmacoterapia. Real Academia de Farmacia, Madrid, 1986, pp. 1-270.
13. Reid, J. A. y Kenny, G. N. C.: *J. Microcomput. Appl.*, 7, 257-262, 1984.
14. Parenti, I. V., Ferrari, G., Zoppi, S., Fiacco, E., Berger, D. y Carlo, V. D.: *Ric. Clin. Lab.*, 14, 73-80, 1984.
15. Rojo, J. M., Moya, P. y Baixeras, E.: *Rev. Clin. Española*, 172, 261-262, 1984.
16. Ronda, E., Moya, P., Baixeras, E. y Alonso, M. L.: *Adv. Immunother*, 288, 81-86, 1983.
17. Rosenberg, S. A., Lotze, M. T. y Muul, L. M. *et al.*: *N. Engl. J. Med.*, 313, 1485-1492, 1985.
18. Senik, A., Gresser, I., Maurv, Ch., Gidlund, M., Orn, A. y Wigzell, H.: *Cell. Immunol.*, 44, 186-200, 1979.
19. Sladen, J. G.: *Amer. J. Surg.*, 147, 654-658, 1984.
20. Welsh, R. M.: *Nat. Immun. Cell Growth Regul.*, 5, 169-199, 1986.

