

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 406**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2011 PCT/GB2011/052082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12056236**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2011 E 11791614 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2633077**

54 Título: **Procedimientos analíticos y matrices para su uso en la identificación de agentes que inducen la sensibilización en la piel humana**

30 Prioridad:

**26.10.2010 GB 201018014**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.10.2017**

73 Titular/es:

**SENZAGEN AB (100.0%)  
Medicon Village, Scheelevägen 2  
223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**LINDSTEDT, MALIN;  
BORREBAECK, CARL A K;  
JOHANSSON, HENRIK y  
ALBREKT, ANN-SOFIE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 639 406 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos analíticos y matrices para su uso en la identificación de agentes que inducen la sensibilización en la piel humana

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para identificar agentes capaces de inducir la sensibilización de la piel de mamíferos, en el que los agentes son capaces de inducir y activar una reacción de hipersensibilidad retardada tipo IV en un mamífero, y matrices y kits analíticos para su uso en dichos procedimientos.

**Antecedentes**

- 10 La dermatitis alérgica de contacto es una enfermedad inflamatoria de la piel que afecta a una proporción significativa de la población. En general, es causada por respuestas inmunológicas hacia los haptenos químicos y genera una carga económica considerable para la sociedad. Las pruebas actuales para los productos químicos sensibilizadores se basan en la experimentación con animales. La nueva legislación sobre el registro y el uso de productos químicos, p. ej., en las industrias farmacéutica y cosmética, ha estimulado iniciativas de investigación significativas para desarrollar ensayos alternativos basados en células humanas para la predicción de la sensibilización. El objetivo es reemplazar los experimentos con animales por pruebas *in vitro* que muestren un mayor poder predictivo.

- 15 La dermatitis alérgica de contacto (DAC) es una enfermedad inflamatoria de la piel común caracterizada por eccema y episodios recurrentes de picazón [1]. La enfermedad afecta a una proporción significativa de la población, con índices de prevalencia del 7,2 % al 18,6 % en Europa [2, 3] y la incidencia está aumentando debido a la exposición repetida a productos químicos sensibilizadores. La DAC es una respuesta de hipersensibilidad retardada de tipo IV causada principalmente por linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de linfocitos T cooperadores 1 (Th1) reactivos e interferón (IFN)γ en el sitio de contacto con haptenos químicos pequeños en personas expuestas anteriormente y sensibilizadas inmunológicamente [4]. Las células dendríticas (CD) en la epidermis inician las reacciones inmunitarias respondiendo a los haptenos unidos a las moléculas propias y a la activación de la inmunidad mediada por los linfocitos T.

- 25 El reglamento REACH (Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias y Preparados Químicos) exige que se evalúen los efectos peligrosos [5] de todos los productos químicos nuevos y actuales dentro de la Unión Europea, que implican aproximadamente 30.000 productos químicos. Como la identificación de posibles sensibilizadores actualmente requiere pruebas en animales, la legislación REACH tendrá un gran efecto sobre la cantidad de animales necesarios para las pruebas. Además, la 7<sup>o</sup> enmienda de la Directiva sobre cosméticos (76/768/EEC) planteó una prohibición sobre pruebas con animales para la mayoría de los ingredientes cosméticos para uso humano, que entró en vigor en 2009, con la excepción de algunas pruebas hasta 2013. Por tanto, es urgente desarrollar alternativas fiables *in vitro* con animales experimentales para evaluar la capacidad sensibilizadora de los productos químicos. Hasta la fecha, no se dispone de sustitutos no animales para la identificación de productos químicos sensibilizadores de la piel, de hecho, el ensayo preferido es el ensayo con ganglios linfáticos locales (LLNA, acrónimo de *Local Lymph Node Assay*) en ratones [6], seguido de la prueba de maximización en cobayas (GPMT, acrónimo de *Guinea pig maximization test*) [7]. Una alternativa *in vitro* a estos modelos animales presentaría, preferentemente, una mayor fiabilidad, precisión y correlación con la reactividad humana.

- 40 Las células dendríticas (CD) desempeñan funciones clave en la respuesta inmunitaria combinando conexiones esenciales entre inmunidad innata y adaptativa. Después de activarse, pueden producir rápidamente grandes cantidades de mediadores, que influyen en la migración y la activación de otras células en el sitio de inflamación, y responden selectivamente a diversos patógenos y factores ambientales, mediante el ajuste de la respuesta celular a través de la presentación del antígeno. Por tanto, analizar y utilizar la toma de decisiones inmunológica por parte de las CD durante la estimulación con sensibilizadores, podría servir como una estrategia de prueba potente para la predicción de la sensibilización.

- 45 El documento WO 2010/031799 se refiere a un procedimiento para identificar el potencial irritante o alérgico de un producto, que comprende las siguientes etapas: a) poner en contacto el producto con células dendríticas inmaduras, b) determinar la cantidad de 65 productos génicos, expresados en dichas células tras el contacto con el producto, c) restar la cantidad de productos génicos de estos genes expresados en dichas células que no están en contacto con el producto, de las cantidades respectivas determinadas en b) para obtener un conjunto de cantidades de productos génicos causadas por el producto para cada uno de dichos genes, d) comparar las cantidades de productos génicos causadas por el producto para cada uno de dichos genes obtenidos en c) con un conjunto de prueba de cantidades de productos génicos causadas por el producto para cada uno de dichos genes, en el que dicho conjunto de prueba de cantidades de productos génicos causadas por el producto para cada uno de dichos genes se proporcionó a partir de al menos dos productos alérgicos y al menos dos productos irritantes y, opcionalmente, a partir de al menos dos productos que no son ni alérgicos ni irritantes; y en el que la comparación se realiza a través de un procedimiento de reconocimiento de patrones que reconoce un patrón alérgico y un patrón irritante y, opcionalmente, un patrón no alérgico y un patrón no irritante; y e) identificar un potencial alérgico de un producto cuando la comparación en d) produce el reconocimiento de un patrón alérgico e identificar un potencial

irritante de un producto cuando la comparación en d) produce el reconocimiento de un patrón irritante y, opcionalmente, identificar un producto no alergénico y no irritante cuando la comparación en d) produce el reconocimiento de un patrón no alergénico y un patrón no irritante.

5 El documento WO 2009/148669 se refiere a procedimientos para predecir la actividad de sensibilización de la piel *in vivo* de compuestos químicos, utilizando una combinación de modelos de células de mamífero con análisis de criterios de valoración múltiples, curvas de respuesta de tiempo y concentración. Según se informa, los procedimientos permiten la determinación de un valor de sensibilización *in vivo* predicho de un compuesto, por ejemplo, un valor de LLNA de EC3, un valor de GPMT o un valor de IVTI; sin el uso de animales.

10 En Szameit S y col. 2009 (Clinical & Experimental Allergy, 39: 856-868), CDi derivadas de monocitos se expusieron a sensibilizadores e irritantes de contacto en concentraciones que producían una citotoxicidad del 10-20 %, según lo determinado por las curvas de respuesta a la dosis, se analizaron cambios en la expresión génica utilizando el chip de toxicidad inmunitaria y una micromatriz hologenómica disponible en el comercio.

15 En Cluzel-Tailhardat M y col. 2007 (Toxicology Letters, 174: 98-108), utilizando una matriz de ADNc de baja densidad, los autores analizaron la expresión de 165 genes relacionados con la biología de las células dendríticas en CDi humanas después de una incubación de 24 h con cuatro haptenos y un irritante.

Lambrechts N y col. 2009 (Toxicology and Applied Pharmacology, 236: 221-230), presentan un modelo de clasificación *in vitro* para la predicción de sensibilización de la piel inducida por productos químicos basado en firmas de expresión génica en células dendríticas humanas derivadas de CD34+ progenitoras.

20 Tal como se informa en Ernard F-X y col. 2002 (Experimental Dermatology, 11: 59-74), para validar un modelo para el cribado predictivo de fármacos dermatológicos, según se informa, los autores utilizaron un sistema de macromatriz de ADNc personalizado que contenía 475 genes relacionados con la piel, para analizar los patrones de expresión génica en queratinocitos humanos de diferentes orígenes: (1) cultivos monocapa de queratinocitos epidérmicos humanos normales, (2) el modelo de epidermis humana reconstituida SkinEthic disponible en el comercio y (3) biopsias de epidermis humana normal. Además, los autores investigaron los efectos del ácido todo transretinoico, ácido retinoico 9-cis, retinol todo trans y una crema comercializada que contiene tretinoína (Retacnyl) en los perfiles de expresión génica de la epidermis humana reconstituida.

25 Python F. 2009 (Toxicology and Applied Pharmacology, 239: 273-283) presenta un estudio dirigido a la identificación de nuevos marcadores de activación de células dendríticas con el fin de mejorar aún más la evaluación *in vitro* del potencial sensibilizador de los productos químicos. Se informó que PIR, TRIM16 y dos genes regulados por Nrf2, CES1 y NQO1, están modulados por la mayoría de los sensibilizadores.

30 Schoeters E y col. 2007 (Molecular Immunology, 44: 3222-3233) presentan el uso de células dendríticas derivadas de CD34(+) progenitoras de sangre umbilical como una alternativa *in vitro* para las células de Langerhans. Según se informa, las células se expusieron a cuatro alérgenos de contacto y a dos irritantes. Utilizando análisis de micromatriz, los autores revelaron un conjunto de 25 genes con un patrón de expresión génica alterado después de la exposición a alérgenos y no a irritantes.

35 En Johansson H y col. 2011 (BMC GENOMICS. 12: 399), los autores desarrollaron un ensayo basado en células para la predicción de los productos químicos sensibilizadores. Al analizar el transcriptoma de la línea celular humana MUTZ-3 después de una estimulación de 24 h, utilizando 20 productos químicos sensibilizadores diferentes, 20 productos químicos no sensibilizadores y controles de vehículo, los autores identificaron una firma de biomarcadores de 200 genes con fuerte capacidad discriminativa.

Sin embargo, los fenotipos multifacéticos y las funciones especializadas de las diferentes subpoblaciones de CD, así como su amplia y escasa distribución, son factores que causan complicaciones, lo cual impide el empleo de CD primarias como una plataforma de prueba. Así pues, existe una necesidad real de establecer ensayos *in vitro* precisos y fiables que también eviten los problemas asociados con la variabilidad y la dificultad para obtener las CD.

#### 45 **Divulgación**

Por tanto, el desarrollo de ensayos basados en la previsibilidad de la función de las CD, preferentemente, se debe basar en tipos celulares alternativos o miméticos de CD *in vivo*. A tal fin, una línea celular con características de CD sería conveniente, ya que constituye un suministro estable, reproducible e ilimitado de células. En cuanto a miméticos de CD, las células MUTZ-3 mielomonocíticas diferenciadas son, con mucho, el candidato preferido [8]. MUTZ-3 es una fuente ilimitada de CD CD34<sup>+</sup> progenitoras y puede adquirir, tras la estimulación con citocinas, fenotipos similares a los de las CD inmaduras o CD similares a Langerhans [9], presentar antígenos a través de CD1 d, MHC de clase I y II e inducir la proliferación de linfocitos T específicos [8]. MUTZ-3 también presenta un perfil transcripcional maduro y fenotípico tras la estimulación con mediadores inflamatorios [10].

55 Los presentes inventores han desarrollado un principio de prueba novedoso para la predicción de sensibilizadores de la piel. De forma sorprendente, los inventores han descubierto que los sensibilizadores de la piel se pueden identificar/predecir con precisión utilizando células progenitoras de CD, tales como células MUTZ-3, sin diferenciación adicional en un procedimiento mediante el cual se estimula a las células con un panel de productos

químicos sensibilizadores, productos químicos no sensibilizadores y/u otros controles (p. ej., controles de vehículo que comprenden solo diluyente, tales como DMSO y/o agua destilada). Se descubrió que esto simplifica y mejora considerablemente la reproducibilidad del procedimiento.

5 La respuesta transcripcional a la estimulación química se evaluó con perfilado hologenómico. A partir del análisis de los datos, se identificó una firma de biomarcadores de 200 transcripciones, que separó por completo la respuesta transcripcional inducida por los productos químicos sensibilizadores frente a los productos químicos no sensibilizadores y los controles de vehículo. Además, se ilustró el fuerte poder predictivo de la firma, utilizando análisis de curva ROC y SVM. La firma de biomarcadores incluye las transcripciones que participan en rutas biológicas pertinentes, tales como la maduración de CD y las respuestas de citocinas, lo cual puede arrojar luz sobre las interacciones moleculares que participan en el procedimiento de sensibilización. En conclusión, se ha identificado una firma de biomarcadores con fuerte poder predictivo, que representa una lectura convincente para un ensayo *in vitro* útil para la identificación de productos químicos sensibilizadores humanos.

10 Así pues, un primer aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para identificar agentes capaces de inducir la sensibilización de la piel de mamíferos, en el que los agentes son capaces de inducir y activar una reacción de hipersensibilidad retardada de tipo IV en un mamífero que comprende o consiste en las siguientes etapas:

- 15 a) exponer una población de células dendríticas o una población de células de tipo dendríticas a un agente de prueba; y  
 20 b) medir en las células, la expresión de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo definido en la tabla 3A,

en el que la expresión en las células de los dos o más biomarcadores medidos en la etapa (b) indica el efecto sensibilizador del agente de prueba.

Preferentemente, la reacción de hipersensibilidad retardada de tipo IV está mediada por CD.

25 En el presente documento también se desvela, el agente es capaz de inducir y activar una reacción de hipersensibilidad retardada de tipo IV en un sitio de contacto epidérmico en un mamífero.

30 El mamífero puede ser cualquier animal doméstico o de granja. Preferentemente, el mamífero es una rata, un ratón, una cobaya, un gato, un perro, un caballo o un primate. Lo más preferible, es que el mamífero sea un ser humano. Como se indicó anteriormente, en la técnica se conocen procedimientos *in vivo* para determinar la sensibilización. Un procedimiento preferido es el ensayo con ganglios linfáticos locales (para más información, véase Basketter, D.A., y col., Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice. Food Chem Toxicol, 2002. 40(5): p. 593-8). Otro procedimiento adecuado, pero menos preferido, es la prueba de maximización en cobayas (para más información, véase Magnusson, B. y A.M. Kligman, The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J Invest Dermatol, 1969. 52(3): p. 268-76).

35 Por "células de tipo dendríticas" se entiende que son células no dendríticas que presentan características funcionales y fenotípicas específicas de las células dendríticas, tales como características morfológicas, expresión de moléculas coestimuladoras y moléculas de MHC de clase II, y la capacidad de realizar pinocitosis de macromoléculas y de activar linfocitos T en reposo.

40 En el presente documento también se desvela, que las células de tipo dendríticas son progenitores de células CD34<sup>+</sup> dendríticas. Opcionalmente, los progenitores de células CD34<sup>+</sup> dendríticas pueden adquirir, tras la estimulación con citocinas, los fenotipos de antígenos de presentación a través de CD1 d, MHC de clase I y II, inducir la proliferación de linfocitos T específicos y/o presentar un perfil transcripcional maduro y fenotípico tras la estimulación con mediadores inflamatorios (es decir, fenotipos similares a los de las células dendríticas inmaduras o células dendríticas de tipo Langerhans).

45 Las células dendríticas se pueden reconocer por su función, por su fenotipo y/o por su patrón de expresión génica, especialmente por su fenotipo de superficie celular. Estas células se caracterizan por su morfología distintiva, por niveles altos de expresión superficial de MHC de clase II y por su capacidad de presentar antígenos a linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup>, especialmente a linfocitos T indiferenciados (Steinman y col. (1991) Ann. Rev. Immunol. 9: 271).

50 La superficie celular de las células dendríticas es inusual, con proyecciones de tipo velo características y se caracteriza por la expresión de los marcadores de superficie celular CD11c y MHC de clase II. La mayoría de las CD son negativas para marcadores de otros linajes de leucocitos, incluidos los linfocitos T, los linfocitos B, los monocitos/macrófagos y los granulocitos. Las subpoblaciones de células dendríticas también pueden expresar marcadores adicionales, incluidos 33D1, CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CD1 a-d, CD4, CD5, CD8alfa, CD9, CD11b, CD24, CD40, CD48, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86, CD91, CD117, CD123 (IL3Ra), CD134, CD137, CD150, CD153, CD162, CXCR1, CXCR2, CXCR4, DCIR, DC-LAMP, DC-SIGN, DEC205, Cadherina E, Langerina, Receptor de manosa, MARCO, TLR2, TLR3 TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 y varias lectinas.

55 Los patrones de expresión de estos marcadores de superficie celular pueden variar junto con la madurez de las

5 células dendríticas, su tejido de origen y/o su especie de origen. Las células dendríticas inmaduras expresan bajos niveles de MHC de clase II, pero son capaces de realizar endocitosis de las proteínas antigénicas y procesarlas para la presentación en un complejo con moléculas de MHC de clase II. Las células dendríticas activadas expresan niveles altos de MHC de clase II, ICAM-1 y CD86, y son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T alogénicos indiferenciados, p. ej., en una reacción de leucocitos mixtos (RLM).

10 Funcionalmente, las células dendríticas o las células de tipo dendríticas se pueden identificar a través de cualquier ensayo conveniente para la determinación de la presentación de antígenos. Dichos ensayos pueden incluir la evaluación de la capacidad de estimular linfocitos T sensibilizados con antígenos y/o indiferenciados mediante la presentación de un antígeno de prueba, seguido de la determinación de la proliferación de linfocitos T, la liberación de IL-2 y similares.

Por "expresión" se entiende que es el nivel o la cantidad de un producto génico, tal como un ARNm o una proteína.

Los expertos en la técnica conocen procedimientos para detectar y/o medir la concentración de proteínas y/o ácidos nucleicos, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

15 Los procedimientos preferidos para la detección y/o la medición de proteínas incluyen transferencia de Western, transferencia de North-Western, ensayos inmunoabsorbentes (ELISA), micromatriz de anticuerpos, micromatriz de tejidos (TMA, acrónimo de *tissue microarray*), inmunoprecipitación, hibridación *in situ* y otras técnicas de inmunohistoquímica, radioinmunoensayo (RIA, acrónimo de *radioimmunoassay*), ensayos inmunoradiométricos (IRMA, acrónimo de *immunoradiometric assays*) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA, acrónimo de *immunoenzymatic assays*), lo que incluye ensayos de tipo sándwich utilizando anticuerpos monoclonales y/o policlonales. David y col. describieron ensayos de tipo sándwich ejemplares, en las patentes estadounidenses n.º 4.376.110 y 4.486.530. Se puede utilizar la tinción de anticuerpos de células en portaobjetos en procedimientos bien conocidos en pruebas de diagnóstico de laboratorio de citología, como conocen bien los expertos en la materia.

25 Normalmente, el ensayo ELISA comprende el uso de enzimas que proporcionan un producto de reacción coloreado, habitualmente en ensayos de fase sólida. Enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa se han empleado de manera generalizada. Una forma de amplificar la reacción de fosfatasa es utilizar NADP como un sustrato para generar NAD que ahora actúa como una coenzima para un segundo sistema de enzimas. La pirofosfatasa de *Escherichia coli* proporciona un buen conjugado porque la enzima no está presente en los tejidos, es estable y proporciona un buen color de reacción. También se pueden utilizar sistemas quimioluminiscentes basados en enzimas, tales como luciferasa.

30 La conjugación con la vitamina biotina se utiliza con frecuencia ya que se puede detectar fácilmente mediante su reacción con avidina o estreptavidina unida a enzima a la cual se une con gran especificidad y afinidad.

35 Los procedimientos preferidos para la detección y/o la medición de ácido nucleico (p. ej., ARNm) incluyen transferencia de southern, transferencia de northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, acrónimo de *polymerase chain reaction*), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR, acrónimo de *reverse transcriptase PCR*), PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR, acrónimo de *quantitative real-time PCR*), nanomatriz, micromatriz, macromatriz, autorradiografía e hibridación *in situ*.

40 En una realización, el procedimiento comprende exponer una población distinta de las células dendríticas o de las células de tipo dendríticas, a un agente de control negativo que no sensibiliza la piel humana, y medir en las células la expresión del uno o más biomarcadores medidos en la etapa (b). Así pues, se indica un efecto sensibilizador del agente de prueba en el caso de que la expresión en la población celular de uno o más biomarcadores medida en la etapa (b) sea diferente de la expresión en la muestra de control negativo.

En el presente documento también se desvela, que el agente de control negativo es un disolvente para su uso con los agentes de prueba o de control. Así pues, el control negativo puede ser DMSO y/o agua destilada.

45 En el presente documento también se desvela, que la expresión de uno o más biomarcadores medida en la etapa (b) de las células dendríticas o de las células de tipo dendríticas antes de la exposición al agente de prueba, se utiliza como un control negativo.

