



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 302 612**

② Número de solicitud: 200601159

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/66 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **05.05.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2008**

Fecha de la concesión: **18.06.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **09.07.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
09.07.2009

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Peral Cerdá, María Asunción;
Carracedo Rodríguez, Juan Gonzalo y
Pintor Just, Jesús Jerónimo**

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Método para el diagnóstico y seguimiento de la efectividad del tratamiento del ojo seco.**

㉖ Resumen:

Método para el diagnóstico y seguimiento de la efectividad del tratamiento del ojo seco.

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico del ojo seco en pacientes con dicha patología y al seguimiento de la efectividad del tratamiento por medio de la concentración del dinucleótido diadenosina tetrafosfato (Ap_4A). Este método permite analizar las concentraciones del compuesto diadenosina tetrafosfato, Ap_4A , de una muestra de lagrime del paciente para determinar su presencia, que en los casos de ojo seco se encuentra anormalmente elevada. De este modo objetivamente se puede confirmar o descartar la presencia de esta patología.

El método de diagnóstico de la presente invención comprende: la detección por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de la molécula Ap_4A , para cuyo calculo se empleará una muestra estándar del Ap_4A de origen comercial y concentración conocida; y la utilización un método luminométrico para la detección y cuantificación del dinucleótido Ap_4A , mediante el empleo de luciferin-luciferasa.

ES 2 302 612 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico y seguimiento de la efectividad del tratamiento del ojo seco.

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico molecular del ojo seco en pacientes con dicha patología y al seguimiento de la efectividad del tratamiento por medio de la determinación de la concentración del dinucleótido diadenosina tetrafosfato (Ap₄A).

10 Estado de la técnica

15 La película lagrimal constituye una barrera natural que separa al ojo del medio externo (Records, 1979). Esta película está formada por tres capas de diferente naturaleza, una de mucina, otra acuosa y por último una lipídica. La función de la lágrima puede establecerse en torno a tres frentes fundamentales: 1) mantener húmeda y lubricada la superficie ocular, 2) aportar elementos nutricionales a la córnea y eliminar los cuerpos extraños y restos celulares con el parpadeo y 3) constituir la primera barrera de defensa frente a las infecciones (Dilly, 1994).

20 En condiciones normales existe un equilibrio entre la composición y la función de la película lagrimal de modo que cuando éste se ve alterado puede dar lugar a numerosas complicaciones en la superficie ocular. Estas complicaciones se conocen genéricamente como problemas de ojo seco y dependiendo del grado del desequilibrio, serán más o menos severas.

25 Entre las causas que pueden provocar este desequilibrio podemos encontrar una deficiencia en la secreción lagrimal (de ahí el término ojo seco) que puede estar motivada, por un síndrome denominado de Sjögren o una inestabilidad de la película lagrimal debido al porte y/o deterioro de las lentes de contacto. Todas estas complicaciones muestran que los síntomas que puede tener un paciente y los signos que nos advierten de esta patología no están correlacionados. Lo que implica que podemos encontrar pacientes con un volumen de la secreción lagrimal bajo y ningún síntoma ocular y otros con un volumen lagrimal normal y los síntomas oculares característicos del ojo seco. La falta de correlación entre 30 síntomas y signos ha sido reportada en la literatura especializada (Nichols y col., 2004; McArthy y col., 1998; Schein y col., 1997). Esta situación contradictoria, hace que existan grandes diferencias entre la etiología y patofisiología (Lemp, 1995; 1998), motivo por el cuál es difícil un diagnóstico preciso del ojo seco.

35 Hoy en día existen numerosos cuestionarios y pruebas que muestran los síntomas que padecen los pacientes y miden los signos que presentan. Entre estas pruebas, el Dry Eye Workshop propuso el uso de un cuestionario validado de síntomas, una prueba para evaluar el daño de la superficie ocular, la medida de la inestabilidad lagrimal y la demostración de la hiperosmolaridad lagrimal, como elementos para enjuiciar esta patología.

