

NOTA CLÍNICA



Gaceta Médica de Bilbao. 2013;110(2):40-47

Aplicabilidad clínica de tecnología de hibridación de ácidos nucleicos a gran escala (micromatrices o microarrays) en estudios de alergia

A. San Miguel, A. Armentia Medina, B. Martín.

Servicios de Análisis Clínicos y Alergia. Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid.

Recibido el: 27 de septiembre de 2012; aceptado el 21 de octubre de 2012

PALABRAS CLAVE

Microarray;
alergia.

Resumen: Los microarrays aplicados a la Alergología están basados en la moderna tecnología de los biochips. Permite medir simultáneamente en un solo test anticuerpos específicos frente a componentes alérgicos múltiples. El microarray proporciona resultados para más de un centenar de componentes de más de 50 fuentes alérgicas. El ImmunoCAP ISAC (Immuno Solid-Phase Allergen Chip), es una herramienta útil, en particular para los casos más complejos, como los que tienen una historia clínica inconsistente, una respuesta insatisfactoria al tratamiento o pacientes polisensibilizados. Además del chip IgE, hay chips para medir los anticuerpos IgG y anticuerpos IgG4. Hasta hace poco tiempo, estas técnicas se han utilizado en investigación cuyos objetivos eran valorar hipersensibilidad alérgica a cannabis, heroína y morfina, en grupos de pacientes consumidores de heroína y otras drogas de abuso, que acuden a Centros de drogodependencias y en pacientes alérgicos atendidos en los Hospitales. Se han podido diagnosticar reacciones adversas graves a morfínicos que podrían haber sido evitadas. Si la detección de sensibilización a heroína y morfínicos (opiáceos) fuera posible por estas técnicas, se abriría una vía diagnóstico-terapéutica con importantes repercusiones sociales, legales y de salud. También se tendría un nuevo método para prevenir anafilaxias intraoperatorias por morfínicos y otros eventos adversos en el tratamiento del dolor.

© 2013 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Microarray;
allergy.

Large-scale clinical applicability of nucleic acid hybridization technology (microarrays) in allergy studies

Abstract: Microarrays applied to the Allergology are based on the modern technology of the biochips which takes advantage of the ability to measure in a single test specific antibodies to multiple allergen components. The microarray provides results for more than one hundred components from nearly 50 different allergen sources. ImmunoCAP

ISAC (Immuno Solid-Phase Allergen Chip) is a multiarray technology package designed for the assessment of patients with a history inconsistent, unsatisfactory response to treatment or polysensitized patients. Specific IgE, IgG and IgG4 antibodies can be measured. Until recently, these techniques have been used in research to assess allergy to cannabis, heroin and morphine in drug abusers from rehabilitation centers and allergic patients treated in hospitals. Today, it is possible to diagnose severe adverse reactions to morphine that could have been avoided. If sensitization to heroin and morphine (opiates) may result from these techniques, a diagnostic-therapeutic pathway with important social, legal and health implications would open. Also would provide a new method to prevent intraoperative anaphylaxis by morphine and other adverse events in the treatment of pain.

© 2013 Academia de Ciencias Médicas de Bilbao. All rights reserved.

Introducción

Las reacciones alérgicas de tipo inmediato son mediadas por inmunoglobulinas de clase IgE. Las manifestaciones clínicas más frecuentes tras la exposición a determinados alérgenos son: asma, alergia al polen, eccema atópico y síntomas gastrointestinales (1,2).

La identificación del patrón de sensibilización frente a componentes alérgenos específicos y/o de reactividad cruzada contribuye a una evaluación diagnóstica más detallada del paciente alérgico (3,4).

El diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de un solo método diagnóstico, sino que se debe hacer sólo después de haber evaluado todos los datos clínicos y analíticos. En las alergias alimentarias los anticuerpos IgE circulantes pueden ser indetectables a pesar de una historia clínica convincente ya que estos anticuerpos pueden estar dirigidos frente a alérgenos que pueden ser alterados durante el proceso industrial, la cocción o la digestión y no estar presentes en el alimento original frente al que se está testando al paciente.