50 Otro aspecto de la divulgación comprende exponer una población distinta de las células dendríticas o de las células de tipo dendríticas, a un agente de control positivo que sensibiliza la piel humana, y medir en las células la expresión del uno o más biomarcadores medidos en la etapa (b). Así pues, un efecto sensibilizador del agente de prueba se indica en el caso de que la expresión en la población celular del uno o más biomarcadores medidos en la etapa (b) sea similar o igual a la expresión en la muestra de control positivo.

Preferentemente, el procedimiento comprende, en la etapa (b), medir la expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en:

- 55 i) receptor del sabor, de tipo 2, miembro 5 (TAS2R5),  
ii) proteína similar al factor de crecimiento de queratinocitos proteína 1/2/hipotética FLJ20444 (KGFLP1/2/

FLJ20444),

iii) transformación 1 anterior posterior transmembrana (TAPT1),

iv) homólogo 2 sprouty (SPRY2),

v) ácido graso sintasa (FASN),

5 vi) CLL/linfoma de linfocitos B 7A (BCL7A),

vii) familia 25 portadora de solutos, miembro 32 (SLC25A32),

viii) ferritina, pseudogén 1 de polipéptido pesado (FTHP1),

ix) ATPasa, transportadora de H<sup>+</sup>, lisosómica de 50/57kDa, V1 subunidad H (ATP6V1H),

x) escualeno epoxidasa (SQLE) y

10 xi) grupo de histona 1, H1e (HIST1H1E).

Así pues, en una realización, la expresión del receptor de sabor, de tipo 2, miembro 5 (TAS2R5) se mide en la etapa (b). En una realización adicional, en la etapa (b), se mide la expresión de la proteína similar al factor de crecimiento de queratinocitos proteína 1/2/ hipotética FLJ20444 (KGFLP1/2/ FLJ20444). El procedimiento puede comprender medir la expresión de la transformación 1 anterior posterior transmembrana (TAPT1) en la etapa (b). En una  
15 realización, el procedimiento comprende medir la expresión del homólogo 2 sprouty (SPRY2) en la etapa (b). Sin embargo, otra realización del procedimiento, en la etapa (b), comprende medir la expresión de la ácido graso sintasa (FASN). El procedimiento puede comprender medir la expresión de CLL/linfoma de linfocitos B 7A (BCL7A) en la etapa (b). También puede comprender medir la expresión de la familia portadora de solutos 25, miembro 32 (SLC25A32) en la etapa (b). Además puede comprender, en la etapa (b), medir la expresión de la ferritina, del  
20 pseudogén 1 de polipéptido pesado (FTHP1). Otra realización comprende medir la expresión de la ATPasa, transportadora de H<sup>+</sup>, lisosómica de 50/57kDa, V1 subunidad H (ATP6V1 H) en la etapa (b). En otra realización, la etapa (b) comprende medir la expresión de la escualeno epoxidasa (SQLE). En otra realización, la expresión del grupo de histona 1, H1e (HIST1H1E) se mide en la etapa (b).

El procedimiento puede comprender o consistir en medir, en la etapa (b), la expresión de al menos 2 biomarcadores de la tabla 3A, por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 biomarcadores de la tabla 3A. En el presente documento también se desvela, que el procedimiento comprende o consiste en medir la expresión de la ácido graso sintasa (FASN) y de la escualeno epoxidasa (SQLE) en la etapa (b).  
25

De manera adicional o alternativa, el procedimiento puede comprender o consistir en, medir en la etapa (b) la expresión de al menos 2 biomarcadores de la tabla 3B, por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,  
30 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128,  
35 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188 o al menos 189 biomarcadores de la tabla 3B.

Por tanto, en la etapa (b) se puede medir la expresión de todos los biomarcadores en la tabla 3A y/o de todos los biomarcadores en la tabla 3B.

En una realización preferida, la etapa (b) comprende o consiste en medir la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica los dos o más biomarcadores. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADNc o una molécula de ARNm. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARNm.  
40

En el presente documento también se desvela, que la expresión del uno o más biomarcadores en la etapa (b) se realiza utilizando un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en hibridación de Southern, hibridación de Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), nanomatriz, micromatriz, macromatriz, autorradiografía e hibridación *in situ*. Preferentemente, la expresión del uno o más biomarcadores se mide utilizando una micromatriz de ADN.  
45

El procedimiento desvelado en el presente documento puede comprender medir la expresión de los dos o más biomarcadores en la etapa (b) utilizando dos o más restos de unión, capaz de unirse cada uno de ellos selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica uno de los biomarcadores identificados en la tabla 3A.  
50 En el presente documento también se desvela, el uno o más restos de unión comprenden o consisten cada uno en una molécula de ácido nucleico. En el presente documento también se desvela, que cada uno del uno o más restos de unión comprenden o consisten en ADN, ARN, PNA, LNA, GNA, TNA o PMO. Preferentemente, cada uno del uno o más restos de unión comprenden o consisten en ADN. En el presente documento también se desvela, que el uno o más restos de unión tienen una longitud de 5 a 100 nucleótidos. Como alternativa, tienen una longitud de 15 a 35  
55 nucleótidos.

Como se indica más adelante, se pueden seleccionar o detectar agentes de unión adecuados (también denominados moléculas de unión) de una biblioteca, según su capacidad para unirse a un ácido nucleico, a una proteína o a un motivo de aminoácidos determinado.

En el presente documento también se desvela, que el resto de unión comprende un resto detectable.

En el presente documento, por "resto detectable" se incluye un resto que permite determinar su presencia y/o cantidad relativa y/o ubicación (por ejemplo, la ubicación en una matriz) bien directa o indirectamente.

En la materia se conocen bien restos detectables adecuados.

5 Por ejemplo, el resto detectable puede ser un resto fluorescente y/o luminiscente y/o quimioluminiscente que, cuando se expone a condiciones específicas, se puede detectar. Puede ser necesario que dicho resto fluorescente se exponga a radiación (es decir, luz) a una longitud de onda e intensidad específicas para provocar la excitación del resto fluorescente, lo que le permite emitir fluorescencia detectable a una longitud de onda específica que se puede detectar.

10 Como alternativa, el resto detectable puede ser una enzima que es capaz de convertir un sustrato (preferentemente, no detectable) en un producto detectable que se puede visualizar y/o detectar. A continuación, se comentan con más detalle ejemplos de enzimas adecuadas con relación, por ejemplo, a ensayos ELISA.

15 Así pues, el resto detectable se puede seleccionar del grupo que consiste en: un resto fluorescente; un resto luminiscente; un resto quimioluminiscente; un resto radiactivo (por ejemplo, un átomo radiactivo); o un resto enzimático. Preferentemente, el resto detectable comprende o consiste en un átomo radiactivo. El átomo radiactivo se puede seleccionar del grupo que consiste en tecnecio-99m, yodo-123, yodo-125, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, fósforo-32, azufre-35, deuterio, tritio, renio-186, renio-188 e itrio-90.

20 Claramente, el agente que se va a detectar (tal como, por ejemplo, el uno o más biomarcadores en la muestra de prueba y/o en la muestra de control que se describe en el presente documento y/o una molécula de anticuerpo para su uso en la detección de una proteína seleccionada, debe tener una cantidad suficiente de isótopos atómicos adecuados para que el resto detectable sea fácilmente detectable.

Como alternativa, el resto detectable del resto de unión es un resto fluorescente.

25 El radio, u otros marcadores, se pueden incorporar en los biomarcadores presentes en las muestras desveladas en el presente documento y/o en los restos de unión en las formas conocidas. Por ejemplo, si el agente de unión es un polipéptido, este se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que comprenden, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Rh}$ ,  $^{188}\text{Rh}$  e  $^{111}\text{In}$ , pueden, por ejemplo, estar unidos a través de residuos de cisteína en el resto de unión. El itrio-90 puede estar unido a través de un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57) se puede utilizar para incorporar  $^{123}\text{I}$ . La referencia ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) describe otros procedimientos en detalle. Los procedimientos para conjugar otros restos detectables (tales como, restos enzimáticos, fluorescentes, luminiscentes, quimioluminiscentes o radiactivos) con proteínas son muy conocidos en la materia.

35 Los expertos en la técnica apreciarán que los biomarcadores en la muestra, o muestras, que se van a evaluar, pueden estar marcados con un resto que ayuda indirectamente a determinar la presencia, la cantidad y/o la ubicación de dichas proteínas. Por tanto, el resto puede constituir un componente de un resto detectable de varios componentes. Por ejemplo, los biomarcadores en la muestra, o muestras, que se van a evaluar, pueden estar marcados con biotina, lo que permite su posterior detección utilizando estreptavidina fusionada o unida de otro modo a un marcador detectable.

40 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la etapa (b) comprende determinar la expresión de la proteína de los dos o más biomarcadores. El procedimiento puede comprender medir la expresión de los dos o más biomarcadores en la etapa (b) utilizando dos o más restos de unión, cada uno capaz de unirse selectivamente a uno de los biomarcadores identificados en la tabla 3A. En el presente documento también se desvela, el uno o más restos de unión pueden comprender o consistir en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.

45 El término "anticuerpo" incluye cualquier anticuerpo sintético, anticuerpo recombinante o híbrido de anticuerpo, tal como, pero sin limitación, una molécula de anticuerpo de cadena simple producida mediante presentación en fagos de regiones variables y/o constantes de cadena ligera y/o pesada de inmunoglobulina, u otras moléculas inmunointeractivas capaces de unirse a un antígeno en un formato de inmunoensayo conocido por los expertos en la técnica.

También se incluye el uso de agentes de unión de tipo anticuerpo, tales como anticuerpos y aptámeros.

Se puede encontrar una revisión general de las técnicas que participan en la síntesis de los fragmentos de anticuerpo que conservan sus sitios de unión específicos en Winter y Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

Además o como alternativa, una o más de las primeras moléculas de unión puede ser un aptámero (véase Collett y

col., 2005, *Methods* 37:4-15).

Las bibliotecas moleculares, tales como las bibliotecas de anticuerpos (Clackson y col., 1991, *Nature* 352, 624-628; Marks y col., 1991, *J Mol Biol* 222(3): 581-97), las bibliotecas de péptidos (Smith, 1985, *Science* 228(4705): 1315-7), las bibliotecas de ADNc expresados (Santi y col. (2000) *J Mol Biol* 296(2): 497-508), las bibliotecas de otros andamiajes diferentes del armazón de anticuerpo, tales como aficuerpos (Gunneriusson y col., 1999, *Appl Environ Microbiol* 65(9): 4134-40) o las bibliotecas basadas en aptámeros (Kenan y col., 1999, *Methods Mol Biol* 118, 217-31) se pueden utilizar como una fuente a partir de la cual las moléculas de unión, que son específicas para un determinado motivo, se seleccionan para utilizar en los procedimientos desvelados.

Las bibliotecas moleculares se pueden expresar *in vivo* en células procariotas (Clackson y col., 1991, *op. cit.*; Marks y col., 1991, *op. cit.*) o en células eucariotas (Kieckhefer y col., 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(10):5651-6) o se pueden expresar *in vitro* sin que intervengan células (Hanes y Pluckthun, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94(10):4937-42; He y Taussig, 1997, *Nucleic Acids Res* 25(24):5132-4; Nemoto y col., 1997, *FEBS Lett*, 414(2): 405-8).

En los casos en los que se utilizan bibliotecas basadas en proteínas, los genes que codifican las bibliotecas de las posibles moléculas de unión, suelen estar empaquetados en virus y la posible molécula de unión se expresa en la superficie del virus (Clackson y col., 1991, *anteriormente citado*, Marks y col., 1991, *anteriormente citado*, Smith, 1985, *anteriormente citado*).

Quizá, el sistema de presentación más comúnmente utilizado es el bacteriófago filamentoso que presenta fragmentos de anticuerpo en su superficie, expresándose los fragmentos de anticuerpo como una fusión con la proteína de recubrimiento menor del bacteriófago (Clackson y col., 1991, *anteriormente citado*, Marks y col., 1991, *anteriormente citado*). Sin embargo, otros sistemas adecuados para la presentación incluyen el uso de otros virus (EP 39578), bacterias (Gunneriusson y col., 1999, *anteriormente citado*, Daugherty y col., 1998, *Protein Eng* 11(9):825-32; Daugherty y col., 1999, *Protein Eng* 12(7):613-21) y levadura (Shusta y col., 1999, *J Mol Biol* 292(5):949-56).

Además, se han desarrollado sistemas de presentación utilizando enlazamiento del producto polipeptídico con un ARNm codificante en los denominados sistemas de presentación de ribosomas (Hanes y Pluckthun, 1997, *anteriormente citado*, He y Taussig, 1997, *anteriormente citado*, Nemoto y col., 1997, *anteriormente citado*) o alternativamente enlazamiento del producto polipeptídico con el ADN codificante (véase la patente estadounidense n.º 5.856.090 y WO 98/37186).

Los dominios pesado variable ( $V_h$ ) y ligero variable ( $V_l$ ) del anticuerpo participan en el reconocimiento de antígenos, un hecho reconocido en primer lugar por primeros experimentos de digestión con proteasas. La confirmación posterior se realizó mediante la "humanización" de anticuerpos de roedores. Se pueden fusionar dominios variables de origen de roedor con dominios constantes de origen humano de modo que el anticuerpo resultante conserve la especificidad antigénica del anticuerpo con origen de roedor (Morrison y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-6855).

El hecho de que la especificidad antigénica sea conferida por los dominios variables y sea independiente de los dominios constantes, se conoce a partir de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpo, los cuales contienen uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas de tipo Fab (Better y col. (1988) *Science* 240, 1041); moléculas Fv (Skerra y col. (1988) *Science* 240, 1038); moléculas Fv de cadena simple (ScFv, acrónimo de *single-chain Fv*) en las que los dominios asociados  $V_h$  y  $V_l$  están enlazados a través de un oligopéptido flexible (Bird y col. (1988) *Science* 242, 423; Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879) y anticuerpos de dominio simple (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward y col. (1989) *Nature* 341, 544). Se puede encontrar una revisión general de las técnicas que participan en la síntesis de los fragmentos de anticuerpo que conservan sus sitios de unión específicos en Winter y Milstein (1991) *Nature* 349, 293-299.

El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno se puede seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos intactos, fragmentos Fv (p. ej., Fv de cadena simple y Fv con enlace disulfuro), fragmentos tipo Fab (p. ej., fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos F(ab)<sub>2</sub>), dominios variables simples (p. ej., dominios  $V_h$  y  $V_l$ ) y anticuerpos de dominio (dAb, incluidos los formatos simples y dobles [es decir, dAb-enlazador-dAb]). Preferentemente, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno es un Fv de cadena simple (scFv).

El uno o más restos de unión, alternativamente, pueden comprender o consistir en un agente de unión tipo anticuerpo, por ejemplo, un aficuerpo o un aptámero.

Por "moléculas scFv" se entiende que son moléculas en las que los dominios asociados  $V_h$  y  $V_l$  están enlazados a través de un oligopéptido flexible.

Las ventajas de utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos, son de varias veces. Un menor tamaño de los fragmentos puede dar lugar a propiedades farmacológicas mejoradas, tales como mayor penetración de un tejido sólido. Las funciones efectoras de los anticuerpos completos, tales como unión al



complemento, se eliminan. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb se pueden expresar y secretar a partir de *E. coli*, lo que permite por tanto la producción fácil de grandes cantidades de dichos fragmentos.

5 Los anticuerpos completos y los fragmentos  $F(ab')_2$  son "bivalentes". Por "bivalente" se entiende que dichos anticuerpos y fragmentos  $F(ab')_2$  tienen dos sitios de combinación con el antígeno. Por el contrario, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes, ya que tienen un solo sitio de combinación con el antígeno.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales adecuados a través de técnicas conocidas, por ejemplo, las descritas en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

10 Cuando se seleccionan posibles moléculas de unión de las bibliotecas, se suelen emplear uno o más péptidos selectores que tienen motivos definidos. Los residuos de aminoácidos que proporcionan estructura, disminuyendo la flexibilidad en el péptido o en las cadenas laterales hidrófobas o polares cargadas que permiten la interacción con la molécula de unión, se pueden utilizar en el diseño de motivos para péptidos seleccionadores. Por ejemplo:

- 15 (i) La prolina puede estabilizar una estructura peptídica ya que su cadena lateral está unida al carbono alfa y al nitrógeno;
- (ii) La fenilalanina, la tirosina y el triptófano tienen cadenas laterales aromáticas y son muy hidrófobos, mientras que la leucina y la isoleucina tienen cadenas laterales alifáticas y también son hidrófobas;
- (iii) La lisina, la arginina y la histidina tienen cadenas laterales básicas y tendrán carga positiva a pH neutro, mientras que el aspartato y el glutamato tienen cadenas laterales ácidas y tendrán carga negativa a pH neutro;
- 20 (iv) La asparagina y la glutamina son neutras a pH neutro, pero contienen un grupo amida que puede participar en los enlaces de hidrógeno;
- (v) Las cadenas laterales de la serina, la treonina y la tirosina contienen grupos hidroxilo, que pueden participar en los enlaces de hidrógeno.

25 Normalmente, la selección de moléculas de unión puede implicar el uso de tecnologías de matriz y de sistemas para analizar la unión a puntos que corresponden con tipos de moléculas de unión.

El uno o más restos de unión a proteínas pueden comprender un resto detectable. El resto detectable se puede seleccionar del grupo que consiste en un resto fluorescente, un resto luminiscente, un resto quimioluminiscente, un resto radiactivo y un resto enzimático.

30 En el presente documento también se desvela, que la etapa (b) se puede realizar utilizando un ensayo que comprende un segundo agente de unión capaz de unirse a la una o más proteínas, comprendiendo también el segundo agente de unión un resto detectable. Los segundos agentes de unión adecuados se describen anteriormente con detalle en relación con los primeros agentes de unión.

35 Por tanto, las proteínas de interés en la muestra que se va a evaluar se pueden aislar y/o inmovilizar primero utilizando el primer agente de unión, después de lo cual se puede determinar la presencia y/o la cantidad relativa de dichos biomarcadores utilizando un segundo agente de unión.

40 En el presente documento también se desvela, el segundo agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este; típicamente, un anticuerpo recombinante o un fragmento de este. De forma conveniente, el anticuerpo o el fragmento de este se selecciona del grupo que consiste en: scFv; Fab; un dominio de unión de una molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos y los fragmentos adecuados, y los procedimientos para fabricarlos, se describen anteriormente con detalle.

Como alternativa, el segundo agente de unión puede ser un agente de unión tipo anticuerpo, tal como un anticuerpo o un aptámero.

45 Como alternativa, cuando el resto detectable en la proteína en la muestra que se va a evaluar comprende o consiste en un miembro de un par de unión específico (p. ej., biotina), el segundo agente de unión puede comprender o consistir en el miembro complementario del par de unión específico (p. ej., estreptavidina).

Cuando se utiliza un ensayo de detección, se prefiere que el resto detectable se seleccione del grupo que consiste en: un resto fluorescente; un resto luminiscente; un resto quimioluminiscente; un resto radiactivo; un resto enzimático. Anteriormente, se describieron ejemplos de restos detectables adecuados para su uso en los procedimientos de la presente divulgación.

50 Los ensayos preferidos para detectar proteínas séricas o plasmáticas incluyen ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés), ensayos inmunoradiométricos (IRMA, acrónimo de *immunoradiometric assays*) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA, acrónimo de *immunoenzymatic assays*), lo que incluye ensayos tipo sándwich utilizando anticuerpos monoclonales y/o policlonales. David y col. describieron ensayos tipo sándwich ejemplares en las patentes estadounidenses n.º 4.376.110 y 4.486.530. Se puede utilizar la tinción de anticuerpos de células en portaobjetos en los procedimientos conocidos en las pruebas de

55

diagnóstico de laboratorio de citología, como se conoce bien por los expertos en la materia.

5 En el presente documento también se desvela, el ensayo es un ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) que comprende típicamente el uso de enzimas que proporcionan un producto de reacción coloreado, habitualmente en ensayos de fase sólida. Las enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa se han empleado ampliamente. Una forma de ampliar la reacción de fosfatasa es utilizar NADP como sustrato para generar NAD que ahora actúa como una coenzima para un segundo sistema de enzimas. La pirofosfatasa de *Escherichia coli* proporciona un buen conjugado porque la enzima no está presente en los tejidos, es estable y proporciona un buen color de reacción. También se pueden utilizar sistemas quimioluminiscentes a base de enzimas, tales como luciferasa.

10 La conjugación con la vitamina biotina se utiliza con frecuencia ya que se puede detectar fácilmente mediante su reacción con la avidina o la estreptavidina unida a enzima a la cual se une con gran especificidad y afinidad.