40 El cuestionario de síntomas es poco reproducible, al igual que la medida de inestabilidad lagrimal, debido a la subjetividad tanto del paciente como del examinador. La evaluación del daño superficial como prueba aislada no es útil ya que no valora exclusivamente el ojo seco, y su correlación con las otras pruebas propuestas por el Dry Eye Workshop es baja.

45 Para la medida de la osmolaridad lagrimal, si queremos que sea fiable y precisa, se necesita un volumen de lágrima grande, esto es difícil de obtener en pacientes con sequedad ocular sin estimular el componente reflejo de la secreción lagrimal. Este componente falsearía el valor de la osmolaridad del sujeto. Además, la medida de la osmolaridad lagrimal requiere ser realizada inmediatamente a continuación de la recogida para evitar que la lágrima se evapore y falsee los resultados. En la actualidad existen micro osmomómetros que pueden medir la osmolaridad con cantidades pequeñas de lágrima pero su fiabilidad y reproducibilidad son deficientes.

50 Recientemente, el Dry Eye Workshop ha presentado los nuevos criterios que deben seguir las pruebas subjetivas y objetivas para los ensayos clínicos del ojo seco. No obstante, en el panorama actual, no dejan de aparecer nuevas pruebas invasivas y no invasivas para el diagnóstico del ojo seco. Dichas pruebas intentan identificar y analizar marcadores biológicos que permitan detectar claramente si un individuo tiene o no ojo seco (Grus y col., 2005). Pero son 55 pruebas con poca utilidad práctica ya que los instrumentos necesarios para realizarlas son muy caros y requieren una formación muy especializada para su utilización.

60 La patente US 5,884,630 describe un método de diagnóstico del ojo seco basado en los cambios de temperatura en la superficie corneal y en la velocidad de evaporación de la lágrima. El hecho de que las condiciones atmosféricas sean tan estrictas (24 grados de temperatura y 40% de humedad) para que este método sea eficaz, lo convierte en poco práctico.

65 Recientemente, se ha descrito la presencia de una familia nueva de compuestos en la película lagrimal (Pintor y col., 2002). Estos compuestos, los diadenosina polifosfatos, son nucleótidos naturales que presentan numerosas acciones biológicas tanto a nivel intracelular como a nivel extracelular (McLennan, 2000). Estos dinucleótidos están formados por dos moléculas del nucleósido adenosina unidas por una cadena variable de grupos fosfato, abreviados como Ap_nA (n = 2-7).

Aunque la actividad de estos nucleótidos en tejidos oculares no se ha investigado completamente, se sabe que estos compuestos, actuando a través de los receptores P2, modulan la presión intraocular en los conejos (Pintor y col., 2002a). Otra acción de estos dinucleótidos, en este caso en la superficie ocular, es la estimulación de la secreción lagrimal, cuando los dinucleótidos Ap₄A, Ap₅A, y Ap₆A, son instilados de forma tópica (Pintor y col., 2002b). Por otra parte, el nucleótido uridin trifosfato, UTP y el Ap₄A mejoran la cicatrización de las heridas corneales superficiales en los conejos de la raza Nueva Zelanda (Pintor y col., 2004).

No se conoce ninguna patente en la que se describa a algún dinucleótido, como el Ap₄A, como molécula de interés diagnóstico. Existen, sin embargo, patentes que describen el empleo de dinucleótidos para el tratamiento de diversas patologías. Así por ejemplo las patentes US 2003207825 y CN 1575181 tratan del empleo de los dinucleósidos polifosfatos para el tratamiento de procesos edematosos oculares especialmente enfocados a la retina. Por otro lado la patente US 2003207825 describe el uso de estos mismos compuestos para el tratamiento de afecciones relacionadas con las secreciones mucosas, de fluidos en general así como para procesos de agregación plaquetaria. En este mismo orden de cosas la patente US 2003036527 describe el empleo de dinucleósidos polifosfatos para la limpieza de mucosidades en el ojo, pulmones, oídos etc. Por último, la patente WO0112644 describe el empleo de dinucleósidos polifosfatos como agentes terapéuticos para el tratamiento de las infecciones con el virus VIH.