Los anticuerpos IgE específicos circulantes resultan indetectables o ausentes frente a venenos de clase 0. Por este motivo los resultados obtenidos no excluyen la existencia de una presente o futura hipersensibilidad clínica

frente a la picadura de insecto.

Los microarrays o micromatrices aplicada a la Alergología están basados en la moderna tecnología de los biochips. El ImmunoCAP ISAC (Phadia Uppsala, Suecia), es un test diagnóstico in vitro muy avanzado que emplea la tecnología biochip. Permite medir simultáneamente

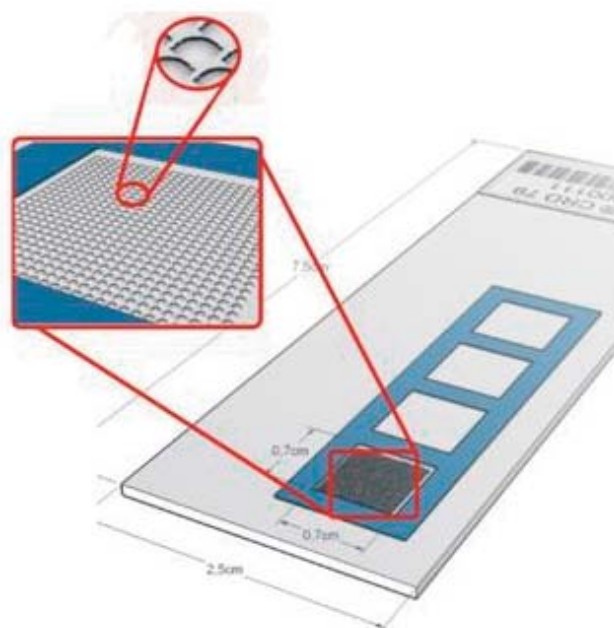


Figura 2. Esquema del ImmunoCAP ISAC.

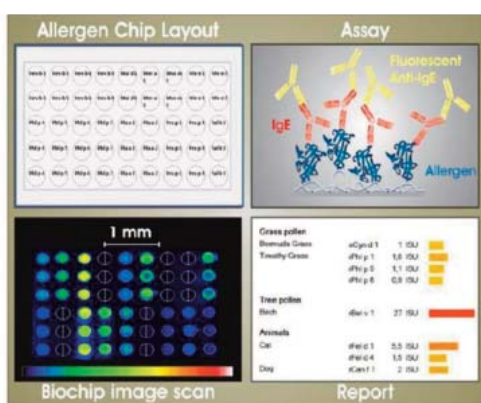


Figura 1. Esquema de distribución de los componentes alérgicos en el microarray. Seguido del esquema del ensayo. Imagen del barrido del microscopio confocal de fluorescencia con iluminación láser que muestra diferentes intensidades, que van del negro (negativo) al blanco (positivo fuerte) en una escala de colores falsos. E informe del ensayo ImmunoCAP ISAC IgE.

en un solo test anticuerpos específicos frente a componentes alérgicos múltiples (103), empleando únicamente pocos μ l de suero o plasma. El microarray proporciona resultados para más de un centenar de componentes de más de 50 fuentes alérgicas. Los alérgenos se seleccionan previamente e incluyen marcadores para la reactividad cruzada (5-9).

El ImmunoCAP ISAC (Immuno Solid-Phase Allergen Chip), es una herramienta útil, en particular para los casos más complejos, como los que tienen una historia clínica inconsistente, una respuesta insatisfactoria al tratamiento o pacientes polisensibilizados. Además del chip IgE, hay chips para medir los anticuerpos IgG y anticuerpos IgG4 (10-12) (Figura 1).