En el presente documento también se desvela, el ensayo utilizado para la detección de proteínas es, de forma conveniente, un ensayo fluorométrico. Por tanto, el resto detectable del segundo agente de unión puede ser un resto fluorescente, tal como un fluoróforo *Alexa* (por ejemplo, Alexa-647).

15 Preferentemente, la etapa (b) se realiza utilizando una matriz. La matriz puede ser una matriz basada en perlas o una matriz basada en la superficie. La matriz se puede seleccionar del grupo que consiste en: macromatriz; micromatriz; nanomatriz.

20 En el presente documento también se desvela, el procedimiento es para identificar agentes capaces de inducir una respuesta de hipersensibilidad en la piel humana. Preferentemente, la respuesta de hipersensibilidad es una respuesta de hipersensibilidad mediada por células, por ejemplo, una respuesta de hipersensibilidad tipo IV. Preferentemente, el procedimiento es para identificar agentes capaces de inducir dermatitis alérgica de contacto (DAC) (es decir, la respuesta de hipersensibilidad es la DAC).

25 En el presente documento también se desvela, que la población de células dendríticas o la población de células de tipo dendríticas, es una población de células dendríticas. Preferentemente, las células dendríticas son células dendríticas primarias. Preferentemente, las células dendríticas son células dendríticas mieloides.

La población de células dendríticas o de células de tipo dendríticas es, preferentemente, de origen mamífero. Preferentemente, el mamífero es una rata, un ratón, una cobaya, un gato, un perro, un caballo o un primate. Lo más preferible es que el mamífero sea un ser humano.

30 En el presente documento también se desvela, que la población de células dendríticas o la población de células de tipo dendríticas es una población de células de tipo dendríticas, preferentemente, células de tipo dendríticas mieloides.

35 En el presente documento también se desvela, que las células de tipo dendríticas expresan al menos uno de los marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD54, CD86, CD80, HLA-DR, CD14, CD34 y CD1a, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de los marcadores. En el presente documento también se desvela, que las células de tipo dendríticas expresan los marcadores CD54, CD86, CD80, HLA-DR, CD14, CD34 y CD1a.

40 En el presente documento también se desvela, que las células de tipo dendríticas pueden proceder de células dendríticas mieloides. Preferentemente, las células tipo dendríticas son células derivadas de leucemia mieloides. Preferentemente, las células derivadas de leucemia mieloides se seleccionan del grupo que consiste en KG-1, THP-1, U-937, HL-60, Monomac-6, AML-193 y MUTZ-3. Lo más preferible es que las células tipo dendríticas sean células MUTZ-3. Las células MUTZ-3 son células de leucemia mielomonocítica aguda humana que fueron depositadas en Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), (Inhoffenstraße 7B, Braunschweig, Alemania) el 15 de mayo de 1995 (www.dsmz.de; n.º de depósito ACC 295).

En el presente documento también se desvela, las células tipo dendríticas, después de la estimulación con citocina, presentan antígenos a través de CD1d, MHC clase I y II y/o inducen la proliferación de linfocitos T específicos.

45 En el presente documento también se desvela, los agentes de control negativo se seleccionan del grupo que consiste en 1-butanol, ácido 4-aminobenzoico, benzaldehído, clorobenceno, ftalato de dietilo, dimetilformamida, etil vainillina, glicerol, isopropanol, ácido láctico, salicilato de metilo, ácido octanoico, propilenglicol, fenol, ácido p-hidroxibenzoico, permanganato de potasio, ácido salicílico, dodecilsulfato de sodio, Tween 80 y sulfato de zinc.

50 En el presente documento también se desvela, el procedimiento puede comprender el uso de al menos 2 agentes de control negativo (es decir, agentes no sensibilizadores), por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o al menos 20 agentes de control negativo.

En el presente documento también se desvela, los agentes de control positivo se seleccionan del grupo que consiste en 2,4-dinitroclorobenceno, oxazolona, dicromato de potasio, Kathon CH (MC/MCI), formaldehído, 2-aminofenol, 2-nitro-1,4-fenilendiamina, p-fenilendiamina, aldehído hexilcinámico, acrilato de 2-hidroxietilo, 2-mercaptobenzotiazol,

gloxal, cinamaldehído, isoeugenol, etilendiamina, resorcinol, alcohol cinámico, eugenol, penicilina G o geraniol.

En el presente documento también se desvela, el procedimiento puede comprender el uso de al menos 2 controles positivos (es decir, agentes sensibilizadores) que se proporcionan, por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o al menos 20 agentes de control positivo.

- 5 En el presente documento también se desvela, el procedimiento indica si el agente de prueba es un agente sensibilizador o no. En el presente documento también se desvela, el procedimiento indica la potencia de sensibilización de la muestra que se va a evaluar.

10 En el presente documento también se desvela, el procedimiento indica la clasificación del ensayo con ganglios linfáticos locales (LLNA) de la potencia de sensibilización de la muestra que se va a evaluar. Para obtener una descripción detallada de LLNA véase Basketter, D.A., y col., Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice. Food Chem Toxicol, 2002. 40(5): p. 593-8.

15 En el presente documento también se desvela, el procedimiento indica la clasificación de la prueba de maximización en cobayas de la potencia de sensibilización de la muestra que se va a evaluar. Para obtener una descripción detallada de la prueba de maximización en cobayas véase Magnusson, B. y A.M. Kligman, The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J Invest Dermatol, 1969. 52(3): p. 268-76.

En el presente documento también se desvela, el procedimiento indica que el agente de prueba es un no sensibilizador, un sensibilizador débil, un sensibilizador moderado, un sensibilizador fuerte o un sensibilizador extremo. El valor de decisión y la distancia en el PCA (análisis de componente principal, acrónimo de *principal component analysis*) se correlacionan con la fuerza del sensibilizador.

20 En general, los agentes sensibilizadores de la piel se determinan con un ABC ROC (área bajo la curva ROC) de al menos 0,55, por ejemplo, con un ABC ROC de al menos 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99 o con un ABCROC de 1,00. Preferentemente, los agentes sensibilizadores de la piel se determinan con un ABC ROC de al menos 0,85 y, más preferentemente, con un ABC ROC de 1.

25 Normalmente, los agentes capaces de inducir la sensibilización se identifican utilizando una máquina de vectores soporte (SVM), tales como las disponibles en <http://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html> (p. ej., e1071 1.5-24). Sin embargo, también se puede utilizar cualquier otro medio adecuado.

30 Las máquinas de vectores soporte (SVM) son un conjunto de procedimientos de aprendizaje supervisado relacionados utilizados para la clasificación y la regresión. Dado un conjunto de ejemplos de práctica, cada uno marcado como perteneciente a una de dos categorías, un algoritmo de práctica de SVM crea un modelo que predice si un nuevo ejemplo entra dentro de una categoría o la otra. Intuitivamente, un modelo de SVM es una representación de los ejemplos como puntos en el espacio, mapeados de modo que los ejemplos de las categorías separadas se dividen por un espacio libre que es lo más ancho posible. Luego se mapean nuevos ejemplos en ese mismo espacio y se predice que pertenecen a una categoría según el lado del espacio en el que se encuentran.

35 Más formalmente, una máquina de vectores soporte construye un hiperplano o un conjunto de hiperplanos en un espacio dimensional alto o infinito, que se puede utilizar para la clasificación, regresión u otras tareas. Intuitivamente, se logra una buena separación por el hiperplano que tiene la mayor distancia de los puntos de datos de práctica de cualquier clase más cercanos (denominado margen funcional), ya que, en general, cuanto mayor sea el margen, menor será el error de generalización del clasificador. Para obtener más información acerca de las SVM, véase, por ejemplo, Burges, 1998, Data Mining and Knowledge Discovery, 2:121-167.

40 En el presente documento también se desvela, la SVM es "capacitada" antes de realizar los procedimientos de la invención utilizando perfiles de biomarcador de agentes conocidos (a saber, agentes sensibilizadores o no sensibilizadores conocidos). Al ejecutar dichas muestras de práctica, la SVM logra aprender qué perfiles de biomarcadores están asociados con los agentes capaces de inducir la sensibilización. Una vez que finaliza el procedimiento de práctica, la SVM es capaz de saber si la muestra de biomarcador evaluada es de un agente sensibilizador o un agente no sensibilizador.

45 Esto permite la clasificación de los agentes de prueba como sensibilizadores o no sensibilizadores. Por otra parte, al capacitar a la SVM con agentes sensibilizadores de potencia conocida (es decir, agentes no sensibilizadores, sensibilizadores débiles, moderados, fuertes o extremos), la potencia de los agentes de prueba también se puede identificar de forma comparativa.

50 Sin embargo, este procedimiento de capacitación se puede omitir mediante la preprogramación de la SVM con los parámetros de capacitación necesarios. Por ejemplo, los agentes capaces de inducir sensibilización se identifican de acuerdo con los parámetros de la SVM conocidos utilizando el algoritmo de SVM detallado en la tabla 5, según la medición de todos los biomarcadores enumerados en la tabla 3(A) y 1(B).

55 Los expertos apreciarán que se pueden determinar los parámetros de SVM adecuados para cualquier combinación de los biomarcadores enumerados en la tabla 3 mediante la capacitación de una máquina de SVM con la selección

de datos adecuada (es decir, mediciones de biomarcadores de células expuestas a agentes sensibilizadores y/o no sensibilizadores conocidos).

5 Preferentemente, el procedimiento desvelado en el presente documento tiene una precisión de al menos 73 %, por ejemplo, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de precisión.

Preferentemente, el procedimiento desvelado en el presente documento tiene una sensibilidad de al menos 73 %, por ejemplo, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de sensibilidad.

10 Preferentemente, el procedimiento desvelado en el presente documento tiene una especificidad de al menos 68 %, por ejemplo, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de especificidad.

15 Por "precisión" se entiende que es la proporción de resultados correctos de un procedimiento, por "sensibilidad" se entiende que es la proporción de todos los productos químicos positivos que se clasifican correctamente como positivos, y "especificidad" se entiende que es la proporción de todos los productos químicos negativos que se clasifican correctamente como negativos.

20 Un segundo aspecto de la invención proporciona una matriz para su uso en el procedimiento del primer aspecto de la invención, en el que los restos de unión de la matriz consisten en restos de unión de entre 10 y 194 de los biomarcadores definidos en la tabla 3, y en el que los restos de unión de la matriz comprenden dos o más restos de unión tal como se definió en el primer aspecto. En el presente documento también se desvela, la matriz comprende uno o más restos de unión como se definió anteriormente. En el presente documento también se desvela, los restos de unión son capaces (en conjunto) de unirse a todos los biomarcadores definidos en la tabla 3A. En el presente documento también se desvela, los restos de unión son capaces (en conjunto) de unirse a todos los biomarcadores definidos en la tabla 3B. Preferentemente, los restos de unión son capaces (en conjunto) de unirse a todos los biomarcadores definidos en la tabla 3A y la tabla 3B.

Los restos de unión se pueden inmovilizar.

30 Las matrices *per se* son conocidas en la técnica. Normalmente, están formadas por una estructura lineal o bidimensional que tiene regiones ("puntos") separadas (es decir, discretas), cada una tiene un área finita, formada sobre la superficie de un soporte sólido. Una matriz también puede ser una estructura de perlas en la que cada perla se puede identificar por un código molecular o un código de colores o identificar en un flujo continuo. El análisis también se puede realizar de forma secuencial en el que la muestra se pasa a través de una serie de puntos, cada uno adsorbe la clase de moléculas de la solución. El soporte sólido es normalmente vidrio o un polímero, los polímeros utilizados más comúnmente son celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos se pueden encontrar en forma de tubos, perlas, discos, chips de silicio, microplacas, membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), membrana de nitrocelulosa, membrana de nylon, otra membrana porosa, membrana no porosa (p. ej., plástico, polímero, plexiglás, silicio, entre otros), múltiples clavijas poliméricas o múltiples pocillos de microtitulación o cualquier otra superficie adecuada para inmovilizar proteínas, polinucleótidos y otras moléculas adecuadas y/o realizar un inmunoensayo. Los procedimientos de unión son conocidos en la técnica y, generalmente, consisten en reticulación, enlace covalente o adsorción física de una molécula de proteína, un polinucleótido o similar al soporte sólido. Como alternativa, se puede emplear acoplamiento de afinidad de las sondas a través de marcadores de afinidad o construcciones similares. Al utilizar técnicas conocidas, tales como impresión por contacto o sin contacto, enmascaramiento o fotolitografía, se puede definir la ubicación de cada punto. Para obtener revisiones, véase Jenkins, R.E., Pennington, S.R. (2001, *Proteomics*, 2,13-29) y Lal y col. (2002, *Drug Discov Today* 15;7(18 supl.):S143-9).

45 Normalmente, la matriz es una micromatriz. "Micromatriz" incluye en el presente documento el significado de una matriz de regiones que tienen una densidad de regiones discretas de al menos aproximadamente 100/cm<sup>2</sup> y, preferentemente, al menos aproximadamente 1000/cm<sup>2</sup>. Las regiones en una micromatriz tienen dimensiones típicas, p. ej., diámetro, en el intervalo de entre aproximadamente 10-250 μm, y están separadas de otras regiones en la matriz por aproximadamente la misma distancia. La matriz puede ser, alternativamente, una macromatriz o una nanomatriz.

Una vez identificadas y aisladas las moléculas de unión adecuadas (indicado anteriormente), el experto en la técnica puede fabricar una matriz utilizando los procedimientos conocidos en la técnica de la biología molecular; véase los ejemplos abajo.

55 Un tercer aspecto de la presente invención proporciona el uso de dos o más biomarcadores seleccionados del grupo definido en la tabla 3A en combinación para identificar agentes sensibilizadores de respuesta de hipersensibilidad. Preferentemente, todos los biomarcadores definidos en la tabla 3A y la tabla 3B se utilizan en conjunto para identificar agentes sensibilizadores de respuesta de hipersensibilidad. Preferentemente, el uso es coherente con el procedimiento descrito en el primer aspecto de la invención.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un kit analítico para su uso en un procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que comprende o consiste en:

- A) una matriz de acuerdo con el segundo aspecto de la invención; y
- B) instrucciones para realizar el procedimiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

5 El kit analítico puede comprender uno o más agentes de control. Preferentemente, el kit analítico comprende o consiste en las características anteriores, junto con uno o más agentes de control negativo y/o uno o más agentes de control positivo.

El ámbito de la invención reivindicada en el presente documento es definido por las reivindicaciones.

10 **Figura 1. Fenotipo de las células MUTZ-3 antes de la estimulación con productos químicos sensibilizadores y no sensibilizadores**

Los niveles de expresión en la superficie celular de CD14, CD1 a, CD34, CD54, CD80, CD86 y HLA-DR se evaluaron con citometría de flujo. Se configuraron las entradas para excluir residuos y células muertas, y se establecieron cuadrantes mediante la comparación con controles de isotipo relevantes. Se muestran los resultados de un experimento representativo de seis.

15 **Figura 2. Cambios en la expresión de CD86 después de la estimulación con productos químicos sensibilizadores y no sensibilizadores**

Los niveles de expresión en la superficie celular de CD86 se monitorizaron después de la estimulación con productos químicos durante 24 h. A) La regulación por aumento inducida por productos químicos de CD86, en términos de cambios en la frecuencia de las células positivas, se determinó mediante citometría de flujo, tal como se ejemplifica mediante la comparación de las células estimuladas con 2-aminofenol (gráfica de puntos de la derecha) y los controles no estimulados (gráfica de puntos de la izquierda). Se muestran los resultados de un experimento representativo de tres. Se configuraron las entradas para excluir residuos y células muertas, y se establecieron cuadrantes mediante la comparación con controles de isotipo relevantes. B) Recopilación de frecuencias de células positivas para CD86 después de 24 h de estimulación. Se realizó el análisis estadístico utilizando la prueba *t* de Student emparejada. \**p* < 0,05, # *p* < 0,01. NA, no analizado.

25 **Figura 3. Análisis de componente principal de transcripciones expresadas de forma diferencial después de la estimulación química**

Se evaluaron los niveles de ARNm en células MUTZ-3 estimuladas durante 24 h con 20 productos químicos sensibilizadores y 20 productos químicos no sensibilizadores con transcriptómica utilizando matrices Human Gene 1.0 ST Affymetrix. Se investigaron las estructuras y las similitudes en el conjunto de datos de expresión génica utilizando el análisis de componente principal (PCA) en el software Qlucore. A) Un PCA de genes expresados de forma diferencial en las células estimuladas con productos químicos sensibilizadores (rojo) en comparación con productos químicos no sensibilizadores (verde) (1010 genes identificados con ANOVA de una vía). B) Un PCA de genes expresados de forma diferencial en las células estimuladas con productos químicos sensibilizadores en comparación con productos químicos no sensibilizadores (1010 genes), pero ahora las muestras están coloreadas según el compuesto utilizado para la estimulación. C) Un PCA de genes expresados de forma diferencial al comparar las diferentes estimulaciones con ANOVA de 2 vías (1137 genes). Las muestras están coloreadas de acuerdo con los productos químicos sensibilizadores (rojo) y los productos químicos no sensibilizadores (verde). D) Un PCA de genes expresados de forma diferencial al comparar las diferentes estimulaciones con ANOVA de 2 vías (1137 genes), pero ahora las muestras están coloreadas según el compuesto utilizado para la estimulación. P, valor *p* de ANOVA. Q, valor *p* corregido para pruebas de múltiples hipótesis.

30 **Figura 4. Identificación y análisis PCA de la "firma de predicción"**

A) La cantidad de genes significativos expresados de manera diferencial en las células estimuladas con productos químicos sensibilizadores en comparación con productos químicos no sensibilizadores (1010 genes) se redujo utilizando eliminación regresiva. La menor KLD se observa después de la eliminación de 810 analitos, denominado el punto de interrupción. Se considera que los 200 genes restantes son los mayores predictores en el conjunto de datos y se denominan "firma de predicción". B) Se observa una separación completa entre los sensibilizadores (rojo) y los no sensibilizadores (verde) con un PCA de la "firma de predicción". C) El mismo PCA que en B, ahora con las muestras coloreadas de acuerdo con su potencia en LLNA.

35 **Figura 5. Validación del procedimiento de selección de la "firma de predicción"**

El procedimiento a través del cual se construyó la "firma de predicción" fue validado mediante la repetición del procedimiento en el 70 % del conjunto de datos, seleccionados aleatoriamente. El 30 % restante de los datos se utilizó como un conjunto de prueba para la validación de la firma. A) El PCA demuestra que la "firma de genes de

prueba" puede separar los sensibilizadores de los no sensibilizadores. Solo las muestras del conjunto de práctica del 70 %, que se muestra en colores brillantes, se utilizaron para crear el espacio de los primeros tres componentes principales. Las muestras del conjunto de prueba, que se muestra en colores oscuros, se graficaron en este espacio basándose en los niveles de expresión de los analitos en la "firma de genes de prueba". B) Se capacitó una SVM con el conjunto de práctica del 70 % y se validó con el conjunto de práctica del 30 %. El área bajo la curva ROC de 1,0 prueba que la pertenencia al grupo de todas las muestras en el conjunto de prueba se predijo de forma correcta, lo que demuestra la fuerza de la "firma de genes de prueba", y mediante asociación también la fuerza de nuestra "firma de predicción".

#### Figura 6. El interactoma de la "firma de predicción"

Interactoma de las 200 moléculas (anaranjado) y las moléculas que las conectan de acuerdo con pruebas de IPA. Las interacciones directas se muestran como líneas sólidas y las indirectas como líneas punteadas.

#### Ejemplos

La dermatitis alérgica de contacto es una enfermedad inflamatoria de la piel que afecta a una proporción significativa de la población. En general, es causada por respuestas inmunológicas hacia los haptenos químicos y genera una carga económica considerable para la sociedad. Las pruebas actuales de los productos químicos sensibilizadores se basan en la experimentación con animales. La nueva legislación sobre el registro y el uso de productos químicos, p. ej., en las industrias farmacéutica y cosmética, ha estimulado iniciativas de investigación significativas para desarrollar ensayos basados en células humanas alternativos para la predicción de la sensibilización. El objetivo es reemplazar los experimentos con animales por pruebas *in vitro* que exhiban un mayor poder predictivo.

Los inventores han desarrollado un ensayo basado en células novedoso para la predicción de los productos químicos sensibilizadores. Al analizar el transcriptoma de la línea celular humana MUTZ-3 después de una estimulación de 24 h con 20 productos químicos sensibilizadores diferentes, 20 productos químicos no sensibilizadores y controles de vehículo, los inventores han identificado una firma de biomarcadores de 200 genes con capacidad discriminadora potente. Utilizando una máquina de vectores soporte para la clasificación supervisada, el rendimiento de predicción del ensayo reveló una precisión del 100 %, una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 100 %. Además, al categorizar los productos químicos de acuerdo con el ensayo LLNA, esta firma de genes también pudo predecir la potencia. Los marcadores identificados participan en las vías biológicas con funciones inmunológicas relevantes, lo que puede arrojar luz sobre el procedimiento de la sensibilización humana.