Es, por consiguiente, de extraordinario interés encontrar una molécula estable que presente en la lágrima pueda cambiar sus concentraciones en diversas condiciones de sequedad ocular, haciendo fácil y más preciso el diagnóstico, el seguimiento y la mejora de los tratamientos para el ojo seco.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico del ojo seco que se caracteriza por analizar una muestra para determinar la presencia del compuesto diadenosina tetrafosfato, Ap₄A, que en los casos de ojo seco se encuentra anormalmente elevado. De este modo objetivamente se puede confirmar o descartar la presencia de esta patología.

La muestra puede obtenerse a partir de la lágrima del paciente a través de diversos métodos de extracción, entre los cuales destacamos el denominado test de Schirmer, o la extracción por medio de una pipeta o tubo capilar.

El método de diagnóstico de la presente invención comprende adicionalmente la detección por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de la molécula Ap₄A.

La presente invención tiene también por objeto proporcionar un método de análisis para estudiar la evolución de los posibles tratamientos que para el ojo seco se pudiesen prescribir a los pacientes con dicha patología, basado en la determinación de los niveles del dinucleótido Ap₄A.

Por otro lado, la presente invención, tiene como objetivo adicional proporcionar un método de análisis de compuestos para identificar aquellos que sean terapéuticamente útiles para el tratamiento del ojo seco basándose en la determinación del dinucleótido Ap₄A.

Existe una dificultad manifiesta para el diagnóstico del ojo seco, ya que se dan situaciones muy diferentes como las que se han comentado con anterioridad, la presente invención demuestra que la determinación de los niveles del dinucleótido Ap₄A supone tener por primera vez una herramienta molecular gracias a la cuál los cambios en los niveles de esa molécula permiten conocer de forma totalmente clara la existencia o no de ojo seco. Además según sea la concentración del Ap₄A en la lágrima se podrá conocer el nivel de severidad de esta patología.

De acuerdo con el método de diagnóstico de la presente invención las pautas de análisis para conocer la existencia de ojo seco quedarían de la siguiente forma:

A todo paciente al que se quiera diagnosticar si tiene ojo seco se le tomará una muestra de lágrima de volumen conocido de entre 10 μ L-100 μ L por medio del test de Schirmer, pipeta o bien tubo capilar.

Un volumen de inyección de 10 μ L-100 μ L de lágrima se procesa por medio de un filtro de 0.02 μ de tamaño de poro como paso previo a la inyección en un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Para la determinación del dinucleótido Ap₄A en la lágrima el sistema cromatográfico se equilibra con una fase móvil que contenga 10 mM KH₂PO₄, 2 mM tetrabutil amonio y 10-17% de acetonitrilo todo ello a pH 7,5. Alternativamente, se puede emplear otra fase móvil que contenga 0.1 M KH₂PO₄, 3-5% metanol, pH 6,5. En ambos casos la detección se llevará a cabo midiendo la absorbancia a 256-260 nm de longitud de onda. En cualquiera de las dos condiciones anteriormente descritas el compuesto diadenosina tetrafosfato es fácilmente identificable y cuantificable. Para calcular la concentración del dinucleótido Ap₄A en la muestra de lágrima, se empleará una muestra estándar del Ap₄A de origen comercial y concentración conocida.