El ImmunoCAP ISAC IgE es un ensayo in vitro para la determinación semicuantitativa de los anticuerpos IgE específicos en suero o plasma humano. Está concebido

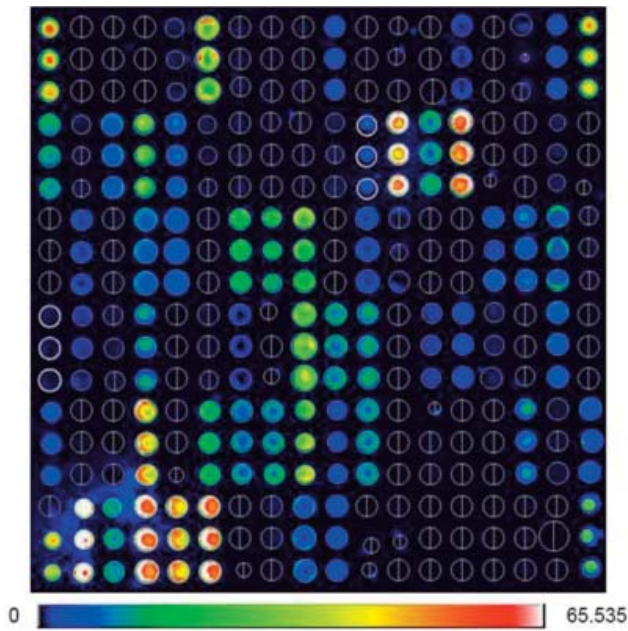


Figura 3. Exploración de ImmunoCAP ISAC. Los alérgenos están alineados de tres en tres y en vertical. Para visualizar el resultado de la fluorescencia, la imagen se muestra en el modo de colores falsos. Debajo está la escala lineal de la pantalla de colores falsos.

para su uso en el diagnóstico in vitro junto con otros resultados clínicos. Es una plataforma multiplexin y de microinmunoensayos que permite determinar, en el panel actual, hasta 103 componentes alérgenos, nativos y recombinantes de aeroalergenos, alimentos y drogas, pudiendo proporcionar un perfil de sensibilización del paciente alérgico de una manera más específica y completa.

El ImmunoCAP ISAC IgE es un inmunoensayo de fase sólida. Los componentes alérgenos que están inmovilizados en un sustrato sólido en un formato de microarray se incuban con muestras de suero o plasma humano para detectar anticuerpos IgE específicos. La unión de los anticuerpos IgE específicos a los componentes alérgenos inmovilizados se detecta añadiendo un anticuerpo anti-IgE humano marcado mediante fluorescencia secundaria. El proceso sigue con la adquisición de imágenes utilizando un escáner para microarray adecuado. Se determinan las unidades estándar ISAC para IgE específico (ISU) y los resultados son determinados mediante el propio software (MIA, microarray image analysis software) (13,14).

Los componentes de alérgenos purificados se inmovilizan en el biochip. Es un ensayo de dos fases, los anticuerpos del suero del paciente se unen a los componentes de alérgenos inmovilizados. Tras una fase de lavado breve, se detectan los anticuerpos unidos a los alérgenos mediante un anticuerpo fluorescente. Los resultados del test se calculan con un escáner de biochip y se evalúan empleando el software Phadia MIA. ImmunoCAP ISAC es una prueba semicuantitativa y los resultados se expresan en unidades ISAC Standardised Units (ISU) (figura 2). Hasta el momento actual, estas técnicas se han utilizado en proyectos de investigación

cuyos objetivos eran valorar hipersensibilidad alérgica a cannabis, heroína y morfina, en grupos de pacientes consumidores de heroína y otras drogas de abuso, que acuden a Centros de drogodependencias y en pacientes alérgicos atendidos en los Hospitales. Se han podido diagnosticar reacciones adversas graves a morfínicos que podrían haber sido evitadas.