Se ha desarrollado una firma de genes que predice la sensibilización utilizando una línea celular humana *in vitro*. Este ensayo basado en células fácil y sólido puede reemplazar por completo o reducir drásticamente los sistemas de prueba actuales, que utilizan animales experimentales. Al basarse en la biología humana, se considera que el ensayo es más pertinente y más preciso para predecir la sensibilización en los seres humanos que las pruebas basadas en animales tradicionales.

#### Resultados

##### Razonamiento celular del sistema de cultivo celular *in vitro*

Al actuar como el enlace entre la inmunidad innata y la adaptativa, las CD son células inmunorreguladoras esenciales del sistema inmunitario. La propiedad exclusiva de reconocer el antígeno con el fin de iniciar las respuestas de los linfocitos T, y su fuerte función reguladora para desviar las respuestas inmunitarias, las convierte en dianas para el desarrollo de ensayos. Sin embargo, las CD primarias constituyen una población de células heterogénea y minoritaria, que no es adecuada para la detección. Las ventajas obvias de utilizar una línea celular con características comparadas con las de las CD primarias para la base de una prueba predictiva, son la estabilidad, la reproducibilidad y el suministro ilimitado de células. Hasta ahora, no se ha comunicado ninguna leucemia con propiedades obvias de tipo CD, probablemente debido al hecho de que las características de este tipo de células son determinadas por un procedimiento de diferenciación terminal complejo que solo puede ocurrir después de la división celular [11] y, por tanto, la generación de líneas celulares de tipo CD se basa en líneas celulares de leucemia mieloide disponibles. MUTZ-3 es una línea celular de leucemia mielomonocítica aguda humana con una fuerte capacidad de diferenciarse para CD, presentar antígenos e inducir la proliferación de linfocitos T específicos. Entre las líneas celulares humanas mieloides disponibles, MUTZ-3 es con mucho la candidata preferida. De forma similar a las CD primarias inmaduras, el progenitor MUTZ-3 expresa CD1a, HLA-DR y CD54, así como niveles bajos de CD80 y CD86 (figura 1). La población de MUTZ-3 también contiene tres subpoblaciones de CD14<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> y células doble negativas, que se informó anteriormente que eran etapas de diferenciación transicional de un progenitor de CD34<sup>+</sup> proliferativo a un precursor de CD de CD14<sup>+</sup> no proliferativo [9]. En consecuencia, los inventores utilizaron células MUTZ-3 progenitoras de diferenciación constitutiva como la base para el sistema de prueba.

**Expresión superficial de CD86 en respuesta a la estimulación con sensibilizador:** CD86 es el biomarcador estudiado más ampliamente para la sensibilización hasta la fecha, en sistemas celulares, tales como células dendríticas derivadas de monocitos (CDMo) o líneas celulares humanas tipo células dendríticas y sus progenitores, tales como THP-1, U-937 y KG-1. Por tanto, como referencia, se midió la expresión en la superficie celular de CD86

con citometría de flujo después de 24 h de estimulación con 20 sensibilizadores y 20 no sensibilizadores, así como con controles de vehículo (tabla 1). CD86 se reguló por aumento significativamente en las células estimuladas con 2-aminofenol, Kathon CG, 2-nitro-1,4-fenilendiamina, 2,4-dinitroclorobenceno, acrilato de 2-hidroxietilo, aldehído cinámico, p-fenilendiamina, resorcinol y 2-mercaptobenzotiazol. Así pues, un ensayo basado en la medición de un único biomarcador, tal como CD86, proporcionaría una sensibilidad del 47 % y una especificidad del 100 %. En consecuencia, CD86 no puede clasificar sensibilizadores de la piel utilizando un sistema basado en células, tal como MUTZ-3.

#### **Análisis de los perfiles transcripcionales en las células MUTZ-3 estimuladas químicamente:**

Para evaluar 20 sensibilizadores y 20 no sensibilizadores, se utilizaron matrices de expresión genómica, por triplicado, y controles de vehículo, tales como DMSO y agua destilada, el último en doce repeticiones. En total, se generó un conjunto de datos basándose en 144 muestras. La normalización de RMA y los controles de calidad de las muestras revelaron que las muestras de oxazolona y de aldehído cinámico fueron valores atípicos importantes y se tuvieron que eliminar, o de lo contrario habrían controlado el conjunto de datos e impedido la identificación del biomarcador (datos no mostrados). Además, uno de los duplicados del permanganato de potasio se tuvo que eliminar debido a una matriz defectuosa. Esto dejó un conjunto de datos que consistía en 137 muestras, cada una con datos de las mediciones de 33.297 transcripciones. Con el fin de extraer del conjunto de datos información específica para los sensibilizadores frente a los no sensibilizadores, se utilizó el software Qlucore Omics Explorer 2.1, que permite el análisis de componente principal (PCA) en tiempo real, mientras que ordena los genes de entrada según los criterios deseados, p. ej., sensibilizadores y no sensibilizadores, según la selección del valor p de ANOVA. Las figuras 3A y 3B muestran PCA basados en 1010 transcripciones con un valor de  $p \leq 2,0 \times 10^{-6}$  de análisis ANOVA, que comparan productos químicos sensibilizadores frente a productos químicos no sensibilizadores. Tal como se puede observar en la figura 3A, se puede realizar una distinción clara entre los dos grupos, los no sensibilizadores forman una nube condensada en la parte inferior de la figura (verde), mientras que los sensibilizadores se estiran hacia arriba en varias direcciones (rojo). Sin embargo, no se logra una separación completa entre los dos grupos con este nivel de significancia. A partir de la figura 3B, coloreada ahora de acuerdo con la estimulación, resulta evidente que uno o más duplicados de glioxal, eugenol, aldehído hexilcinámico, isoeugenol, resorcinol, penicilina G y etilendiamina se agrupan con el grupo de control. Además, un duplicado o más de los no sensibilizadores Tween 80, ácido octanoico y fenol tienden a agruparse con los sensibilizadores. La figura 3C y 3D muestran gráficas de PCA basadas en 1137 genes que tienen un valor de  $p \leq 7,0 \times 10^{-21}$ , cuando se comparan las diferentes estimulaciones. La identificación de esta gran cantidad de genes con este nivel de significancia proporciona indicaciones fuertes del poder del conjunto de datos. En la figura 3D, queda claro que los duplicados se agrupan, lo que indica datos de alta calidad. Las muestras por triplicado de dicromato de potasio tienen un perfil discreto, lo que demuestra un efecto considerable de las células en comparación con los no sensibilizadores. Además, el acrilato de 2-hidroxietilo, 2-aminofenol, Kathon CG, formaldehído, 2-nitro-1,4-fenilendiamina, ácido 2,4-dinitroclorobenzoico, p-fenilendiamina, 2-mercaptobenzotiazol, alcohol cinámico y resorcinol, tienen duplicados que se agrupan entre sí, separados del grupo negativo. De todas formas, como se puede observar en las figuras 3C y 3A, no se logra una separación completa con ninguna de las firmas de genes de 1010 y 1137 genes respectivamente.

#### **La eliminación regresiva identifica genes con el mayor poder discriminatorio:**

Aunque el conjunto de datos contiene genes con valores de p de hasta  $1 \times 10^{-17}$ , la reducción del límite del valor de p no logró una separación completa entre los sensibilizadores y no sensibilizadores. Las firmas de genes seleccionadas por completo según los valores de p no proporcionan el mejor poder predictivo posible, ya que un valor de p bajo no garantiza que un gen proporcione información adicional. Para reducir más la cantidad de transcripciones para una firma de biomarcadores predictivos, se empleó un algoritmo para la eliminación regresiva (figura 4A). El algoritmo elimina los genes uno por uno, mientras que a su vez considera no solo el efecto de los genes de forma individual, sino cómo actúan de forma conjunta con la firma de genes completa seleccionada. Por cada gen eliminado, se reduce el valor de divergencia de Kullback-Leibler (KLD, *Kullback-Leibler divergence*), hasta alcanzar un punto de interrupción, en el que quedaron 200 genes. Si se continúa eliminando genes en este punto, la KLD aumenta nuevamente, lo que indica que se está perdiendo información (figura 4A). Por lo tanto, se seleccionaron los 200 genes con menor valor de KLD para el análisis posterior. El PCA de los 200 análisis reveló que tienen la capacidad de separar por completo los sensibilizadores de los no sensibilizadores, lo que indica que estas transcripciones se pueden utilizar como predictores para las propiedades de sensibilización de las muestras desconocidas (figura 4B). Cabe destacar que, al colorear las muestras en el PCA según su potencia, de acuerdo con LLNA, queda claro que estos genes pueden predecir la potencia también (figura 4C). Los 200 genes se denominan la "firma de predicción" y su identidad se enumera en la tabla 3.

**Validación del procedimiento de análisis utilizado para identificar la firma de predicción:** Para validar el poder predictivo de nuestra firma, se utilizó un procedimiento de aprendizaje supervisado denominado la máquina de vectores soporte (SVM) [12], que mapea los datos de un conjunto de práctica en el espacio para maximizar la separación de la expresión génica inducida por los productos químicos sensibilizadores y no sensibilizadores. Como un conjunto de práctica, se seleccionó el 70 % del conjunto de datos aleatoriamente y se repitió el procedimiento de selección completo (como se ha descrito anteriormente). Partiendo de 29.141 transcripciones, se redujo la firma a 200 transcripciones, denominadas "firma de genes de prueba", utilizando filtrado ANOVA y eliminación regresiva. El

30 % restante del conjunto de datos se utilizó para evaluar la firma obtenida. La división del conjunto de datos en subconjuntos del 70 % como conjunto de datos de práctica y el 30 % como conjunto de datos de prueba se realizó de forma aleatoria estratificada, lo que significa que la proporción de sensibilizadores y no sensibilizadores en el conjunto de datos completo se mantiene en ambos subconjuntos, aunque las muestras incluidas en los dos subconjuntos se seleccionan aleatoriamente. A continuación, se utilizó la "firma de genes de prueba" para capacitar un modelo de SVM con el conjunto de práctica, y se evaluó el poder predictivo del modelo con el conjunto de prueba. La figura 5A muestra una gráfica de PCA basada en la "firma de genes de prueba" y las muestras del conjunto de prueba. Claramente, la separación entre sensibilizadores (rojo) y no sensibilizadores (verde) se asemeja a la observada para la "firma de predicción" en la figura 4B. En el PCA de la figura 5A, las muestras de los productos químicos sensibilizadores y no sensibilizadores del conjunto de prueba se han coloreado de rojo oscuro y verde oscuro respectivamente, lo que indica que no contribuyen con los componentes principales de la gráfica, sino que se grafican simplemente basándose en sus valores de expresión de la "firma de genes de prueba" seleccionada. Tal como se puede observar, los sensibilizadores del conjunto de prueba se agrupan con los sensibilizadores del conjunto de práctica, mientras que los no sensibilizadores del conjunto de prueba se agrupan con los no sensibilizadores del conjunto de práctica. Esta es una manera muy intuitiva de predecir la pertenencia al grupo de las muestras en el conjunto de prueba, utilizando solo el reconocimiento de patrones del ojo. El resultado de la capacitación de SVM y la validación se puede observar en la figura 5B, en la que un área bajo la curva ROC de 1 confirma la capacidad de la "firma de genes de prueba" para predecir a qué grupo pertenecía la muestra en el conjunto de prueba. El rendimiento de predicción del ensayo revela una precisión del 96 %, una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 92%. Aunque este experimento no valida de por sí el poder de predicción de la "firma de predicción", en realidad valida el procedimiento a través del cual se ha seleccionado, respaldando la afirmación de que la "firma de predicción" es capaz de predecir con precisión las propiedades de sensibilización de las muestras desconocidas.

#### **Funciones moleculares y vías canónicas de la "firma de predicción".**

Utilizando Ingenuity Pathways Analysis (IPA, Ingenuity Systems Inc.), se caracterizaron 184 de las 200 moléculas en la firma con respecto a las funciones y las vías conocidas (canónicas). Las 16 moléculas restantes no se pudieron mapear a ninguna entrada de IPA. Las funciones dominantes identificadas fueron bioquímica de moléculas pequeñas (38 moléculas), muerte celular (33), metabolismo de lípidos (24), desarrollo del sistema hematológico (19), crecimiento y proliferación celular (16), transporte molecular (15), ciclo celular (15) y metabolismo de hidratos de carbono (15), véase la tabla 4 para obtener detalles. 67 de las 184 moléculas participaron en las funciones enumeradas. De las 117 moléculas restantes, 30 se conocían de diversas enfermedades humanas y funciones moleculares, tales como los biomarcadores descritos (SCARB2, RFC2, VPS37A y BCL7A) y los objetivos de fármacos (ABAT). La mayoría de estas moléculas son marcadores metabólicos. En la firma como un todo, hay diversos objetivos de fármacos, tal como HMGCR, HMOX1, ABAT, RXRA, CD33, MAP2K1, MAPK13 y CD86. Se describen dos para los trastornos de piel: CD86 (psoriasis) y RXRA (eccema). La firma también contiene marcadores de desarrollo de piel (DHCR24) y células dendríticas (MAP2K1, NLRP12 y RFC2).

Las vías posiblemente invocadas por las moléculas en la firma también se investigaron utilizando IPA. Las más numerosas fueron la respuesta oxidativa mediada por NRF2 (10), la señalización del metabolismo xenobiótico (8), la inhibición mediada por LPS/IL-1 de la función de RXR (6), la señalización del receptor de hidrocarburos de arilo (6) y la señalización de la proteína cinasa A (6). Se sabe que las cinco de estas vías con mayor calificación participan en las reacciones provocadas por las sustancias extrañas, los xenobióticos. Los xenobióticos son compuestos químicos naturales o sintéticos, extraños para el cuerpo humano.

#### **Conclusiones**

La dermatitis alérgica de contacto (DAC) es una enfermedad inflamatoria de la piel causada por respuestas inmunitarias adaptativas desreguladas a los alérgenos [13]. Los productos químicos de bajo peso molecular, denominados haptenos, se pueden unir a las proteínas propias en la piel, lo que permite la interiorización del producto químico alérgico unido a la proteína por la célula dendrítica (CD) de la piel. CD, con la influencia del microambiente local, procesan el complejo de proteína-hapteno, migran a los ganglios linfáticos locales y activan los linfocitos T indiferenciados. El inicio y el desarrollo de las respuestas específicas de alérgenos, principalmente los linfocitos T CD8+ efectores y las células Th1, y la producción de proteínas inmunorreguladoras, son características de la activación inmunitaria observada en la DAC. Esta reacción de hipersensibilidad tipo IV mediada por linfocitos T es caracterizada por síntomas, tales como erupción, ampollas y picazón. La DAC es la manifestación más común de inmunotoxicidad observada en seres humanos [13] y se ha demostrado que cientos de productos químicos provocan sensibilización en la piel [14]. Aún se desconocen los factores activadores y los mecanismos moleculares que participan en la sensibilización, a pesar de que se han realizado grandes esfuerzos de investigación para identificar las respuestas inmunitarias a los productos químicos alérgicos. La legislación REACH exige que todos los productos químicos que se producen en más de 1 tonelada/año sean evaluados en cuanto a las propiedades peligrosas, tales como la toxicidad y la alergenidad [5], lo que aumenta la demanda de ensayos precisos del poder predictivo. Actualmente, la identificación de posibles sensibilizadores humanos se basa en la experimentación animal, en particular, el ensayo con ganglios linfáticos locales (LLNA) murino [6]. El LLNA se basa en las mediciones de la proliferación inducida en ganglios linfáticos de ratones que drenan después de la exposición al producto químico [15]. Los productos químicos se definen como sensibilizadores si provocan un aumento de tres veces en la



proliferación en comparación con el control, y la cantidad de producto químico necesaria para el aumento es el valor de EC3. Por tanto, el LLNA también se puede utilizar para categorizar los productos químicos basándose en la potencia de sensibilización. Sin embargo, el LLNA no es óptimo en muchos aspectos. Además de los motivos éticos evidentes, el ensayo también insume mucho tiempo y es costoso. Los datos de sensibilización humana suelen derivar de pruebas de maximización humana (HMT) [16] y pruebas de parche humano (HPT). En un amplio informe del Comité Coordinador Interagencias para la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM, por sus siglas en inglés), se compararon las características de rendimiento de LLNA con otros procedimientos basados en animales disponibles y los datos de sensibilización humana (HMT y HPT) [17]. El rendimiento del LLNA en comparación con los datos humanos (74 evaluaciones) reveló una *precisión* del 72 %, una *sensibilidad* del 72 % y una *especificidad* del 67 %. *Precisión* se define como la proporción de resultados correctos de un procedimiento, *sensibilidad* es la proporción de todos los productos químicos positivos que se clasifican correctamente como positivos, y *especificidad* es la proporción de todos los productos químicos negativos que se clasifican correctamente como negativos. Por tanto, existe una clara necesidad de desarrollar procedimientos de prueba más confiables para la sensibilización. Adicionalmente, la 7ª enmienda de la Directiva sobre cosméticos (76/768/EEC) planteó una prohibición total al uso de experimentación animal para evaluar ingredientes cosméticos para 2013, cuando haya un procedimiento científico confiable disponible. Por tanto, existe una gran necesidad en la industria de procedimientos de prueba predictivos confiables que se basen en células humanas. Se han evaluado diversas líneas celulares humanas y células primarias que participan en la sensibilización como un sistema de prueba predictivo, tales como células epiteliales, células dendríticas y linfocitos T, sin embargo, actualmente no existe ningún ensayo de prueba validado disponible. Se ha sugerido que diversos biomarcadores únicos se regulan por aumento tras la estimulación con productos químicos sensibilizadores, tales como CD40, CD80, CD54, CXCL8, IL-1  $\beta$ , MIP-1  $\beta$ , p38 MAPK tal como se presenta en [18], pero es el único, ninguno de estos tiene el poder predictivo para discriminar entre productos químicos sensibilizadores y no sensibilizadores. CD86 está entre los marcadores más estudiado; sin embargo, la determinación del nivel de expresión de este marcador en nuestro ensayo es relevante, pero no suficiente como una lectura para la sensibilización (figura 2). Solo 9 de 19 productos químicos sensibilizadores indujeron una regulación por aumento significativa de CD86. En cambio, los inventores tienen la fuerte convicción de que los análisis de las firmas de biomarcadores son superiores a las de cualquier biomarcador único. Por lo tanto, los inventores utilizaron el poder de la transcriptómica hologenómica y detectaron la regulación génica inducida por un gran conjunto de productos químicos y controles bien definidos. La gran cantidad de genes expresados de forma diferencial en las células MUTZ-3 estimuladas con productos químicos sensibilizadores, en comparación con controles no sensibilizadores, tal como se identifica con ANOVA (figura 3), reveló que MUTZ-3 en realidad tenía una capacidad de diferenciar entre estos dos grupos y por tanto es un sistema celular adecuado para realizar ensayos *in vitro* de sensibilización. Se han realizado esfuerzos para crear ensayos basados en análisis hologenómico en diversos sistemas celulares, tales como CD derivadas de células progenitoras CD34<sup>+</sup> [19-21]. Aunque dichos ensayos podrían proporcionar entornos de tipo *in vivo*, se podría argumentar que las células primarias no son adecuadas para un ensayo con este gran interés comercial. Por otra parte, se debe considerar el aspecto ético en dicho sistema. Además, las iniciativas anteriores dentro del desarrollo de ensayos *in vitro* para la sensibilización que se basan en análisis hologenómico, han utilizado un conjunto muy limitado de compuestos de prueba. Hasta la fecha, este estudio es el mayor estudio realizado en este campo, utilizando 20 compuestos de práctica positivos y 20 negativos. Los inventores han realizado esfuerzos para dividir estos compuestos de práctica en dos subconjuntos, para la práctica y la prueba respectivamente. Aunque estos experimentos han dado lugar a predicciones exitosas (no se muestran los datos), según nuestra experiencia, los compuestos sensibilizadores difieren en gran medida en el perfil de expresión génica inducido, tal como se puede observar en la figura 3D. Desde esta perspectiva, los inventores deseaban incluir tantos compuestos de práctica como fuera posible para identificar la "firma de predicción". Por tanto, no se excluyó ningún compuesto para la validación. En cambio, se validó el procedimiento a través del cual se identificó la "firma de predicción", mediante la subdivisión de las muestras en conjuntos de práctica y de prueba de forma aleatoria, utilizando datos no observados para la validación, tal como se observa en la figura 5. Al incluir todos los compuestos sensibilizadores, con una amplia gama de mecanismos reactivos así como potencias de sensibilización, argumentamos que se ha identificado una firma de predicción que es adecuada para predecir las propiedades de sensibilización de las muestras desconocidas. Cabe destacar que la "firma de predicción" es capaz de predecir la potencia de los compuestos sensibilizadores, tales como los definidos por el LLNA, tal como se demuestra en la figura 4C. Sin embargo, la potencia predicha por LLNA y la de nuestro clasificador no coinciden para todas las muestras. En particular, el sensibilizador moderado acrilato de 2-hidroxietilo muestra una fuerte semejanza con los sensibilizadores fuertes y extremos con respecto al perfil de expresión génica. De forma análoga, los sensibilizadores moderados etilendiamina, aldehído hexilcinámico y glioxal se agrupan con los sensibilizadores débiles. Estos hallazgos proporcionan importantes inferencias de que es posible que la potencia de sensibilización, tal como se ha definido, se deba revisar. Argumentamos que se puede utilizar nuestra "firma de predicción" para dichas clasificaciones.