Alternativamente, según otro aspecto de la siguiente invención, la detección y cuantificación del dinucleótido Ap₄A se puede realizar por un método luminométrico, tomando como en el caso anterior una muestra de 50 μ L de lágrima del paciente. Esta es calentada durante 5 min. a 100°C, y pasado este tiempo se procede a añadir una cantidad activa de la enzima luciferín-luciferasa, permitiendo que el sistema se estabilice durante 5 min. Transcurrido este tiempo se añaden 0,3 U/mL o una cantidad que sea enzimáticamente activa, de la fosfodiesterasa de *Crotalus durissus* (EC

ES 2 302 612 B2

3.1.15.1) o alternativamente de la fosfodiesterasa de *Crotalus adamanteus* (EC 3.1.4.1). Cualquiera de estas enzimas rompen el Ap₄A y producen el ATP que pasa a reaccionar con la luciferín - luciferasa y como consecuencia de dicha reacción se produce luz que es captada por un equipo de medida (detector). La cantidad de luz se corresponde con la cantidad de ATP medida que, a su vez, se corresponde con la cantidad de Ap₄A que hay en la muestra puesto que la reacción de la fosfodiesterasa produce una molécula de ATP por molécula de Ap₄A. En paralelo se realizará una recta de calibrado con Ap₄A comercial de concentración conocida para poder cuantificar los niveles de Ap₄A que haya en la muestra.

En el caso en el que se desee hacer un seguimiento de la posible eficacia de un tratamiento para el ojo seco, se procederá del mismo modo y simplemente se estudiará si los niveles del dinucleótido Ap₄A han disminuido a niveles normales durante y después del tratamiento, comparándolo con el valor patológico (valor inicial).

Si lo que se desea es realizar un estudio de la búsqueda de sustancias terapéuticas para el tratamiento del ojo seco se tomará la lágrima del animal de experimentación que presente la condición de ojo seco y se procederá a aplicar el fármaco, después de lo cual se tomará una muestra de 10 μ L-100 μ L por medio del test de Schirmer, pipeta o bien tubo capilar, para ser posteriormente analizado como se ha descrito anteriormente. Las variaciones de los niveles del dinucleótido Ap₄A se contrastarán antes del tratamiento (situación patológica) y tras el tratamiento.

Breve descripción de las figuras

Para facilitar la comprensión de la invención y formando parte de esta memoria descriptiva se acompañan una serie de figuras:

En la Figura 1 aparecen perfiles cromatográficos, con respecto al Tiempo de Retención en minutos. Aquí se pueden observar las diferencias existentes en la concentración del Ap₄A entre el individuo normal (registro superior "D"), con ojo seco y lagrimación normal (registro "C"), con ojo seco y lagrimación baja (registro "B"), y el estándar comercial (registro "A").

La Figura 2 muestra un diagrama de barras con los valores de concentración del Ap₄A (μ M) en individuos normales asintomáticos -volumen de lágrima normal-, en pacientes sintomáticos de ojo seco y con volumen de lagrimación normal "A" y en pacientes sintomáticos de ojo seco con volumen de lagrimación baja "B". Con La letra "C" se recogen los valores de concentración del Ap₄A para los sujetos sintomáticos de ojos seco "A y B".

La Figura 3 corresponde a la recta de calibración de la medida luminométrica de Ap₄A donde se puede apreciar la correlación entre la cantidad de luz emitida (RLU) y la concentración del dinucleótido.

La figura 4 muestra la cuantificación de las concentraciones de Ap₄A (1 μ M) en pacientes normales no sintomáticos (muestras normales) y pacientes con sintomatología de ojo seco y con volumen de lagrimación bajo "A" calculadas con el empleo del método luminométrico y la recta de calibrado mostrada en la figura 3.