Si la detección de sensibilización a heroína y morfínicos (opíaceos) fuera posible por estas técnicas, se abriría una vía diagnóstico-terapéutica con importantes repercusiones sociales, legales y de salud. También se tendría un nuevo método para prevenir anafilaxias intraoperatorias por morfínicos y otros eventos adversos en el tratamiento del dolor, por lo que su utilidad en seguridad alcanzaría a todos los pacientes que fueran intervenidos quirúrgicamente o tratados con analgésicos mayores. Los resultados de ImmunoCAP ISAC dan un valor de extremada utilidad para:

- Una mejor y más específica definición del patrón de sensibilización del paciente.
- Una herramienta que nos ayuda a instaurar una mas adecuada y eficaz inmunoterapia específica.

Las pruebas in vitro basadas en componentes alérgénicos permitiran caracterizar con gran detalle los perfiles de sensibilización de los pacientes.

La cuantificación de los anticuerpos IgE tanto frente a componentes alérgénicos específicos como a componentes de reactividad cruzada contribuiran a identificar nuevas fuentes alérgénica sensibilizante.

Aunque es una técnica analítica, precisa para su interpretación en el aspecto de hipersensibilidad a alimentos y fármacos, los conocimientos de la especialidad de Alergología, aunque al ser inicialmente una técnica aplicada a investigación, sería útil para otras especialidades biomédicas.

Para analizar ImmunoCAP ISAC IgE, se recomienda utilizar el software MIA (microarray image analyzer).

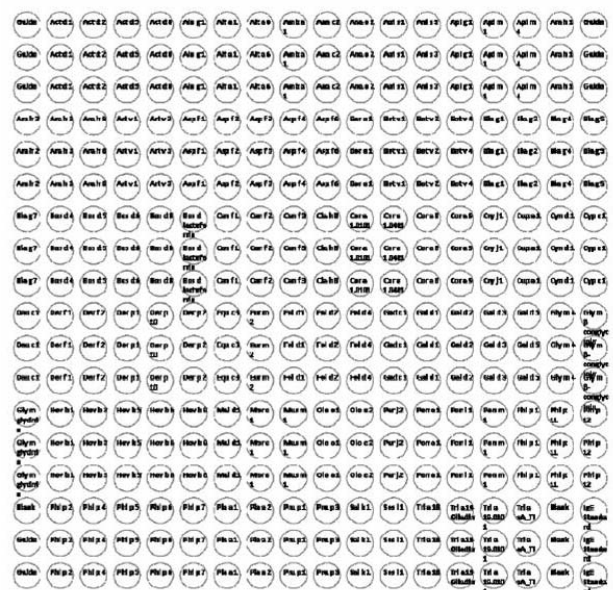


Figura 4. Distribución de la matriz ImmunoCAP ISAC. Posiciones y nombres de 103 componentes alérgenos.

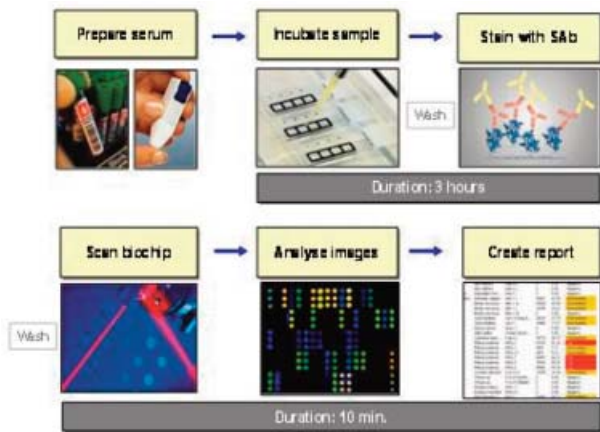


Figura 5. Esquema del procedimiento del ensayo.

Éste facilita el análisis automático de ImmunoCAP ISAC IgE. Se analizan las imágenes de exploración del chip y los resultados se guardan en una base de datos y se notifican al usuario. MIA cuenta con una interfaz para exportar los datos de ImmunoCAP ISAC IgE a ImmunoCAP Information Data Manager (IDM).