En conclusión, se presenta un ensayo *in vitro*, basado en un sistema de células MUTZ-3 que con una "firma de predicción" identificada que consiste en 200 genes, que tiene la capacidad de clasificar correctamente una muestra como sensibilizadora o no sensibilizadora. Además, este ensayo puede predecir la potencia de los compuestos sensibilizadores, y se puede utilizar para revisar dichas clasificaciones.

## Materiales y procedimientos

### Productos químicos

Se utilizó un panel de productos químicos que consistía en 20 sensibilizadores y 20 no sensibilizadores para las estimulaciones celulares. Los sensibilizadores eran 2,4-dinitroclorobenceno, cinamaldehído, resorcinol, oxazolona, glioxal, 2-mercaptobenzotiazol, eugenol, isoeugenol, alcohol cinámico y *p*-fenilendiamina, formaldehído, etilendiamina, acrilato de 2-hidroxietilo, aldehído hexilcinámico, dicromato de potasio, penicilina G, Katchon CG (MCI/MI), 2-aminofenol, geraniol y 2-nitro-1,4-fenilendiamina (tabla 1). Los no sensibilizadores eran dodecilsulfato de sodio, ácido salicílico, fenol, glicerol, ácido láctico, clorobenceno, ácido *p*-hidrobenzoico, benzaldehído, ftalato de dietilo y ácido octanoico, sulfato de zinc, ácido 4-aminobenzoico, salicilato de metilo, etil vainillina, isopropanol, dimetilformamida, 1-butanol, permanganato de potasio, propilenglicol y Tween 80 (tabla 1). Todos los productos químicos eran de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU. Se disolvieron los compuestos en dimetilsulfóxido (DMSO) o agua destilada. Antes de las estimulaciones, se monitorizó la citotoxicidad de todos los compuestos, utilizando yoduro de propidio (PI) (BD Biosciences, San Diego, CA) utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante. La viabilidad relativa de las células estimuladas se calculó como

$$\text{Viabilidad relativa} = \frac{\text{fracción de células estimuladas viables}}{\text{fracción de células no estimuladas viables}} - 100$$

Para los compuestos tóxicos, se utilizó la concentración que producía 90 % de viabilidad relativa (Rv90). Para los compuestos no tóxicos, se utilizó una concentración de 500  $\mu\text{M}$  siempre que fuera posible. Para los compuestos no tóxicos que eran insolubles a 500  $\mu\text{M}$  en el medio, se utilizó la mayor concentración soluble. Para los compuestos disueltos en DMSO, la concentración en el pocillo fue DMSO al 0,1 %. El vehículo y las concentraciones utilizadas para cada compuesto se enumeran en la tabla 2.

### Exposición química de las células

La línea celular derivada de leucemia mieloide humana MUTZ-3 (DSMZ, Braunschweig, Alemania) se mantuvo en  $\alpha$ -MEM (Thermo Scientific Hyclone, Logan, UT) complementado con 20 % (volumen/volumen) de suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 40 ng/ml de rhGM-CSF (Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Seattle, WA), como se ha descrito anteriormente [10]. Antes de cada experimento, las células se inmunofenotipificaron utilizando citometría de flujo como control de calidad. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos a 200.000 células/ml. Se prepararon soluciones madre de cada compuesto en DMSO o agua destilada, y se diluyeron posteriormente de modo que las concentraciones en el pocillo correspondieran con el valor de Rv90, y las concentraciones en el pocillo de DMSO fueron 0,1 %. Se incubaron las células durante 24 h a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. A continuación, se cosecharon las células y se analizaron con citometría de flujo. En paralelo, se lisaron las células cosechadas en reactivo TRIzol (Invitrogen) y se almacenaron a -20 °C hasta la extracción del ARN. Las estimulaciones con productos químicos se realizaron en tres experimentos individuales, de modo que se obtuvieron muestras por triplicado.

### Análisis fenotípico con citometría de flujo

Todas las etapas de tinción de superficie celular y lavado se realizaron en PBS que contenía BSA al 1 % (p/v). Se incubaron las células con mAb de ratón específicos durante 15 min a 4 °C. Se utilizaron los siguientes mAb para la citometría de flujo: CD1a conjugado con FITC (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), CD34, CD86 y HLA-DR (BD Biosciences), CD14 conjugado con PE (DakoCytomation), CD54 y CD80 (BD Biosciences). IgG 1 de ratón, conjugada con FITC o PE se utilizaron como controles de isotipo y PI se utilizó para evaluar la viabilidad celular (BD Biosciences). Se utilizó el software FACSDiva para la adquisición de datos con el instrumento FACSCanto II (BD Bioscience). Se adquirieron 10.000 eventos y se configuraron las entradas basándose en las propiedades de dispersión de luz para excluir los residuos y las células no viables. Se realizó el análisis adicional utilizando FCS Express V3 (De Novo Software, Los Ángeles, CA).

### Preparación de ARNc e hibridación del chip de genes

Se realizó el aislamiento de ARN y la hibridación de chip de genes como se ha descrito anteriormente [22]. Brevemente, ARN de células MUTZ-3 no estimuladas y estimuladas con productos químicos, de experimentos por triplicado, se extrajeron y analizaron. Se realizó la preparación de ADN sentido marcado de acuerdo con el ensayo de marcado objetivo sentido de transcripción completa (WT, por sus siglas en inglés) Affymetrix GeneChip (protocolo de marcado de ARN total de 100 ng) utilizando los kits y los controles recomendados (Affymetrix, Santa Clara, CA). La hibridación, el lavado y el escaneo de las matrices Human Gene 1.0 ST se realizaron según el protocolo del fabricante (Affymetrix).

### Análisis de datos de micromatriz y procedimientos estadísticos

Los datos de micromatriz se normalizaron y se controló su calidad con el algoritmo de RMA, utilizando la consola de expresión Affymetrix (Affymetrix). Los genes que se regularon significativamente al comparar los sensibilizadores con los no sensibilizadores se identificaron utilizando ANOVA de una vía, con índice de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) como una corrección para las pruebas de hipótesis múltiple. Para reducir la gran cantidad

de genes significativos identificados, se aplicó un algoritmo desarrollado de forma interna para la eliminación regresiva de los analitos (Carlsson y col., no publicado). Con este procedimiento, capacitamos y probamos un modelo de máquina de vectores soporte (SVM) [12] con validación cruzada dejando uno afuera, omitiendo un analito. Este procedimiento se repite hasta que cada analito haya sido omitido una vez. Para cada repetición, se registró una divergencia de Kullback-Leibler (KLD), que produjo  $N$  KLD, en el que  $N$  es la cantidad de analitos. Se considera que el analito que se omitió cuando se observó la KLD más baja proporciona la menor información en el conjunto de datos. Por tanto, este analito se elimina y las repeticiones continúan, esta vez con analitos  $N-1$ . De este modo, los analitos se eliminan de a uno hasta que queda un panel de marcadores que se han seleccionado basándose en la capacidad de cada analito de discriminar entre los sensibilizadores y los no sensibilizadores. El guión para las eliminaciones regresivas se programó para R [23], con el paquete adicional e1071 [24]. Se realizaron análisis ANOVA y visualización de resultados en Qlucore Omics Explorer 2.1 (Qlucore, Lund, Suecia). El perfil de biomarcadores seleccionado de 200 transcripciones se designó la "firma de predicción".

#### Validación del procedimiento para la identificación de la "firma de predicción"

En ausencia de un conjunto de datos de pruebas externas, el conjunto de datos se dividió en un conjunto de entrenamiento del 70 % y un conjunto de prueba del 30 % de las muestras. La división se realizó aleatoriamente y se mantuvieron las proporciones de los sensibilizadores y los no sensibilizadores en cada subconjunto a la misma proporción que en el conjunto de datos completo. Se identificó una firma de biomarcadores en el conjunto de práctica utilizando filtrado ANOVA y eliminación regresiva, como se ha descrito anteriormente. Esta firma de prueba se utilizó para capacitar una SVM, utilizando el conjunto de práctica, que después se aplicó para predecir las muestras del conjunto de prueba. La distribución del área bajo la curva de eficacia diagnóstica (ROC, acrónimo de *Receiver Operating Characteristic*) [25] se utilizó como una medición del rendimiento del modelo.

#### Evaluación de funciones biológicas de la "firma de predicción" utilizando análisis de vías

Para investigar las funciones biológicas, se analizó el perfil genético utilizando el software Ingenuity Pathway Analysis, IPA, (Ingenuity Systems, Inc. Mountain View, EE. UU.). Se analizaron los 200 genes superiores que resultaron de la eliminación regresiva utilizando las funciones de "crear" y "explorador de vías" para crear un interactoma de los genes centrales de la "firma de predicción" y conectando las moléculas sugeridas por IPA. Las 200 moléculas en la "firma de predicción" se conectaron utilizando las vías conocidas más cortas. En este procedimiento, solo se utilizó la prueba humana de las células primarias, las líneas celulares y el tejido epidérmico. Se permitieron todas las moléculas, excepto las drogas químicas y endógenas, en la red y se permitió todo tipo de conexiones. Las "funciones" conocidas y las "vías canónicas" de IPA se mapearon al interactoma utilizando la función de "superposición".

#### **Abreviaturas**

DAC,	dermatitis atópica de contacto;
AML,	célula de leucemia mieloide aguda;
APC,	célula presentadora de antígeno;
CD,	célula dendrítica;
	factor de estimulación de colonias de macrófagos y
GM-CSF,	granulocitos;
GPMT,	prueba de maximización en cobayas;
HMT,	prueba de maximización humana;
HPTA,	alérgeno de prueba de parche humano;
IL,	interleucina;
LLNA,	ensayo con ganglios linfáticos locales;
PCA,	análisis de componente principal

#### **Referencias**

1. Akhavan, A. y S.R. Cohen, The relationship between atopic dermatitis and contact dermatitis. *Clin Dermatol*, 2003. 21(2): p. 158-62.
2. Mortz, C.G., y col., Prevalence of atopic dermatitis, asthma, allergic rhinitis, and hand and contact dermatitis in adolescents. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis. *Br J Dermatol*, 2001. 144(3): p. 523-32.
3. Nielsen, N.H., y col., Allergic contact sensitization in an adult Danish population: two cross-sectional surveys eight years apart (the Copenhagen Allergy Study). *Acta Derm Venereol*, 2001. 81(1): p. 31-4.
4. Fonacier, L.S., S.C. Dreskin y D.Y. Leung, Allergic skin diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 125(2 supl. 2): p. S138-49.
5. EC 1907/2006, en *Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and*

*Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.*

6. Basketter, D.A., y col., Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice. *Food Chem Toxicol*, 2002. 40(5): p. 593-8.
7. Magnusson, B. y A.M. Kligman, The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol*, 1969. 52(3): p. 268-76.
8. Masterson, A.J., y col., MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood*, 2002. 100(2): p. 701-3.
9. Santegoets, S.J., y col., A CD34(+) human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14(+)/CD11b(+) Langerhans cell precursor. *J Leukoc Biol*, 2006. 80(6): p. 1337-44.
10. Larsson, K., M. Lindstedt y C.A. Borrebaeck, Functional and transcriptional profiling of MUTZ-3, a myeloid cell line acting as a model for dendritic cells. *Immunology*, 2006. 117(2): p. 156-66.
11. Rasaiyaah, J., y col., Dendritic cells and myeloid leukaemias: plasticity and commitment in cell differentiation. *Br J Haematol*, 2007. 138(3): p. 281-90.
12. Cortes, C. y V. Vapnik, Support-Vector Networks. *Machine Learning*, 1995. 20(3): p. 273-297.
13. Kimber, I., y col., Allergic contact dermatitis. *Int Immunopharmacol*, 2002. 2(2-3): p. 201-11.
14. Gerberick, G.F., y col., Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis*, 2005. 16(4): p. 157-202.
15. Kimber, I., y col., Classification of contact allergens according to potency: proposals. *Food Chem Toxicol*, 2003. 41(12): p. 1799-809.
20. Kligman, A.M., The identification of contact allergens by human assay. 3. The maximization test: a procedure for screening and rating contact sensitizers. *J Invest Dermatol*, 1966. 47(5): p. 393-409.
17. Haneke, K.E., y col., ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. Data analyses completed by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2001. 34(3): p. 274-86.
25. dos Santos, G.G., y col., Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. 236(3): p. 372-82.
19. Hooyberghs, J., y col., A cell-based in vitro alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. 231(1): p. 103-11.
20. Lambrechts, N., y col., Gene markers in dendritic cells unravel pieces of the skin sensitization puzzle. *Toxicol Lett*, 2010. 196(2): p. 95-103.
30. Lambrechts, N., y col., Assessment of chemical skin-sensitizing potency by an in vitro assay based on human dendritic cells. *Toxicol Sci*, 2010. 116(1): p. 122-9.
22. Lindstedt, M., y col., Genomic and functional delineation of dendritic cells and memory T cells derived from grass pollen-allergic patients and healthy individuals. *Int Immunol*, 2005. 17(4): p. 401-9.
35. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. 2008; Disponible de: <http://www.R-project.org>.
24. R package e1071. Disponible de: <http://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html>.
25. Lasko, T.A., y col., The use of receiver operating characteristic curves in biomedical informatics. *J Biomed Inform*, 2005. 38(5): p. 404-15.
40. Warbrick, E.V., y col., Influence of application vehicle on skin sensitization to methylchloroisothiazolinone/methylisothiazolinone: an analysis using the local lymph node assay. *Contact Dermatitis*, 1999. 41(6): p. 325-9.
27. Roberts, D.W., y col., Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization. *Chem Res Toxicol*, 2007. 20(7): p. 1019-30.
45. Gerberick, G.F., y col., Contact allergenic potency: correlation of human and local lymph node assay data. *Am J Contact Dermat*, 2001. 12(3): p. 156-61.
29. Basketter, D.A., D. Sanders e I.R. Jowsey, The skin sensitization potential of resorcinol: experience with the local lymph node assay. *Contact Dermatitis*, 2007. 56(4): p. 196-200.
30. Ryan, C.A., y col., Activity of human contact allergens in the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis*, 2000. 43(2): p. 95-102.
50. APPENDIX C; Comparative LLNA: BrdU-FC, Traditional LLNA, Guinea Pig Skin Sensitization, and Human Data. 2008 Disponible de: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fclLLNA/Appx/AppendixC\\_LLNA\\_FC07Jan08FD.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fclLLNA/Appx/AppendixC_LLNA_FC07Jan08FD.pdf).
32. Patlewicz, G., y col., Skin-sensitization structure-activity relationships for aldehydes. *Contact Dermatitis*, 2001. 44(6): p. 331-6.
55. Basketter, D.A., G.F. Gerberick e I. Kimber, Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food Chem Toxicol*, 1998. 36(4): p. 327-33.
34. Ashby, J., y col., Structure activity relationships in skin sensitization using the murine local lymph node assay. *Toxicology*, 1995. 103(3): p. 177-94.
60. Sakaguchi, H., y col., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An interlaboratory study of the h-CLAT. *Toxicol In Vitro*, 2006. 20(5): p. 774-84.
36. The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds. 1999;

Disponible de:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox\\_docs/llna/llnarep.pdf](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf).

## TABLAS

**Tabla 1.** Lista de productos químicos sensibilizadores y no sensibilizadores, basada en la clasificación de LLNA murino, evaluados en el ensayo basado en células.

Compuesto	Abreviatura	Potencia	LLNA	HMT <sup>1</sup>	HPTA <sup>1</sup>
<i>Sensibilizadores</i>					
2,4-dinitroclorobenceno	DNCB	Extrema [15]	+ [15]		
Oxazolona	OXA	Extrema [15]	+ [15]		
Dicromato de potasio	PD	Extrema [14]	+ [14]	+	+
Kathon CH (MC/MCI)	KCG	Extrema [14, 26]	+ [14, 26]		
Formaldehído	FA	Fuerte [15]	+ [15]	+	+
2-aminofenol	2AP	Fuerte [27]	+ [27]		
2-nitro-1,4-fenilendiamina	NPDA	Fuerte [27]	+ [27]		
p-fenilendiamina	PPD	Fuerte [28]	+ [28]	+	+
Aldehído hexilcinámico	HCA	Moderada [15]	+ [15]		
Acrilato de 2-hidroxietilo	2HA	Moderada [27]	+ [27]		+
2-mercaptobenzotiazol	MBT	Moderada [27]	+ [27]	+	+
Glioxal	GO	Moderada [27]	+ [27]	+	
Cinamaldehído	CALD	Moderada [28]	+ [28]	+	+
Isoeugenol	IEU	Moderada [28]	+ [28]		+
Etilendiamina	EDA	Moderada [14]	+ [14]		
Resorcinol	RC	Moderada [29]	+ [29]	-	+
Alcohol cinámico	CALC	Débil [27]	+ [28]		
Eugenol	EU	Débil [28]	+ [28]		+
Penicilina G	PEN G	Débil [28]	+ [28]	+	
Geraniol	GER	Débil [14]	+ [14]	-	+
<i>No sensibilizadores</i>					
1-butanol	BUT		- [30]		
Ácido 4-aminobenzoico	PABA		- [31]	-	+
Benzaldehído	BA		- [32]		
Clorobenceno	CB		- [14]		
Ftalato de dietilo	DP		- [28]		
Dimetilformamida	DF		- [26]		
Etil vainillina	EV		- [32]		
Glicerol	GLY		- [28]		
Isopropanol	IP		- [28]		
Ácido láctico	LA		- [14]		
Salicilato de metilo	EM		- [14]	-	
Ácido octanoico	OA		- [33]		

(continuación)

Compuesto	Abreviatura	Potencia	LLNA	HMT1	HPTA1
Propilenglicol	PG		- [31]		
Fenol	PHE		- [33]	-	
Ácido p-hidroxibenzoico	HBA		- [34]		
Permanganato de potasio	PP		-		
Ácido salicílico	SA		- [14]	-	
Dodecilsulfato de sodio	SDS		+ <sup>2</sup> [14, 33]	-	
Tween 80	T80		- [35]		+
Sulfato de zinc	ZS		+ <sup>2</sup> [36]		

<sup>1</sup> HMT, Prueba de maximización humana; HPTA, Alérgeno de prueba de parche humano. La información procede de [17].  
<sup>2</sup> Falsos positivos en LLNA.

Tabla 2. Vehículo y concentraciones utilizados para las pruebas.

Compuesto	Abreviatura	Vehículo	Solubilidad máx. (µM)	Rv90 (µM)	Concentración en cultivo (µM)
<i>Sensibilizadores</i>					
2,4-dinitroclorobenceno	DNCB	DMSO	-	4	4
Oxazolona	OXA	DMSO	250	-	250
Dicromato de potasio	PD	Agua	51,02	1,5	1,5
Kathon CG (MC/MCI)*	KCG	Agua	-	0,0035%	0,0035%
Formaldehído	FA	Agua	-	80	80
2-aminofenol	2AP	DMSO	-	100	100
2-nitro-1,4-fenilendiamina	NPDA	DMSO	-	300	300
p-fenilendiamina	PPD	DMSO	566	75	75
Aldehído hexilcinámico	HCA	DMSO	32,34	-	32,24
Acrilato de 2-hidroxietilo	2HA	Agua	-	100	100
2-mercaptobenzotiazol	MBT	DMSO	250	-	250
Glioxal	GO	Agua	-	300	300
Cinamaldehído	CALD	Agua	-	120	120
Isoeugenol	IEU	DMSO	641	300	300
Etilendiamina	EDA	Agua	-	-	500
Resorcinol	RC	Agua	-	-	500
Alcohol cinámico	CALC	DMSO	500	-	500
Eugenol	EU	DMSO	649	300	300
Penicilina G	PEN G	Agua	-	-	500
Geraniol	GER	DMSO	-	-	500
<i>No sensibilizadores</i>					
1-butanol	BUT	DMSO	-	-	500

(continuación)

Compuesto	Abreviatura	Vehículo	Solubilidad máx. (µM)	Rv90 (µM)	Concentración en cultivo (µM)
Ácido 4-aminobenzoico	PABA	DMSO	-	-	500
Benzaldehído	BA	DMSO	250	-	250
Clorobenceno	CB	DMSO	98	-	98
Ftalato de dietilo	DP	DMSO	50	-	50
Dimetilformamida	DF	Agua	-	-	500
Etil vainillina	EV	DMSO	-	-	500
Glicerol	GLY	Agua	-	-	500
Isopropanol	IP	Agua	-	-	500
Ácido láctico	LA	Agua	-	-	500
Salicilato de metilo	EM	DMSO	-	-	500
Ácido octanoico	OA	DMSO	504	-	500
Propilenglicol	PG	Agua	-	-	500
Fenol	PHE	Agua	-	-	500
Ácido p-hidroxibenzoico	HBA	DMSO	250	-	250
Permanganato de potasio	PP	Agua	38	-	38
Ácido salicílico	SA	DMSO	-	-	500
Dodecilsulfato de sodio	SDS	Agua	-	200	200
Tween 80	T80	DMSO	-	-	500
Sulfato de zinc	ZS	Agua	126	-	126

<sup>1</sup> Kathon CG es una mezcla de los compuestos MC y MCl. La concentración de esta mezcla se expresa en %.