Modo de realización de la invención

El método de la presente invención se ilustra a continuación mediante tres ejemplos, los cuales no son limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

Medida de los niveles de Ap₄A en un paciente con ojo seco según los cuestionarios sobre síntomas y signos aparentes. El paciente poseía molestias típicas de sequedad ocular y lagrimación baja. Se tomó una muestra del volumen de lágrima del paciente (por medio del test de Schirmer) colocándole una tira de Schirmer en cada ojo y permitiendo que se impregnara de lágrima durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se retiró la tira y se introdujo en un tubo que contenía 500 μ L de agua ultrapura. Se agitó el tubo durante 2 min. y su contenido se pasó a través de un filtro de 0.02 μ de poro. Una vez filtrado se tomaron 25 μ L y se inyectaron en el cromatógrafo equilibrado con una fase móvil que contenía 10 mM KH₂PO₄, 2 mM tetrabutil amonio y 15% de acetonitrilo todo ello a pH 7.5. El Ap₄A se detectó a 260 nm de longitud de onda. La medida de dicha muestra demostró una concentración para el dinucleótido Ap₄A de 11.2 \pm 0.5 μ M. Este resultado es significativamente superior que el nivel normal del Ap₄A en la lágrima en individuos sin ojo seco que es de 0.108 \pm 0.018 μ M (Pintor y col., 2002).

Ejemplo 2

Medida de los niveles de Ap₄A en un paciente con ojo seco según los cuestionarios sobre síntomas (poseía molestias) y sin signos aparentes de ojo seco al tener un volumen de lagrimación normal. Se tomó una muestra de lágrima del paciente (por medio del test de Schirmer) colocándole una tira de Schirmer en cada ojo y permitiendo que se impregnara de lágrima durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se tomó la tira y se introdujo en un tubo que contenía 500 μ L de agua ultrapura. Se agitó el tubo durante 2 min. y su contenido se pasó a través de un filtro de 0.02 μ de poro. Una vez filtrado se tomaron 25 μ L y se inyectaron en el cromatógrafo equilibrado con una fase móvil que contenía 10 mM KH₂PO₄, 2 mM tetrabutil amonio y 15% de acetonitrilo todo ello a pH 7.5. El Ap₄A se detectó a 260 nm de longitud de onda. Las medidas de dicha muestra demostró una concentración para el dinucleótido Ap₄A de 1.7 \pm 0.3

ES 2 302 612 B2

μM . Este resultado es significativamente superior que el nivel normal del Ap_4A en la lágrima en individuos sin ojo seco que es de $0.108 \pm 0.018 \mu\text{M}$ (Pintor y col., 2002).

Ejemplo 3

5

Medida de los niveles de Ap_4A en individuos asintomáticos y a pacientes con ojo seco según los cuestionarios sobre síntomas (poseía molestias) y sin signos aparentes de ojo seco al tener un volumen de lagrimación normal. Se tomó una muestra de lágrima del paciente (por medio del test de Schirmer) colocándole una tira de Schirmer en cada ojo y permitiendo que se impregnara durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se tomó la tira y se introdujo en un tubo que contenía $500 \mu\text{L}$ de agua ultrapura. Se agitó el tubo durante 2 min y se tomó una alícuota de $50 \mu\text{L}$ la cual se introdujo en un baño a 100°C durante 5 min. Transcurrido ese tiempo y una vez que la temperatura de la muestra era de 37°C , se le añadieron $110 \mu\text{L}$ de tampón acetato, y se añadieron $20 \mu\text{L}$ del reactivo luciferín-luciferasa para obtener una concentración final en la muestra de 2 mg/ml , se agitó la muestra, se esperó 5 minutos y posteriormente se registró la emisión basal de luz con un sistema de detección (luminómetro). A continuación se añadió un volumen de fosfodiesterasa de *Crotalus durissus* (EC 3.1.15.1) o alternativamente de *Crotalus adamanteus* (EC 3.1.4.1) para tener una concentración final de 0.3 U/mL en la muestra. Acto seguido se midió la generación de luz como consecuencia de la hidrólisis del Ap_4A y la concomitante aparición del ATP. Esta medida de luz se comparó con una realizada en las mismas condiciones con concentraciones conocidas del Ap_4A .