El ImmunoCAP ISAC IgE es un método semicuantitativo en el que los anticuerpos IgE específicos de los componentes alérgenos se expresan en unidades arbitrarias, ISU (unidades estándar ISAC para IgE). Los resultados se presentan de forma semi-cuantitativa en 4 rangos (tabla 1). El software MIA proporciona directamente éstos resultados (Figuras 3 y 4).

Utilidad de la técnica de microarray

Estamos asistiendo a un incremento de las enfermedades alérgicas en la población joven. La prevalencia aumenta en los consumidores de tabaco y en las ciudades. En la Comunidad Autónoma de Castilla y León se estima

que existen más de 500.000 alérgicos (datos de la Asociación Castellano Leonesa de Alergia). Los alérgenos más importantes son los vegetales y los fármacos.

Nunca se ha hablado de la posible sensibilización alérgica a drogas, al considerar que las reacciones a las mismas se deberían a causas tóxicas y la hipersensibilidad alérgica a causas inmunológicas, entendiendo ambas causas como excluyentes. Sin embargo, no hay ninguna publicación que demuestre que ambos mecanismos sean independientes.

Todos los clínicos utilizan medicamentos, drogas en sí, que pueden causar efectos tóxicos y reacciones de hipersensibilidad en pacientes susceptibles. La seguridad en su aplicación es una de nuestras mayores responsabilidades.

Nuestro primer propósito era lograr nuevos métodos que permitan el diagnóstico de la hipersensibilidad a drogas incluso en momentos en que no se están consumiendo, que es la limitación de las técnicas actuales. Al utilizar esta tecnología, ésto se consigue.

Si se demostrara alergia a drogas, se abrirán nuevas vías de detección de consumo en laboratorio sin necesidad de que el paciente hubiera consumido la droga en el momento del análisis, al ser la respuesta alérgica perdurable en el tiempo y evidenciable por la detección de anticuerpos específicos.

La aplicación de los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos a gran escala (micromatrices o microarrays) mediante el ISAC, hará posible que podamos disponer de biochips o paneles de alérgenos o epítomos, pegados a placas de sílice, pudiéndose utilizar miles en un solo ensayo. Esto nos permitirá saber el mapa de sensibilización de cada paciente a las drogas implicadas, valorar su relevancia clínica, las posibles reactividades cruzadas y el pronóstico de su enfermedad. También servirá para

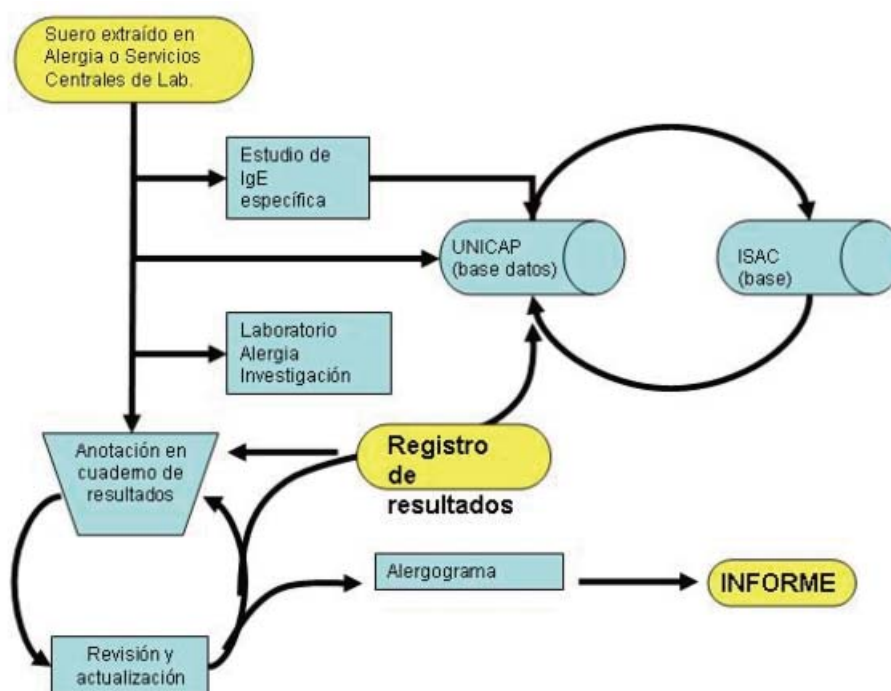


Figura 6. Algoritmo de trabajo utilizado en los pacientes de nuestro Hospital.

prevenir eventos adversos por medicación analgésica y anestésica. Aunque la interpretación de sus resultados dependa de un especialista, se cuenta con otras especialidades hospitalarias implicadas.