**Tabla 3.** Genes expresados de forma diferencial en las células MUTZ-3 estimuladas con productos químicos sensibilizadores en comparación con agentes no sensibilizadores y controles.

Título del gen	Símbolo del gen	Secuencia de referencia de NCBI
<b>Tabla 3A</b>		
escualeno epoxidasa	SQLE	NM_003129
receptor del sabor, tipo 2, miembro 5	TAS2R5	NM_018980
proteína similar al factor de crecimiento de queratinocitos 1/2/proteína hipotética FLJ20444	KGFLP1/2/ FLJ20444	AF523265
transformación 1 anterior posterior transmembrana	TAPT1	NM_153365
homólogo 2 Sprouty	SPRY2	NM_005842
CLL/linfoma de linfocitos B 7A	BCL7A	NM_020993
familia portadora de solutos 25, miembro 32	SLC25A32	NM_030780
ferritina, pseudogén de polipéptido pesado 1	FTHP1	GENSCAN00000008165
ATPasa, transportadora de H <sup>+</sup> , lisosómica de 50/57kDa, V1 subunidad H	ATP6V1H	NM_015941
grupo de histona 1, H1e	HIST1H1E	NM_005321

ES 2 639 406 T3

(continuación)

Título del gen	Símbolo del gen	Secuencia de referencia de NCBI
<b>Tabla 3B</b>		
4-aminobutirato aminotransferasa	ABAT	NM_020686
dominio de abhidrolasa que contiene 5	ABHD5	NM_016006
ceramidasa alcalina 2	ACER2	NM_001010887
ATP citrato liasa	ACLY	NM_001096
homólogo 10 de proteína relacionada con actina	ACTR10	NM_018477
Dominio 20 de la metalopeptidasa ADAM	ADAM20	NM_003814
Pseudogén retrotransposado AL391261.2-201	AL391261.2-201	GENSCAN00000063078
familia de aldehído deshidrogenasa 18, miembro A1	ALDH18A1	NM_002860
familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro B1	ALDH1B1	NM_000692
alkB, homólogo de reparación de alquilación 6 (E. coli)	ALKBH6	NM_032878
subunidad del complejo promotor de la anafase 1	ANAPC1	NM_022662
subunidad del complejo promotor de la anafase 5	ANAPC5	NM_016237
repetición de anquirina, familia A (tipo RFXANK), 2	ANKRA2	NM_023039
proteína activadora de GTPasa del factor de ribosilación de ADP 3	ARFGAP3	NM_014570
proteína activadora de GTPasa de Rho 9	ARHGAP9	NM_032496
repetición de anquirina y caja SOCS que contiene 7	ASB7	NM_198243
ATPasa, transportadora de H <sup>+</sup> , lisosómica de 9kDa, V0 subunidad e1	ATP6V0E1	NM_003945
integrador puente 2	BIN2	NM_016293
bleomicina hidrolasa	BLMH	NM_000386
dominio brix que contiene 1/homólogo del factor 2 de producción de ribosoma	BXDC1 / RPF2	ENST00000368864
cromosoma 11 fase de lectura abierta 61	C11orf61	NM_024631
cromosoma 11 fase de lectura abierta 67	C11orf67	NM_024684
cromosoma 12 fase de lectura abierta 57	C12orf57	NM_138425
cromosoma 13 fase de lectura abierta 18	C13orf18	NM_025113
cromosoma 15 fase de lectura abierta 24	C15orf24	NM_020154
cromosoma 19 fase de lectura abierta 54	C19orf54	NM_198476
cromosoma 1 fase de lectura abierta 174	C1orf174	NM_207356
cromosoma 1 fase de lectura abierta 183	C1orf183	NM_019099
cromosoma 20 fase de lectura abierta 111	C20orf111	NM_016470
cromosoma 20 fase de lectura abierta 24	C20orf24	BC004446
cromosoma 3 fase de lectura abierta 62 / peptidasa 4 específica de ubiquitina (proto-oncogén)	C3orf62 / USP4	BC023586
cromosoma 9 fase de lectura abierta 89	C9orf89	BC038856
arginina metiltransferasa 1 asociada con coactivador	CARM1	NM_199141



(continuación)

Título del gen	Símbolo del gen	Secuencia de referencia de NCBI
<b>Tabla 3B</b>		
molécula CD33	CD33	NM_001772
molécula CD86	CD86	NM_175862
molécula CD93	CD93	NM_012072
citocromo c oxidasa subunidad VIIa polipéptido 2 tipo	COX7A2L	NM_004718
proteína de unión a la hormona liberadora de corticotropina	CRHBP	NM_001882
N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 de sulfato de condroitina	CSGALNACT2	NM_018590
Citocromo P450 51A1	CYP51A1	NM_000786.2
dominio DDRGK que contiene 1	DDRGK1	NM_023935
polipéptido 21 de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)	DDX21	NM_004728
24-deshidrocolesterol reductasa	DHCR24	NM_014762
7-deshidrocolesterol reductasa	DHCR7	NM_001360
polipéptido 33 de caja DEAH (Asp-Glu-Ala-His)	DHX33	NM_020162
homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 4	DNAJB4	NM_007034
homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 9	DNAJB9	NM_012328
homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 5	DNAJC5	NM_025219
homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 9	DNAJC9	NM_015190
homólogo de D-tirosil-ARNt deacilasa 1	DTD1	NM_080820
potenciador de la degradación de ER, manosidasa alfa tipo 2	EDEM2	NM_018217
sitio 2B de integración viral ecotrópico	EVI2B	NM_006495
familia con similitud de secuencia 36, miembro A	FAM36A	NM_198076
familia con similitud de secuencia 86, miembro A	FAM86A	NM_201400
Fas (superfamilia del receptor de TNF, miembro 6)	FAS	NM_000043
MGC44478	FDP2L2A	NR_003262
ferredoxina reductasa	FDXR	NM_024417
caja de cabeza de tenedor 04	FOXO4	NM_005938
FTHL10-001, Pseudogén procesado transcrito	FTHL 10-001	NR_002200
fucosidasa, alfa-L- 2, plasma	FUCA2	NM_032020
específico de la detención del crecimiento 2 tipo 3	GAS2L3	NM_174942
proteína 2 asociada con la diferenciación inducida por gangliósido	GDAP2	NM_017686
factor de diferenciación del crecimiento 11	GDF11	NM_005811
glutaredoxina (tioltransferasa)	GLRX	NM_002064
proteína de unión a nucleótido de guanina tipo 3	GNL3L	NM_019067
glucosamina-fosfato N-acetiltransferasa 1	GNPNAT1	NM_198066
glutatiión reductasa	GSR	NM_000637
GTF2I dominio de repetición que contiene 2B/2/ 2 pseudogén	GTF2IRD2B/2/2P	BC067859

(continuación)

Título del gen	Símbolo del gen	Secuencia de referencia de NCBI
<b>Tabla 3B</b>		
factor de transcripción general IIIc, polipéptido 2 beta	GTF3C2	NM_001521
factor de transcripción de caja HMG 1	HBP1	NM_012257
grupo de histona 1, H1c	HIST1H1C	NM_005319
grupo de histona 1, H2ae	HIST1H2AE	NM_021052
grupo de histona 1, H2be	HIST1H2BE	NM_003523
grupos de histona 1, H2bm/2, H3, pseudogén 2/2, H2b/a	HIST1H2BM/ HIST2H3PS2/BF/A	NM_001024599
grupo de histona 1, H3g	HIST1H3G	NM_003534
grupo de histona 1, H3j	HIST1H3J	NM_003535
grupo de histona 1, H4a	HIST1H4A	NM_003538
grupos de histona 2, H2aa3 / 2, H2aa4	HIST2H2AA3 /4	NM_003516
caja de grupo de movilidad alta 3	HMGB3	NM_005342
3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa	HMGCR	NM_000859
3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa 1	HMGCS1	NM_001098272
hemo oxigenasa (deciclaje) 1	HMOX1	NM_002133
ribonucleoproteína nuclear heterogénea L	HNRNPL	NM_001533
sustrato 2 del receptor de insulina	IRS2	NM_003749
homólogo del andamiaje del grupo de hierro-azufre	ISCU	NM_014301
gen de exonucleasa estimulado por interferón 20kDa tipo 2	ISG20L2	NM_030980
canal de potasio regulado por voltaje, familia relacionada con Isk, miembro 3	KCNE3	NM_005472
proteína hipotética LOC100132855/ATPasa, transportadora de H <sup>+</sup> , lisosómica de 38kDa, V0 subunidad d1	LOC100132855/ ATP6V0D1	NM_004691
hCG1651476	LOC284417	NM_001085488
autoantígeno de golgi, subfamilia a de golgi, 6 pseudogén / mitocondrial poli(A) polimerasa	LOC729668/ MTPAP	NM_018109
receptor 1 del ácido lisofosfatídico	LPAR1	NM_057159
motivo PPR rico en leucina que contiene	LRPPRC	NM_133259
antígeno linfocítico 96	LY96	NM_015364
proteína cinasa cinasa 1 activada por mitógeno	MAP2K1	NM_002755
proteína cinasa 13 activada por mitógeno	MAPK13	NM_002754
metiltransferasa tipo 2A	METTL2A	NM_181725
Clon de ADNc cerebral: similar a METTL2 humano	METTL2B	NM_018396.1
Metiltransferasa tipo 2B	METTL2B	NM_018396.2
glutatión S-transferasa microsómica 3	MGST3	NM_004528
proteína ribosómica mitocondrial L30	MRPL30	NM_145212
proteína ribosómica mitocondrial L4	MRPL4	NM_146388

(continuación)

Título del gen	Símbolo del gen	Secuencia de referencia de NCBI
<b>Tabla 3B</b>		
proteína ribosómica mitocondrial S17	MRPS17	NM_015969
5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa	MTR	NM_000254
proteína de unión MYB (P160) 1a	MYBBP1A	NM_014520
vecino del gen BRCA1 1	NBR1	NM_031858
homólogo de importación nuclear 7	NIP7	NM_016101
familia NLR, dominio de pirina que contiene 12	NLRP12	NM_144687
familia de proteína nucleolar 6 (asociada con ARN)	NOL6	NM_022917
NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1	NQO1	NM_000903
proteína de unión al receptor nuclear 1	NRBP1	NM_013392
proteína de unión a nucleótido tipo	NUBPL	NM_025152
motivo 14 tipo nudix (resto X unido a difosfato de nucleósido)	NUDT14	NM_177533
proteína de interacción 1 con proteína del retraso mental por X frágil nuclear	NUFIP1	NM_012345
nucleoporina 153kDa	NUP153	NM_005124
receptor olfativo, familia 5, subfamilia B, miembro 21	OR5B21	NM_001005218
dominio PAS que contiene serina/treonina cinasa	PASK	NM_015148
PRKC, apoptosis, WT1, regulador	PAWR	NM_002583
proteína 1 asociada con PDGFA	PDAP1	NM_014891
fosfodiesterasa 1B, dependiente de calmodulina	PDE1B	NM_000924
fosforibosilformilglicinamida sintasa	PFAS	NM_012393
dominio tipo homología de Pleckstrin, familia A, miembro 3	PHLDA3	NM_012396
proteína 1 adaptadora de fosfoinositida-3-cinasa	PIK3AP1	NM_152309
cinasa 1 putativa inducida por PTEN	PINK1	NM_032409
fosfomannomutasa 2	PMM2	NM_000303
compañero de homólogo NOB1	PNO1	NM_020143
polimerasa (ARN) II (dirigido por ADN) polipéptido E, 25kDa	POLR2E	NM_002695
polimerasa (ARN) III (dirigido por ADN) polipéptido E (80kD)	POLR3E	NM_018119
proteína fosfatasa 1D dependiente de magnesio, isoforma delta	PPM1D	BC042418
factor de intercambio 1 de Rac dependiente de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato	PREX1	NM_020820
proteína 1 de interacción con prolina-serina-treonina fosfatasa	PSTPIP1	NM_003978
protimosina, alfa	PTMA	NM_016184/ 024809
RAB33B, miembro de la familia del oncogén RAS	RAB33B	NM_031296
proteína de unión a renina	RENBP	NM_002910
factor C de replicación (activador 1) 2, 40kDa	RFC2	NM_181471
ribonucleasa H1	RNASEH1	NM_002936

(continuación)

Título del gen	Símbolo del gen	Secuencia de referencia de NCBI
<b>Tabla 3B</b>		
proteína de dedo anular 146	RNF146	NM_030963
proteína de dedo anular 24	RNF24	NM_007219
proteína de dedo anular 26	RNF26	NM_032015
pseudogén Havana RP1-274L14.2-001	RP1-274L14.2-001	NM_032020
proteína ribosómica SA / ARN nucleolar pequeño, caja H/ACA 62	RPSA / SNORA62	NM_014570
dominio de ARN pseudouridilato sintasa que contiene 2	RPUSD2	NM_152260
homólogo 12 de procesamiento de ARN ribosómico	RRP12	NM_015179
receptor X retinoide, alfa	RXRA	NM_002957
receptor depurador clase B, miembro 2	SCARB2	NM_005506
proteína de unión 1 a ARNm de SERPINE1	SERBP1	NM_001018067
factor de empalme rico en prolina/glutamina	SFPQ	NM_005066
familia portadora de solutos 35, miembro B3	SLC35B3	BX538271
familia portadora de solutos 37, miembro 4	SLC37A4	NM_001467
familia portadora de solutos 5, miembro 6	SLC5A6	NM_021095
esfingomielina fosfodiesterasa 4, membrana neutra	SMPD4	NM_017751
gen hospedador de ARN nucleolar pequeño (sn) 1, caja C/D no codificante/ARNsn 26	SNHG1/SNORD26	NM_002032
gen hospedador de ARN nucleolar pequeño 12 (no codificante),	SNHG12	NM_207356
ARN nucleolar pequeño, caja H/ACA 45	SNORA45	NR_002977
ARNSn	ARNSn	Affymetrix: 7966223
miembro 27 de la familia de nexina de clasificación	SNX27	NM_030918
factor de transcripción de unión al elemento regulador del esteroil 2	SREBF2	NM_004599
RRNA SSU_rRNA_5	SSU_rRNA_5	ENST00000386723
ST3 beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 6	ST3GAL6	NM_006100
serina/treonina cinasa 17b	STK17B	NM_004226
tipo cofactor E de plegamiento de tubulina	TBCEL	NM_152715
miembro 2 de la familia tectónica	TCTN2	NM_024809
receptor tipo toll 6	TLR6	NM_006068
receptor tipo toll 9/homólogo de twinfilina 2	TLR9 /TWF2	NM_007284
proteína transmembrana 55A	TMEM55A	NM_018710
proteína transmembrana 59	TMEM59	NM_004872
proteína transmembrana 77	TMEM77	BC091509
proteína transmembrana 97	TMEM97	NM_014573
superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 10c	TNFRSF10C	NM_003841
translocasa de membrana mitocondrial externa 34	TOMM34	NM_006809

(continuación)

Título del gen	Símbolo del gen	Secuencia de referencia de NCBI
<b>Tabla 3B</b>		
homólogo de translocasa de membrana mitocondrial externa 40	TOMM40	BC001779
homólogo de translocasa de membrana mitocondrial externa 5 /proteína de caja F 10	TOMM5 / FBXO10	NM_012166
proteína 3 inducible por proteína tumoral p53	TP53I3	NM_004881
proteína nuclear 1 inducible por proteína tumoral p53	TP53INP1	NM_033285
tiorredoxina reductasa 1	TXNRD1	NM_003330
enzima de conjugación de modificador de plegamiento de ubiquitina 1	UFC1	NM_016406
peptidasa 10 específica de ubiquitina	USP10	NM_005153
proteína 3 de membrana asociada con vesícula (celubrevina)	VAMP3	NM_004781
valil-ARNt sintetasa	VARS	NM_006295
homólogo A de clasificación 37 de proteína vacuolar	VPS37A	NM_152415
proteína de dedo de zinc 211	ZNF211	NM_006385
proteína de dedo de zinc 223	ZNF223	NM_013361
proteína de dedo de zinc 561	ZNF561	NM_152289
proteína de dedo de zinc 79	ZNF79	NM_007135
ácido graso sintasa	FASN	NM_004104
<p><b>Leyenda de tabla 3.</b> La tabla muestra los genes del perfil encontrados por la prueba t y la eliminación regresiva. Los genes se anotaron utilizando la base de datos NetAffx de Affymetrix (<a href="http://www.affymetrix.com">www.affymetrix.com</a>, Santa Clara, EE. UU.). Cuando se encontró, la identificación de Unigene (<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/">www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/</a>) se eligió como el identificador del gen. En los doce casos en los que no se identificó la identificación de Unigene, se proporcionó la mejor identificación alternativa. Los nombres y las identificaciones de los genes se verificaron con la base de datos de IPA en donde 189 de los 200 se pudieron emparejar. En un caso, solo se informó una identificación de Affymetrix. Se eliminaron 6 genes duplicados.</p>		

**Tabla 4.** Funciones dominantes en la "firma de predicción". Se investigaron funcionalmente 184 de las 200 moléculas utilizando IPA. Solo se informaron las funciones rellenas con 15 o más moléculas.