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método de análisis *in vitro* para el diagnóstico del ojo seco y/o seguimiento de la efectividad del tratamiento en pacientes con dicha patología, que comprende recoger una muestra de lágrima para determinar la concentración de Ap4A presente en la lágrima.

10 2. Método de análisis *in vitro* para el diagnóstico del ojo seco y/o seguimiento de la efectividad del tratamiento en pacientes con dicha patología, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la concentración de Ap4A presente en la lágrima se realiza por análisis cromatográfico.

15 3. Método de análisis *in vitro* para el diagnóstico del ojo seco y/o seguimiento de la efectividad del tratamiento en pacientes con dicha patología, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la concentración de Ap4A presente en la lágrima se realiza por análisis luminométrico.

20 4. Método de análisis *in vitro* para el diagnóstico del ojo seco y/o seguimiento de la efectividad del tratamiento en pacientes con dicha patología, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra de lágrima es recogida por medio de una tira de papel secante (test de Schirmer), por medio de un tubo capilar, por medio de una pipeta u otro sistema de aspiración.

25 5. Método de análisis *in vitro* para el diagnóstico del ojo seco y/o seguimiento de la efectividad del tratamiento en pacientes con dicha patología, según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque las condiciones cromatográficas para la determinación incluyen una fase móvil con 10 mM de KH_2PO_4 , 2 mM tetrabutil amonio y 10-17% de acetonitrilo todo ello a pH 7.5 y condiciones de detección 254-260 nm de longitud de onda.

30 6. Método de análisis *in vitro* para el diagnóstico del ojo seco y/o seguimiento de la efectividad del tratamiento en pacientes con dicha patología, según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque las condiciones cromatográficas para la detección contienen una fase móvil con 0.1 mM KH_2PO_4 , 3-5% metanol, pH 6.5 y condiciones de detección 254-260 nm de longitud de onda.

35 7. Método de análisis *in vitro* para el diagnóstico del ojo seco y/o seguimiento de la efectividad del tratamiento en pacientes con dicha patología, según reivindicaciones 1 y 3, **caracterizado** porque en el método luminométrico una alícuota de lágrima es calentada a 100°C, se incuba con una cantidad enzimáticamente activa de luciferín-luciferasa y donde posteriormente se añade un volumen enzimáticamente activo de fosfodiesterasa de *Crotalus durissus* (EC 3.1.15.1) o alternativamente de *Crotalus adamanteus* (EC 3.1.4.1) para medir la concentración del Ap₄A a partir de su producto de hidrólisis por emisión de luz producida.