En la figura 5, aparece recogido el esquema del procedimiento del ensayo de los microarrays.

Todo esto pretende colaborar en la obtención de los siguientes objetivos:

- Impulsar la investigación en los profesionales sanitarios como proceso de generación, gestión e intercambio de conocimiento, en un sistema de salud moderno.
- Mejorar la efectividad de la práctica clínica y disminuir los efectos adversos en los pacientes.

En la Figura 6 aparece recogido el algoritmo de trabajo seguido en nuestro centro para el estudio de los pacientes.

En el Anexo 1 se recogen los resultados de un estudio mediante microarrays de un paciente estudiado en nuestro Hospital. El paciente tiene 54 años de edad.

Bibliografía

- 1 Hamilton RG. Assessment of human allergic diseases. En: Rich RR, et al ed. *Clinical Immunology, Principles and Practice*, 3 ed. Mosby Elsevier; 2008:1471-84.
- 2 Niemeier NR, de Monchy JG. Age-dependency of sensitization to aero-allergens in asthmatics. *Allergy* 1992;47:431-5.
- 3 Nelson HS. Variables in allergy skin testing. *Allergy Proc* 1994;15(6):265-8
- 4 Liappis, N; Berdel, B. Determination of total IgE and of specific IgE in the serum of capillary blood. *Allergologie*;1998;11:10-12.
- 5 Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(12):1321-6.
- 6 Wohrl S, Vigl K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarisch R, Prinz M, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy*. 2006;61(5):633-9.
- 7 Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays in diagnosing IgE-mediated diseases: spotting allergy at the molecular level. *Expert Rev Mol Diagn*. 2004;4(4):539-48.
- 8 Ott H, Baron JM, Heise R, Ocklenburg C, Stanzel S, Merk HF, et al. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy*. 2008;63(11):1521-8.
- 9 Hantusch B, Scholl I, Harwanegg C, Krieger S, Becker WM, Spitzauer S, et al. Affinity determinations of purified IgE and IgG antibodies against the major pollen allergens Phl p 5a and Bet v1a: discrepancy between IgE and IgG binding strength. *Immunol Lett*. 2005;97(1):81-9.
- 10 Ott H, Schroeder CM, Stanzel S, Merk HF, Baron JM. Microarray-based IgE detection in capillary blood samples of patients with atopy. *Allergy Net* 2006;61:1146-52
- 11 Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, Harwanegg C, Hiller R, Rumpold H, et al. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods*. 2004;32(3):249-54.
- 12 Hiller R, Laffer S, Harwanegg C et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J*. 2002;16(3):414-6.
- 13 Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S, Valenta R. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(1):7-13.
- 14 Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, Mueller MW. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergenspecific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(10):1443-9.
- 15 Armentia A, Castrodeza J, Ruiz Munoz P, et al. Allergic hypersensitivity to cannabis in patients with allergy and illicit drug abusers. *Allergol Immunopathol* 2011;39(5) :271-9.

Anexo 1.

Resultados de los microarrays de un paciente de 54 años, atendido en el hospital.