Función	Cantidad de moléculas de la firma	Nombres de moléculas	Subfunciones más importantes
bioquímica de moléculas pequeñas	38	ABHD5, ACLY, ALDH18A1, BLMH, CD86, CSGALNACT2, CYP51A1, DHCR24, DHCR7, DNAJC5, FAS, FASN, FDXR, GLRX, GNPAT1, HMGCR, HMOX1, IRS2, LPAR1, LY96, MGST3, MTR, NQO1, PASK, PDE1B, PINK1, PMM2, RENBP, RXRA, SLC25A32, SLC37A4, SLC5A6, SMPD4, SQLE, SREBF2, ST3GAL6, TLR6, TMEM55A	Metabolismo (23), biosíntesis (14), modificación (12), síntesis (10)
muerte celular	33	CD33, DDX19A, DHCR24, DNAJB9, DNAJC5, FAS, FASN, FDXR, FOXO4, GLRX, GNPAT1, GSR, HIST1H1C, HMGB3, HMOX1, IRS2, LPAR1, MAP2K1, MAPK13, NQO1, PAWR, PDE1B, PHLDA3, PINK1, PPM1D, RXRA, SERBP1, SPRY2, STK17B, TLR6, TNFRSF10C, TP53INP1, TXNRD1	Apoptosis (30), muerte celular (13)

(continuación)

<b>Función</b>	<b>Cantidad de moléculas de la firma</b>	<b>Nombres de moléculas</b>	<b>Subfunciones más importantes</b>
Metabolismo de lípidos	24	ABHD5, ACLY, CYP51A1, DHCR24, DHCR7, FAS, FASN, FDXR, HMGCR, HMOX1, IRS2, LPAR1, LY96, MGST3, PASK, RENBP, RXRA, SLC37A4, SMPD4, SQLE, SREBF2, ST3GAL6, TLR6, TMEM55A	Metabolismo (17), modificación (11), síntesis (10)
Desarrollo del sistema hematológico	19	CARM1, CD33, CD86, FAS, FOXO4, HIST1H1C, HMGB3, HMGCR, HMOX1, IRS2, LY96, NBR1, NQO1, PAWR, PIK3AP1, PPM1D, STK17B, TP53INP1, VAMP3	Proliferación (10), apoptosis (5)
crecimiento y proliferación celular	16	CARM1, CD33, CD86, FAS, FOXO4, HIST1H1C, HMGB3, HMGCR, HMOX1, IRS2, LY96, NBR1, NQO1, PAWR, PIK3AP1, PPM1D, STK17B, TP53INP1, VAMP3	Proliferación (16), crecimiento (4)
Transporte molecular	15	CARM1, CD33, CD86, FAS, FOXO4, HIST1H1C, HMGB3, HMGCR, HMOX1, IRS2, LY96, NBR1, NQO1, PAWR, PIK3AP1, PPM1D, STK17B, TP53INP1, VAMP3	Acumulación (8), cantidad (5)
ciclo celular	15	DNAJB4, DTD1, FAS, FASN, FOXO4, GDF11, HBP1, HMOX1, IRS2, MAP2K1, PAWR, PPM1D, SFPQ, SPRY2, TP53INP1	Avance del ciclo celular (13), división celular (5)
Metabolismo de hidratos de carbono	15	DNAJB4, DTD1, FAS, FASN, FOXO4, GDF11, HBP1, HMOX1, IRS2, MAP2K1, PAWR, PPM1D, SFPQ, SPRY2, TP53INP1	Metabolismo (9), biosíntesis (5)

**Tabla 5.** Algoritmo de máquinas de vectores soporte (SVM)

```

filnamnTraining<-"training set.txt"
filnamnTest<-"test set.txt"
lista <- read.delim("biomarker signature.txt",header=FALSE) # EN FIL
MED DE ANALYTER

lista <- as.character(lista[[1]])
listaBoolean <- is.element(ProteinNames, lista)

group1<- "pos"
group2<- "neg"

rawfile <- read.delim(filnamnTraining)
samplenames <- as.character(rawfile[,1])
groupsTraining <- rawfile[,2]
dataTraining <- t(rawfile[,-c(1,2)])
ProteinNames <- read.delim(filnamnTraining,header=FALSE)
ProteinNames <- as.character(as.matrix(ProteinNames)[1,])
ProteinNames <- ProteinNames[-(1:2)]

listaBoolean <- is.element(ProteinNames, lista)

rownames(dataTraining) <- ProteinNames
    
```

## ES 2 639 406 T3

```
colnames(dataTraining) <- samplenames
logdataTraining <- dataTraining
logdataTraining <- logdataTraining[listaBoolean,]

rawfile <- read.delim(filnamnTest)
samplenames <- as.character(rawfile[,1])
groupsTest <- rawfile[,2]
dataTest <- t(rawfile[,-c(1,2)])
ProteinNames <- read.delim(filnamnTest,header=FALSE)
ProteinNames <- as.character(as.matrix(ProteinNames)[1,])
ProteinNames <- ProteinNames[-(1:2)]
rownames(dataTest) <- ProteinNames
colnames(dataTest) <- samplenames
logdataTest<-dataTest
logdataTest <- logdataTest[listaBoolean,]

svmfacTraining<- factor(rep('rest',ncol(logdataTraining)),levels=c(group1,
group2, 'rest'))
subset1Training<- is.element(groupsTraining ,
strsplit(group1,",")[[1]])
subset2Training<- is.element(groupsTraining ,
strsplit(group2,",")[[1]])
svmfacTraining[subset1Training] <- group1
svmfacTraining[subset2Training] <- group2
facTraining <-factor(as.character(svmfacTraining
[subset1Training|subset2Training]),levels=c(group1,group2))

svmfacTest<- factor(rep('rest',ncol(logdataTest)),levels=c(group1, group2,
'rest'))
subset1Test<- is.element(groupsTest , strsplit(group1,",")[[1]])
subset2Test<- is.element(groupsTest , strsplit(group2,",")[[1]])
svmfacTest[subset1Test] <- group1
svmfacTest[subset2Test] <- group2
facTest <-factor(as.character(svmfacTest
[subset1Test|subset2Test]),levels=c(group1,group2))
n1 <- sum(facTest ==levels(facTest ) [1])
n2 <- sum(facTest ==levels(facTest ) [2])
nsamples <- n1+n2
SampleInformation <- paste(levels(facTest ) [1]," ",n1," ", " ",levels(facTest
) [2]," ",n2,sep="")

svmtrain <- svm(t(logdataTraining) , facTraining , kernel="linear" )
pred<-predict(svmtrain , t(logdataTest) , decision.values=TRUE)
res<-attr(pred, "decision.values")
names <- colnames(logdataTest, do.NULL=FALSE)
orden <- order(res , decreasing=TRUE)
Samples <- data.frame(names[orden],res[orden],facTest[orden])
ROCdata <- myROC(res,facTest)
SenSpe <- SensitivitySpecificity(res,facTest)

ROCplot(list(SampleInformation=SampleInformation,ROCarea=ROCdata[1],p
.value=ROCdata[2],SenSpe <- SenSpe,samples=Samples),
sensspecnumber=4)
```

```
# las filas en azul son necesarias solamente para la evaluación de ROC.
# para evaluar una muestra desconocida, escribir res.
# (vector con valores de predicción)
```

5

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para identificar agentes capaces de inducir la sensibilización de la piel de mamíferos, en el que los agentes son capaces de inducir y desencadenar una reacción de hipersensibilidad retardada de tipo IV en un mamífero que comprende o consiste en las siguientes etapas:

- 5 a) exponer una población de células dendríticas o una población de células de tipo dendríticas a un agente de prueba; y  
b) medir en las células la expresión de dos o más biomarcadores seleccionados del grupo definido en la tabla 3A;

en el que la expresión en las células de los dos o más biomarcadores medidos en la etapa (b) indica el efecto sensibilizador del agente de prueba.

- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que además comprende exponer una población separada de las células dendríticas o de las células de tipo dendríticas, a un agente de control negativo que no sensibiliza la piel humana, y medir en las células la expresión de los dos o más biomarcadores medidos en la etapa (b) y/o exponer una población separada de las células dendríticas o de las células de tipo dendríticas, a un agente de control positivo que sensibiliza la piel humana, y medir en las células la expresión de los dos o más biomarcadores medidos en la etapa (b).

3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) comprende medir la expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en:

- 20 i) receptor del sabor, tipo 2, miembro 5 (TAS2R5),  
ii) proteína similar al factor de crecimiento de queratinocitos 1/2/proteína hipotética FLJ20444 (KGFLP1/2/FLJ20444),  
iii) transformación 1 anterior posterior transmembrana (TAPT1),  
iv) homólogo 2 sprouty (SPRY2),  
v) ácido graso sintasa (FASN),  
25 vi) CLL/linfoma de linfocitos B 7A (BCL7A),  
vii) familia portadora de solutos 25, miembro 32 (SLC25A32),  
viii) ferritina, pseudogén de polipéptido pesado 1 (FTHP1),  
ix) ATPasa, transportadora de H<sup>+</sup>, lisosómica de 50/57kDa, V1 subunidad H (ATP6V1H),  
x) escualeno epoxidasa (SQLE) y  
xi) grupo de histona 1, H1e (HIST1H1E).

- 30 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) comprende o consiste en medir la expresión de al menos 2 biomarcadores de la tabla 3A, por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 biomarcadores de la tabla 3A.

- 35 5. El procedimiento de acuerdo una con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) comprende o consiste en medir la expresión de al menos 2 biomarcadores de la tabla 3B, por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183 o al menos 184 biomarcadores de la tabla 3B.

6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) comprende medir la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica los dos o más biomarcadores.

- 45 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la medición de la expresión de los dos o más biomarcadores en la etapa (b), se realiza utilizando dos o más restos de unión, cada uno capaz de unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica uno de los biomarcadores identificados en la tabla 3A.

- 50 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (b) comprende medir la expresión de la proteína de los dos o más biomarcadores.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la medición de la expresión de los dos o más biomarcadores en la etapa (b), se realiza utilizando dos o más restos de unión, cada uno capaz de unirse selectivamente a uno de los biomarcadores identificados en la tabla 3A.

- 55 10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) se realiza utilizando una matriz.



11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población de células dendríticas o la población de células de tipo dendríticas es una población de células de tipo dendríticas.
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que las células de tipo dendríticas son células de tipo dendríticas mieloides, seleccionadas del grupo que consiste en KG-1, THP-1, U-937, HL-60, Monomac-6, AML-193 y MUTZ-3.
13. Una matriz para su uso en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los restos de unión de la matriz consisten en restos de unión de entre 10 y 194 de los biomarcadores definidos en la tabla 3, y en la que los restos de unión de la matriz comprenden dos o más restos de unión tal como se define en la reivindicación 7 y/o en la reivindicación 9.
14. El uso de dos o más biomarcadores seleccionados del grupo definido en la tabla 3A en combinación para identificar agentes sensibilizadores de respuesta de hipersensibilidad.
15. Un kit analítico para su uso en un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende:
- A) una matriz de acuerdo con la reivindicación 13; y
  - B) instrucciones para realizar el procedimiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

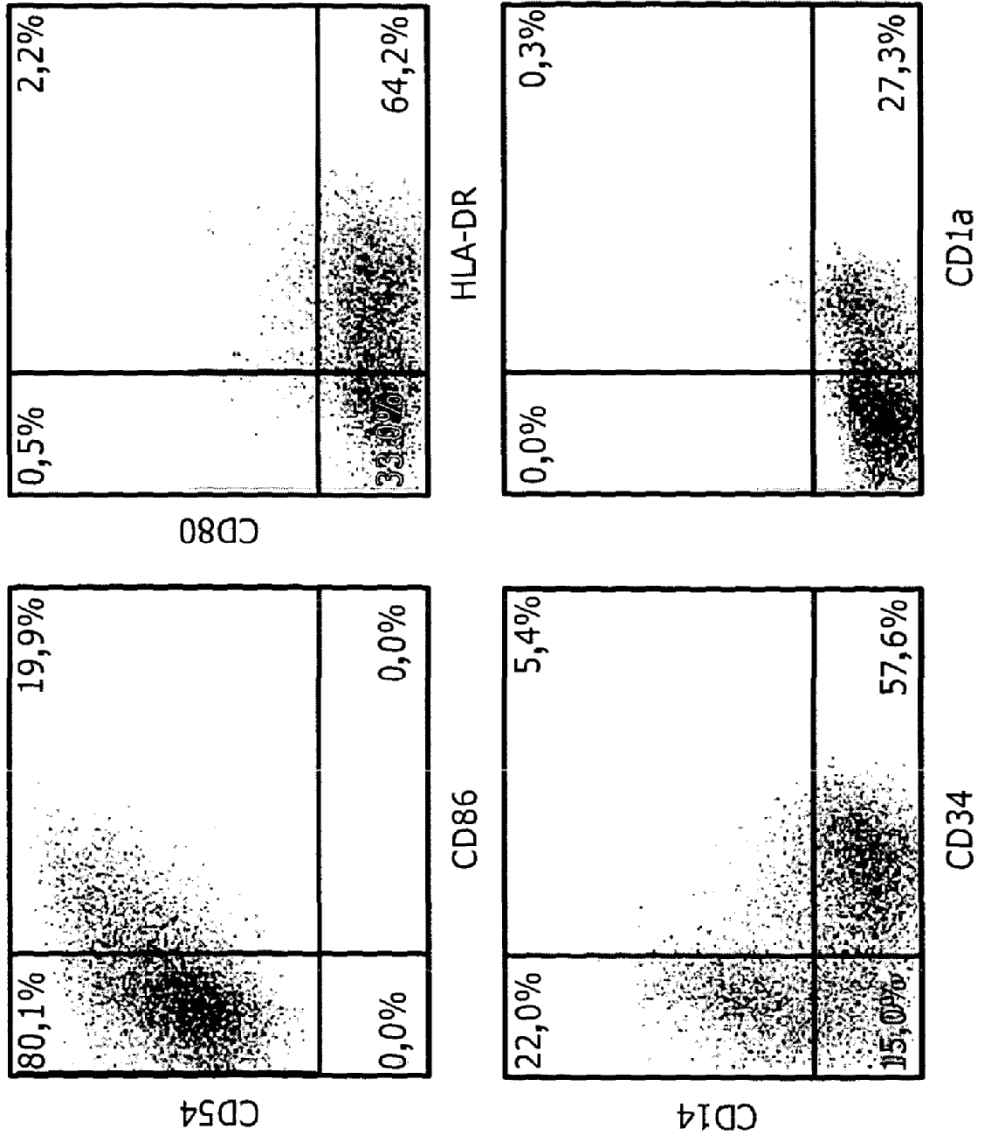


Figura 1

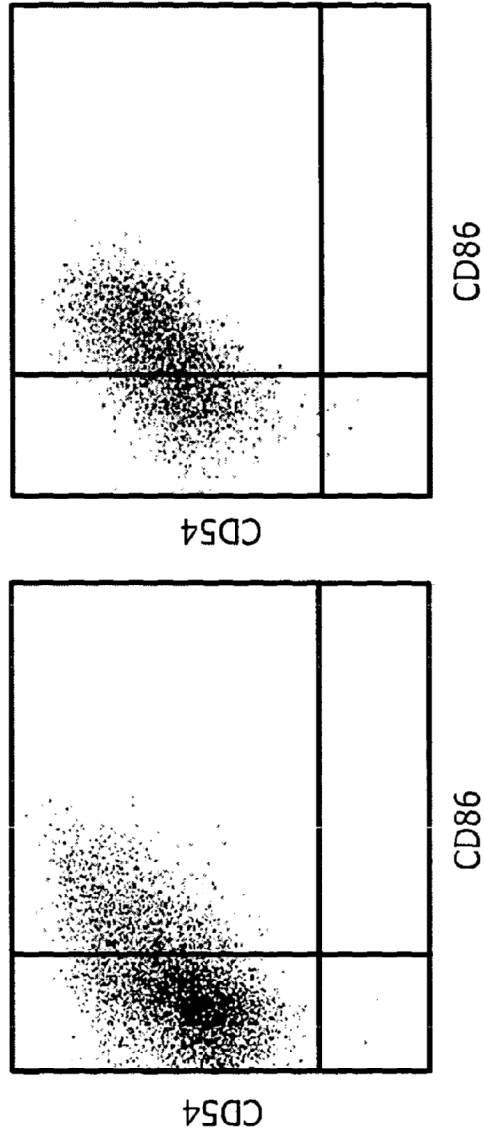


Figura 2A

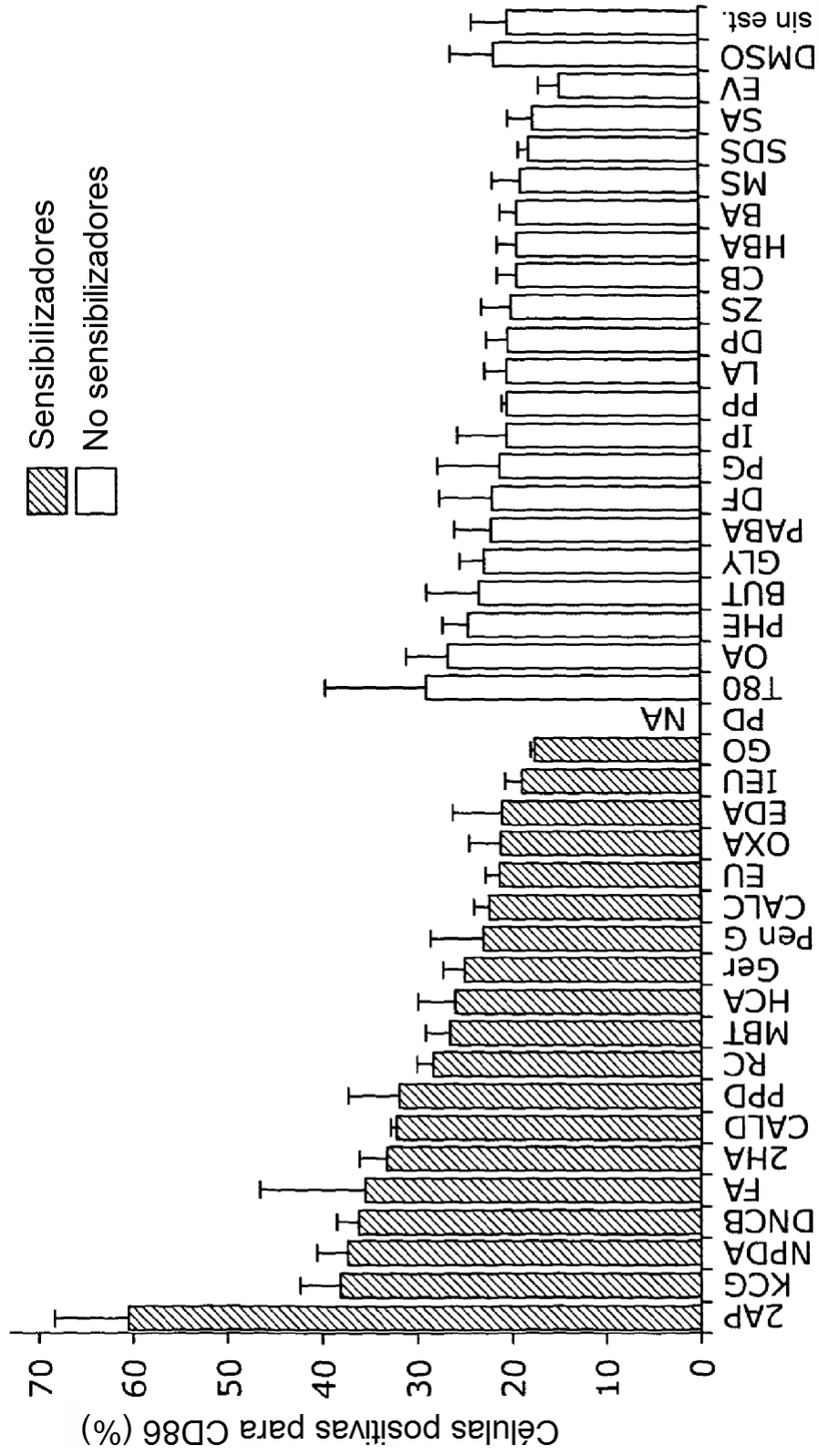


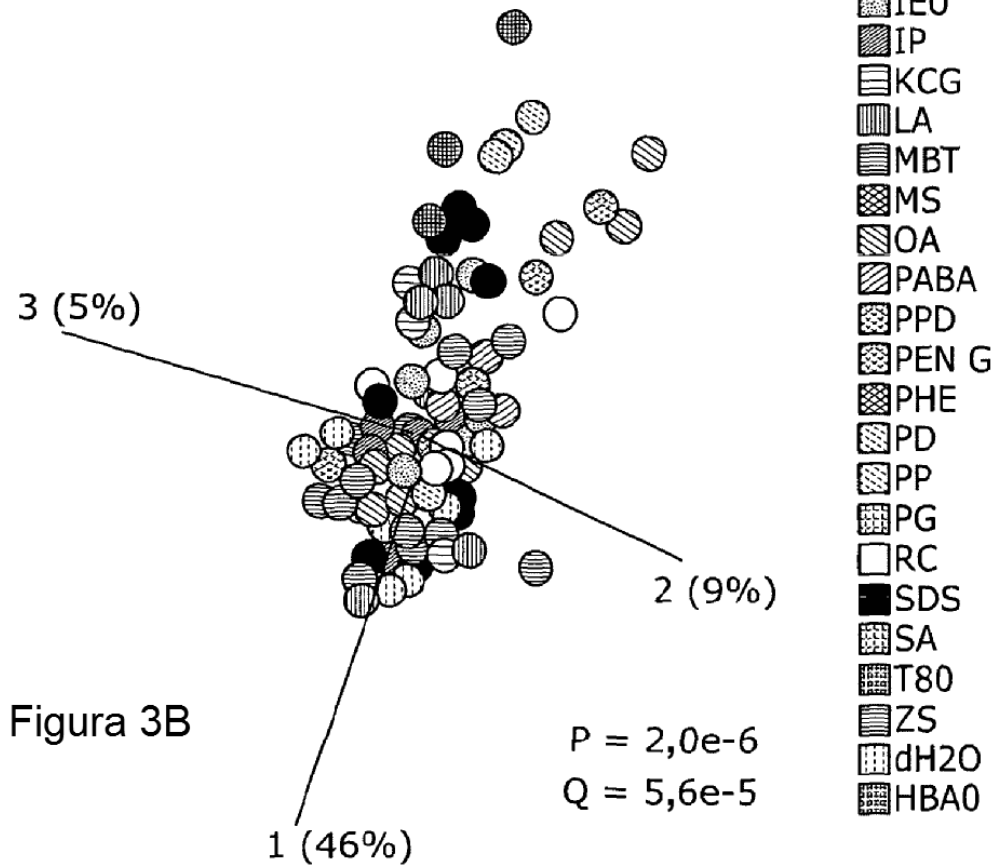
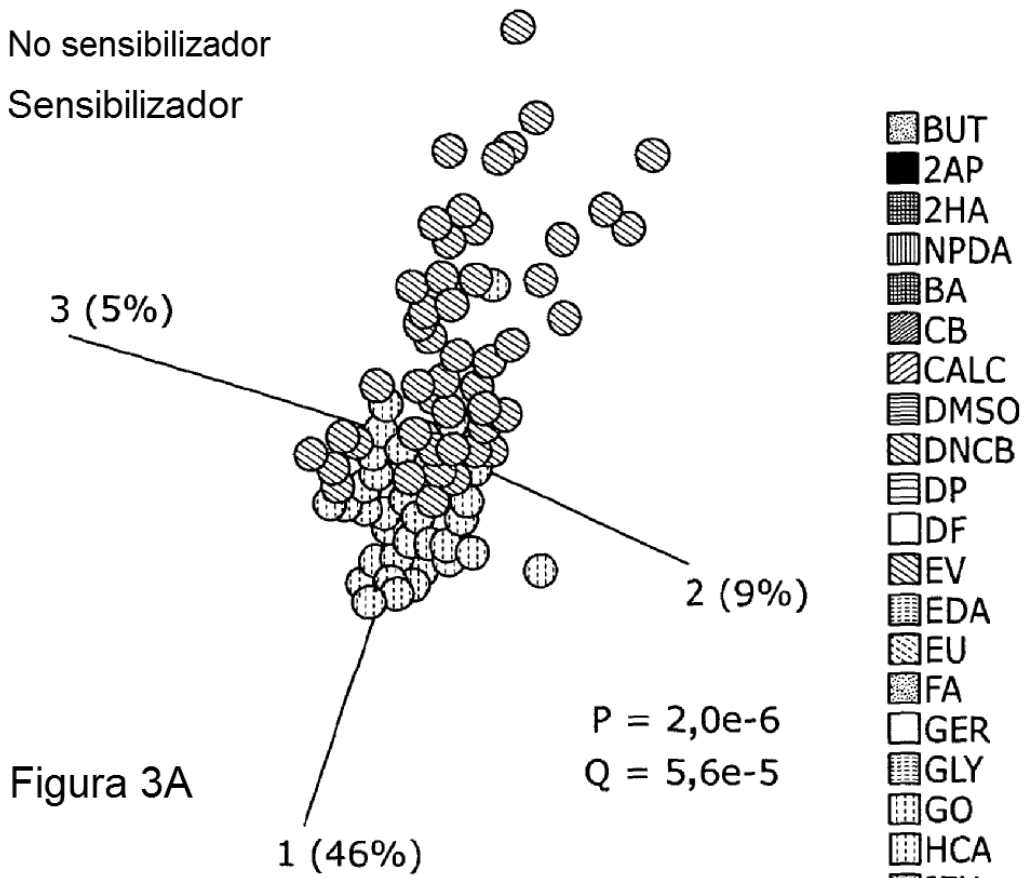