40

45

50

55

60

65

Fig.1

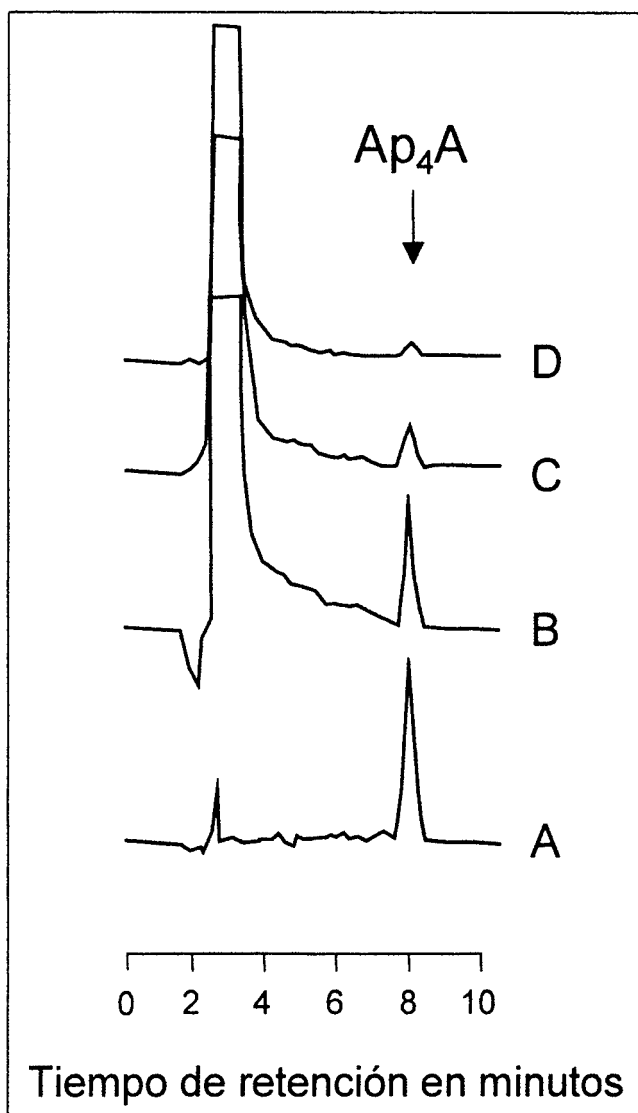


Fig.2

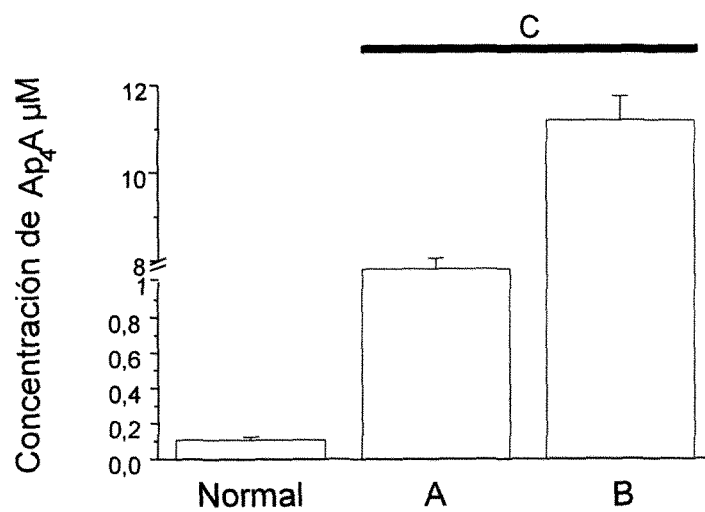


Fig.3

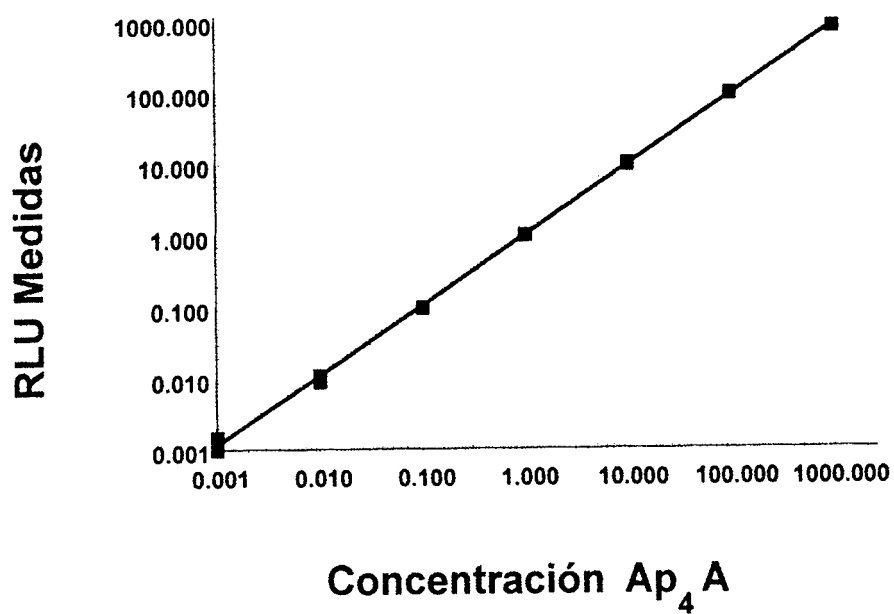
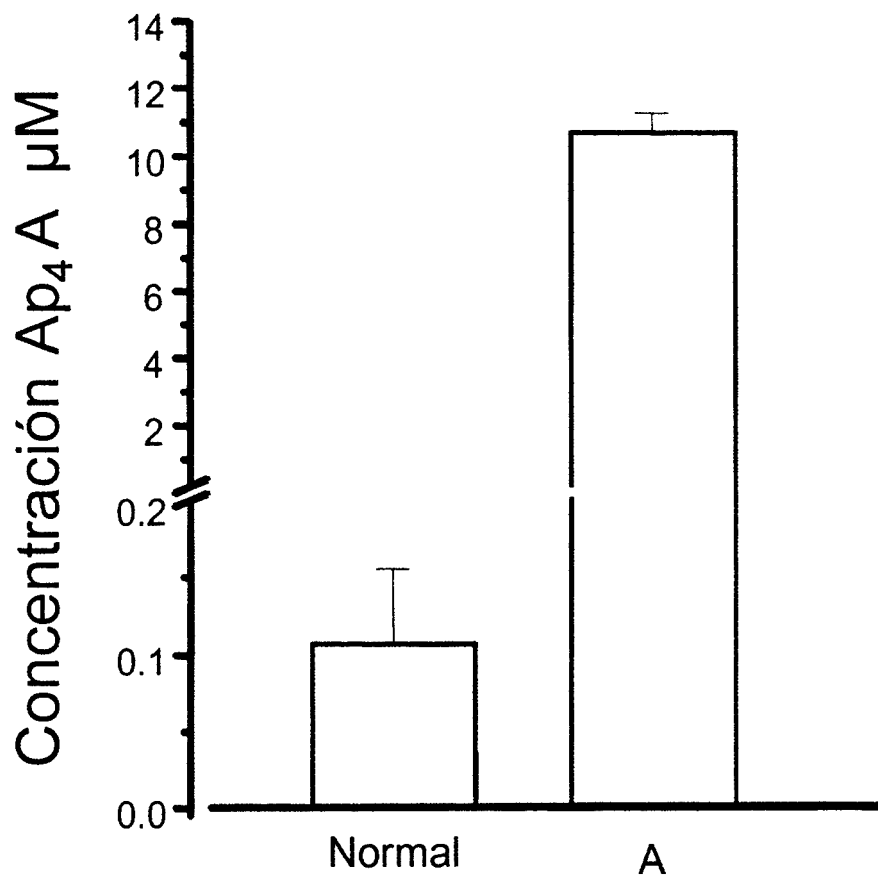


Fig.4





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 302 612

② Nº de solicitud: 200601159

③ Fecha de presentación de la solicitud: **05.05.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/66** (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GRUS FRANZ H. et al. "SELDI-TOF-MS ProteinChip array profiling of tears from patients with dry eye." Investigative Ophthalmology & Visual Science. Mar 2005. Vol. 46, No. 3, páginas 863-876. ISSN 0146-0404 (Print).	1-7
A	WO 9411739 A1 (CYMBUS BIOSCIENCE LTD; CASEY FRANCES MARY; HODSON STUART) 26.05.1994	1-7
A	PINTOR JESÚS et al. "Nucleotides and dinucleotides in ocular physiology: New possibilities of nucleotides as therapeutic agents in the eye." Drug Development Research May 2003. Vol. 59, No. 1, páginas 136-145. ISSN 0272-4391 (ISSN print).	1-7
A	PERAL A. et al. "Mechanical release of dinucleotides to the tear film." ARVO Annual Meeting Abstract Search and Program Planner 2003. Vol. 2003, Abstract No. 2494.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.06.2008

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/1