1. Sumario de los resultados positivos IgE

Componentes aeroalergenos especie-específicos

Polen de gramíneas

Gramma mayor	nCyn d 1	Gramínea grupo 1	5,5 ISU-E	
Hierba Timotea	rPhl p 1	Gramínea grupo 1	13 ISU-E	
	rPhl p 2	Gramínea grupo 2	2,3 ISU-E	
	nPhl p 4	Enzima cortadora de berberina	0,4 ISU-E	
	rPhl p 5	Gramínea grupo 5	1,1 ISU-E	
	rPhl p 6	Gramínea grupo 6	1,2 ISU-E	

Polen de árboles

Polen de olivo	nOle e 1	Olivo grupo 5	2,1 ISU-E	
----------------	----------	---------------	-----------	--

Animales

Gato	rFel d 1	Uteroglobina	4,1 ISU-E	
------	----------	--------------	-----------	--

Ácaros

D. farinae (HDM)	rDer f 2	Familia NPC2	0,4 ISU-E	
L. destructor (storage mite)	rLep d 2	Familia NPC2	0,9 ISU-E	

Otros componentes especie-específicos

Venenos

Veneno de avispa papelera	rPol d 5	Antígeno 5	0,5 ISU-E	
Veneno de avispa común	rVes v 5	Antígeno 5	0,9 ISU-E	

Componentes marcadores de reactividad cruzada

Profilina

Abedul	rBet v 2	Profilina	2 ISU-E	
Látex	rHev b 8	Profilina	4,4 ISU-E	
Mercurial	rMer a 1	Profilina	3,5 ISU-E	
Hierba Timotea	rPhl p 12	Profilina	0,7 ISU-E	

ISAC unidades estandarizadas(ISU-E)

- < 0.3
- 0.3 - 0.9
- 1 - 14.9
- ≥ 15

Nivel

- Indetectable
- Bajo
- Moderado /alto
- Muy alto



2. Resultados IgE por grupos de proteínas

Componentes alimentarios especie-específicos

Clara de huevo	nGal d 1	Ovomucoide	<0,3 ISU-E
	nGal d 2	Ovoalbúmina	<0,3 ISU-E
	nGal d 3	Conalbúmina/Ovotransferrina	<0,3 ISU-E
Yema de huevo / Carne de pollo	nGal d 5	Livetina/Albúmina sérica	<0,3 ISU-E
Leche de vaca	nBos d 4	Alfa-lactoalbúmina	<0,3 ISU-E
	nBos d 5	Beta-lactoglobulina	<0,3 ISU-E
	nBos d 8	Caseína	<0,3 ISU-E
	nBos d lactoferrin	Transferrina	<0,3 ISU-E
Bacalao	rGad c 1	Parvalbumina	<0,3 ISU-E
Gamba	nPen m 2	Arginina kinasa	<0,3 ISU-E
	nPen m 4	Proteína de unión al calcio sarcoplasmático	<0,3 ISU-E
Anacardo	rAna o 2	Proteína de almacenamiento, 11S globulina	<0,3 ISU-E
Nuez de Brasil	rBer e 1	Proteína de almacenamiento, 2S albúmina	<0,3 ISU-E
Avellana	nCor a 9	Proteína de almacenamiento, 11S globulina	<0,3 ISU-E
Nuez	nJug r 1	Proteína de almacenamiento, 2S albúmina	<0,3 ISU-E
	nJug r 2	Proteína de almacenamiento, 7S globulina	<0,3 ISU-E
Semilla de sésamo	nSes i 1	Proteína de almacenamiento, 2S albúmina	<0,3 ISU-E
Cacahuete	rAra h 1	Proteína de almacenamiento, 7S globulina	<0,3 ISU-E
	rAra h 2	Proteína de almacenamiento, conglutina	<0,3 ISU-E
	rAra h 3	Proteína de almacenamiento, 11S globulina	<0,3 ISU-E
	nAra h 6	Proteína de almacenamiento, 2S albúmina	<0,3 ISU-E
Soja	nGly m 5	Proteína de almacenamiento, Beta-conglicinina	<0,3 ISU-E
	nGly m 6	Proteína de almacenamiento, Glicinina	<0,3 ISU-E
Trigo sarraceno	nFag e 2	Proteína de almacenamiento, 2S albúmina	<0,3 ISU-E
Trigo	rTri a 14	Proteína transportadora de lípidos (LTP)	<0,3 ISU-E