Figura 2B

 No sensibilizador  
 Sensibilizador



-  BUT
-  2AP
-  2HA
-  NPDA
-  BA
-  CB
-  CALC
-  DMSO
-  DNCB
-  DP
-  DF
-  EV
-  EDA
-  EU
-  FA
-  GER
-  GLY
-  GO
-  HCA
-  IEU
-  IP
-  KCG
-  LA
-  MBT
-  MS
-  OA
-  PABA
-  PPD
-  PEN G
-  PHE
-  PD
-  PP
-  PG
-  RC
-  SDS
-  SA
-  T80
-  ZS
-  dH2O
-  HBA0

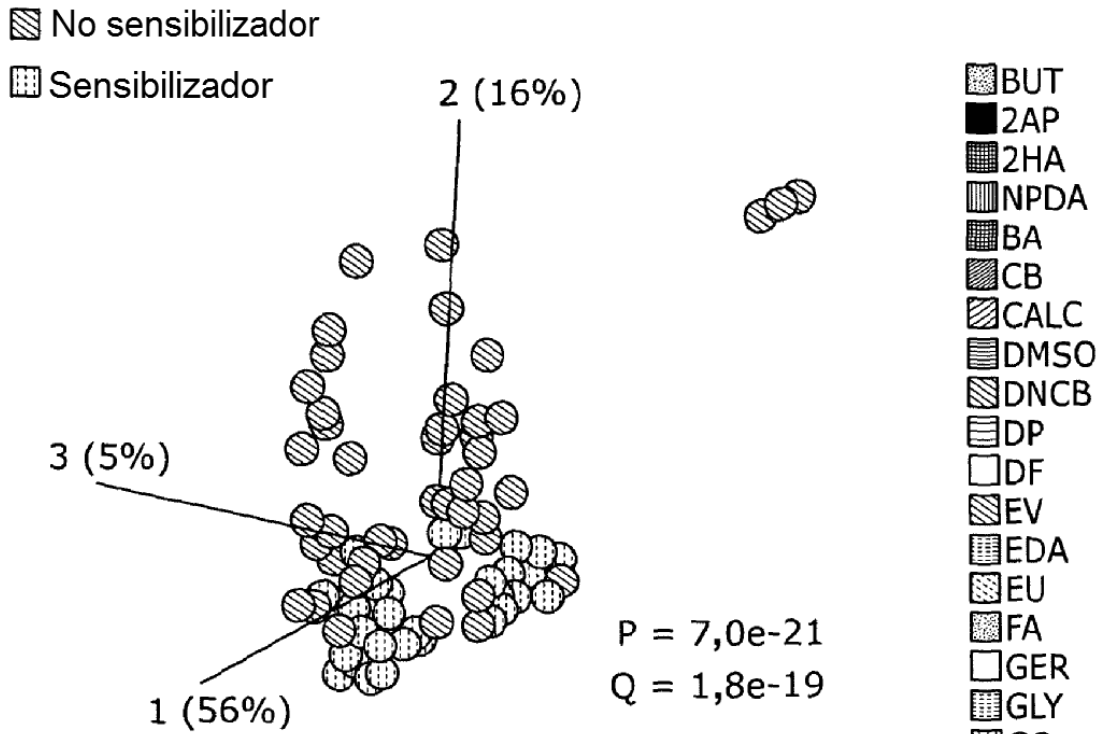


Figura 3C

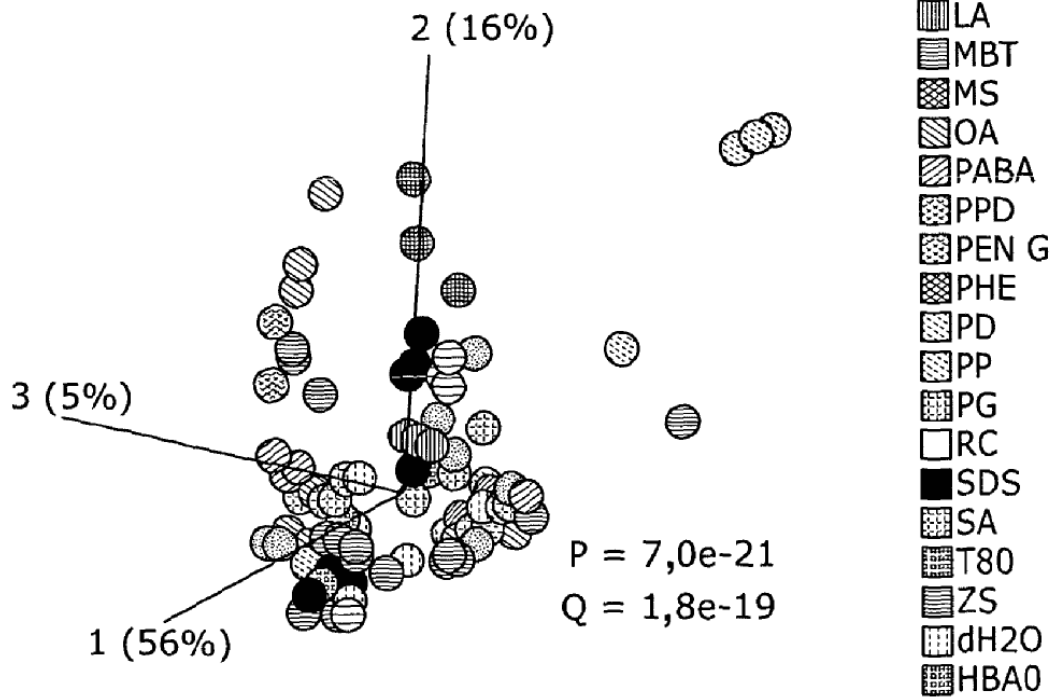


Figura 3D

- BUT
- 2AP
- 2HA
- NPDA
- BA
- CB
- CALC
- DMSO
- DNCB
- DP
- DF
- EV
- EDA
- EU
- FA
- GER
- GLY
- GO
- HCA
- IEU
- IP
- KCG
- LA
- MBT
- MS
- OA
- PABA
- PPD
- PEN G
- PHE
- PD
- PP
- PG
- RC
- SDS
- SA
- T80
- ZS
- dH2O
- HBA0

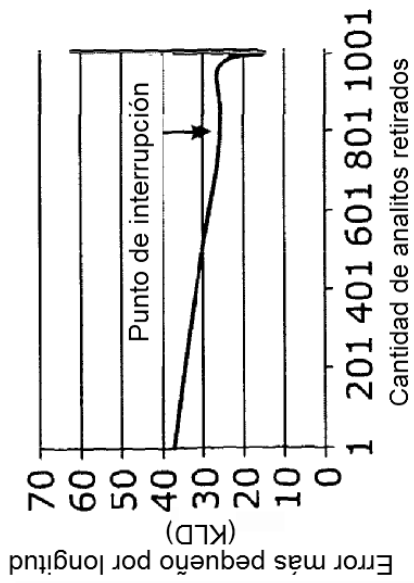


Figura 4A

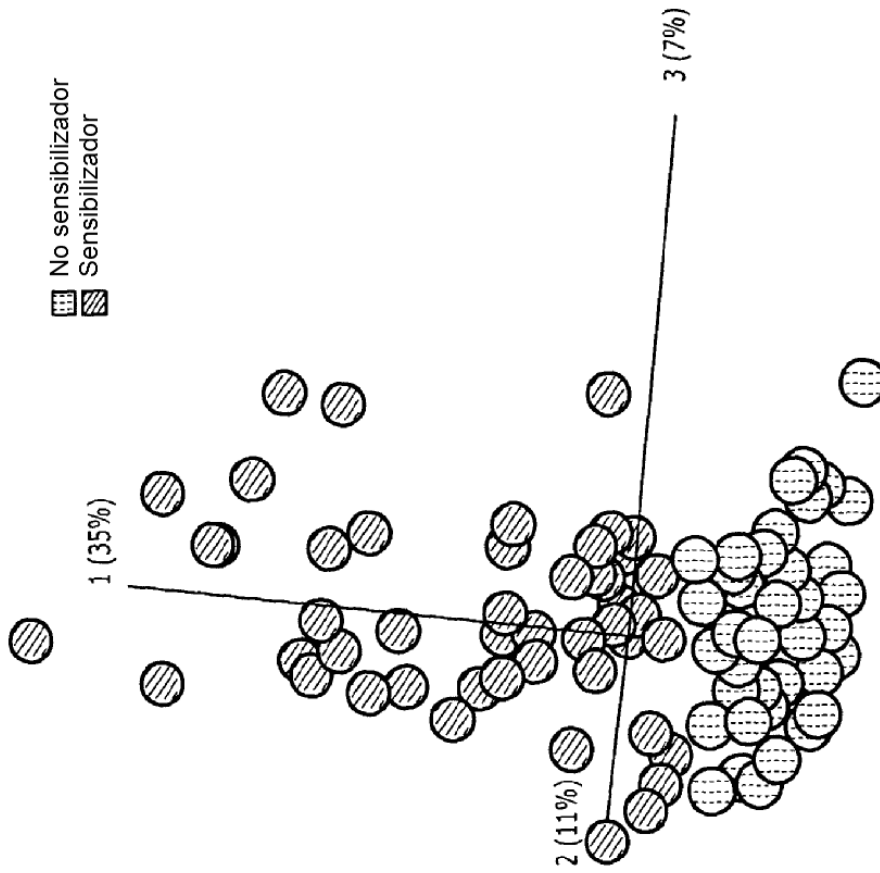


Figura 4B

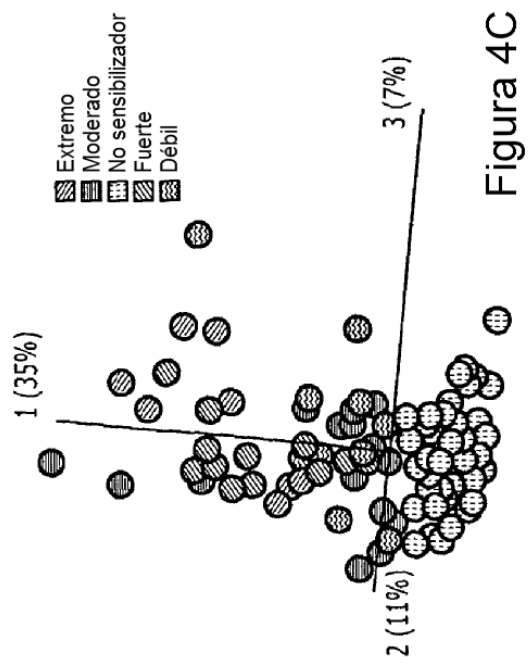


Figura 4C

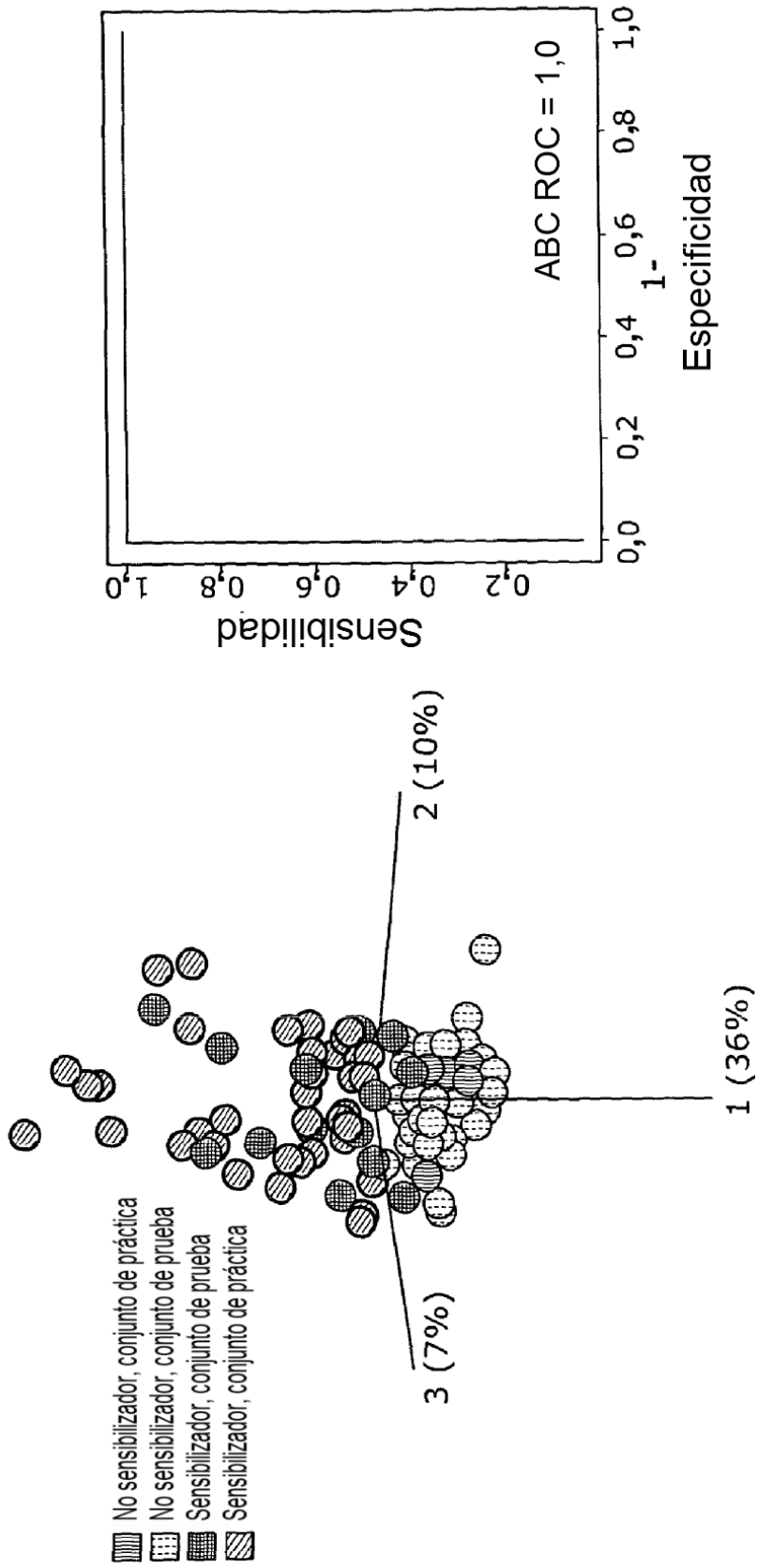


Figura 5



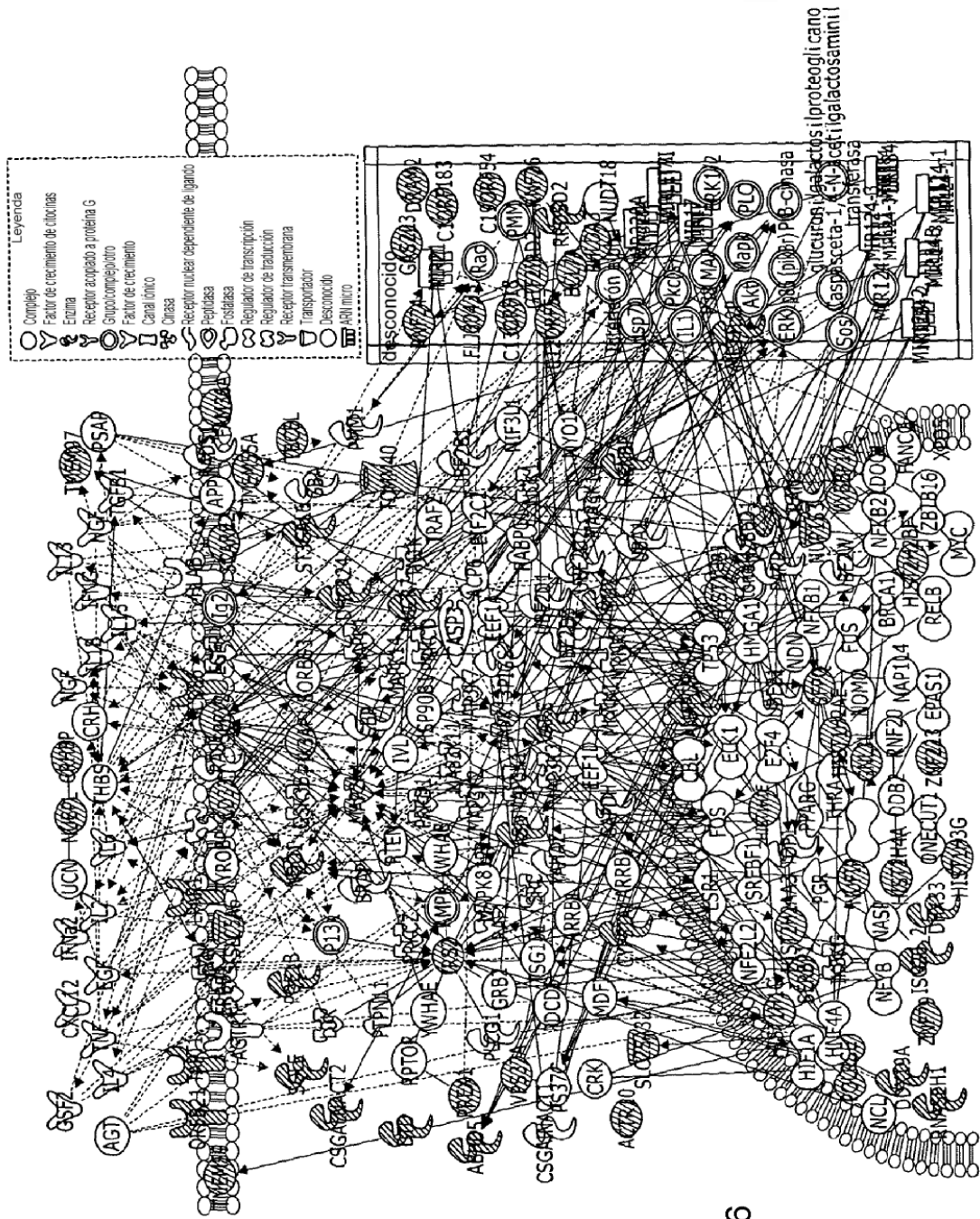


Figura 6