Componentes alimentarios especie-específicos

Trigo	rTri a 19.0101	Omega-5 gliadina	<0,3 ISU-E
	nTri a aA_Tl	Alfa-Amilasa / Inhibidor de tripsina	<0,3 ISU-E
Kiwi	nAct d 1	Cistein proteasa	<0,3 ISU-E
	nAct d 5	Kiwelina	<0,3 ISU-E

Alergeno mayoritario del pescado y panalergeno de este grupo. Marcador de reactividad cruzada entre diferentes especies de pescado y anfibios. Proteína estable al calor y la digestión causando reacciones con alimentos cocinados.

Componentes aeroalergenicos especie-específicos**Polen de gramíneas**

Gramma mayor	nCyn d 1	Gramínea grupo 1	5,5 ISU-E	
Hierba Timotea	rPhl p 1	Gramínea grupo 1	13 ISU-E	
	rPhl p 2	Gramínea grupo 2	2,3 ISU-E	
	nPhl p 4	Enzima cortadora de berberina	0,4 ISU-E	
	rPhl p 5	Gramínea grupo 5	1,1 ISU-E	
	rPhl p 6	Gramínea grupo 6	1,2 ISU-E	
	rPhl p 11	Proteína relacionada con Ole e 1	<0,3 ISU-E	

Polen de árboles

Abedul	rBet v 1	Proteína PR10	<0,3 ISU-E	
Cedro del Japón	nCry j 1	Pectato liasa	<0,3 ISU-E	
Ciprés	nCup a 1	Pectato liasa	<0,3 ISU-E	
Polen de olivo	nOle e 1	Olivo grupo 5	2,1 ISU-E	
	rOle e 9	Beta-1,3-glucanasa	<0,3 ISU-E	
Plátano de sombra	rPla a 1	Inhibidor putativo de la invertasa	<0,3 ISU-E	
	nPla a 2	Poligalacturonasa	<0,3 ISU-E	

Ole e 1 es también un marcador de la sensibilización al fresno.

Polen de malezas

Ambrosia	nAmb a 1	Pectato liasa	<0,3 ISU-E	
Artemisa	nArt v 1	Defensina	<0,3 ISU-E	
Chenopodium	rChe a 1	Proteína relacionada con Ole e1	<0,3 ISU-E	
Parietaria	rPar j 2	Proteína transportadora de lípidos (LTP)	<0,3 ISU-E	
Plántago	rPla l 1	Proteína relacionada con Ole e1	<0,3 ISU-E	
Salsola	nSal k 1	Pectin metilesterasa	<0,3 ISU-E	

Animales

Perro	rCan f 1	Lipocalina	<0,3 ISU-E	
	rCan f 2	Lipocalina	<0,3 ISU-E	
	rCan f 5	Arginina esterasa	<0,3 ISU-E	
Caballo	rEqu c 1	Lipocalina	<0,3 ISU-E	
Gato	rFel d 1	Uteroglobina	4,1 ISU-E	
	rFel d 4	Lipocalina	<0,3 ISU-E	
Ratón	nMus m 1	Lipocalina	<0,3 ISU-E	

Hongos

Alternaria	rAlt a 1	Glicoproteína acidica	<0,3 ISU-E	
	rAlt a 6	Enolasa	<0,3 ISU-E	
Aspergillus	rAsp f 1	Mitogilina	<0,3 ISU-E	
	rAsp f 3	Proteína peroxisomal	<0,3 ISU-E	
	rAsp f 6	Superoxido Mn dismutasa	<0,3 ISU-E	
Cladosporium	rCla h 8	Manitol deshidrogenasa	<0,3 ISU-E	

Acaros

B. tropicalis (HDM)	rBlo t 5	Ácaro grupo 5	<0,3 ISU-E	
D. farinae (HDM)	nDer f 1	Cistein proteasa	<0,3 ISU-E	
	rDer f 2	Familia NPC2	0,4 ISU-E	